

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STRONSIYUMU TOLERE EDEN BAKTERİLERİN 16S rDNA  
SEKANSLAMASI ile TANIMLANMASI

BURAK KABATAŞ

HAZİRAN 2013

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

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN  
Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN  
Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

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

KABATAŞ, Burak

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2013, 123 sayfa

Günümüzde ağır metal içeren endüstriyel atıkların gelişi güzel ve kontrolsüz olarak çevreye salınımı önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Ağır metaller endüstriyel atık sularında bulunan canlılar için yüksek toksik etkiye sahip maddelerdir. Sanayi kuruluşlarında bulunan atık su arıtım tesislerinin yetersiz olması veya hiç olmaması sorunun en büyük kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde geleneksel yöntemlerle yapılan atık su arıtımının pahalı olması ve yetersiz kalması gibi nedenlerden dolayı biyolojik yöntemlerle yapılan atık su arıtımı tercih edilmektedir. Bu arıtımda kullanılacak lokal izolatların elde edilmesi, tanımlanması ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması biyoremediasyon çalışmaları için oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen stronsiyuma dirençli bakterilerin 16S rDNA sekans analizi ile tanımlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda minimal inhibitör konsantrasyon değeri 2000 mg/L olan stronsiyum dirençli iki suş izole edilmiş, ve bu suşlar biyokimyasal testler, 16S rDNA sekans ve yağ asidi analizleri kullanılarak *Micrococcus luteus* olarak tanımlanmıştır. Suşların moleküler karakterizasyonu için plazmit ve protein profilleri belirlenmiştir. Sr021 suşu gümüş, kalay, lityum, alüminyum ve baryum metallerine, Sr111 suşu ise kalay, lityum ve baryum metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Sr021 suşunun gentamicin, tobramicin, pefloxacin ve aztreonam antibiyotiklerine, Sr111 suşu ise piperacilin, gentamicin tobramicin, pefloxacin, aztreonam ve trimethoprim-

sulfamethoxazole antibiyotiklerine çoklu antibiyotik dirençliliği gösterdiği tespit edilmiştir. Plazmit profil analizi ve plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda *M. luteus* suşlarının stronsiyum ve antibiyotik direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. *M. luteus* için yapılan total protein analizi sonucunda stronsiyum dirençliliğinde total proteinlerin etkili olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır Metal Dirençliliği, 16S rDNA, Stronsiyum, Biyoremidasyon, Yağ Asidi Metal Ester Analizi

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION of STRONTIUM TOLERANT BACTERIA by 16S rDNA SEQUENCING

KABATAS, Burak

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Bulent ICGEN

June 2013, 123 Pages

Today indiscriminate and uncontrolled discharge of metal-contaminated industrial effluent in the environment has become an issue of major concern. Heavy metals are the major toxicants found in industrial waste water. Waste waters containing heavy metals are highly toxic for living systems. Industrial organizations without waste water treatment facilities or insufficient treatment of waste waters by these organizations are the main sources of environmental pollution problems. Due to their expense and insufficiencies, traditional methods are not desirable for waste water treatment when compared to biological methods. For the biological waste water treatment the characterization of local isolates in order to use in bioremediation studies is very important.

The purpose of this study, to identify strontium-resistant bacteria isolated from Kırıkkale-Kızılırmak by using 16S rDNA sequencing. Two strontium resistant isolates with a minimum inhibitory concentration of 2000 mg/L were identified as *Micrococcus luteus* by using biochemical tests, 16S rDNA sequencing and fatty acid methyl ester analysis. The isolates were further characterized for their plasmid and protein profiles. Strain Sr021 silver, tin, lithium, aluminium, and barium metals, the strain Sr111 tin, lithium, and barium metals have been identified in multiple

resistance. Sr021 strains, gentamicin, tobramycin, pefloxacin, and aztreonam, the piperacilin antibiotics, the strains Sr111, gentamicin, tobramycin, pefloxacin, aztreonam, and trimethoprim-sulfamethoxazole antibiotics multiple antibiotic resistance have been identified. Strontium and multi-resistant genes of *M. luteus* strains were found to be located on chromosomal DNA. *M. luteus* resistivity of strontium total protein analysis for total protein is shown to be effective.

**Key Words:** Heavy Metal Resistance, 16S rDNA, Strontium, Bioremediation, Fatty Acid Methyl Ester Analysis

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmalarımın tamamı boyunca bana destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tez yöneticisi değerli hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye ve Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkür ederim.

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

Ayrıca çalışmalarımnda her türlü yardımını esirgemeyen ve her konuda destek olan can dostum, kardeşim Serkan KOÇ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda beni destekleyen aileme, her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen babam Ramis KABATAŞ, annem Őükrüye KABATAŞ, abim Engin KABATAŞ ve yengem Cazibe KABATAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

*Canımdan çok sevdiğim dünyanın en değerli varlığı ve hakkını asla  
ödeyemeyeceğim canım Anneme...*



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kaynak Özetleri .....	3
1.1.1. Çevre Kirliliği .....	3
1.1.2. Endüstriyel Kirlilik .....	3
1.1.3. Ağır Metaller ve Toksik Etkileri .....	4
1.1.4. Stronsiyum'un Fonksiyonları .....	6
1.1.5. Stronsiyum'un Çevresel Etkileri .....	7
1.1.6. Ağır Metal Kullanıldığı Endüstri Dallarını .....	8
1.1.6.1. Stronsiyum'un Kullanım Alanları .....	9
1.1.7. Metallerin Uzaklaştırılma Yöntemleri .....	10
1.1.7.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri .....	10
1.1.7.1.1. İndirme-Çökeltme Yöntemi .....	11
1.1.7.1.2. Yükseltgeme-Çökeltme Yöntemi .....	11
1.1.7.1.3. Nötralizasyon-Çöktürme Yöntemi .....	12
1.1.7.1.4. İyon Değişimi .....	12
1.1.7.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri .....	12
1.1.7.2.1. Biyoremediasyon .....	12
1.1.7.2.1.1. Biyosorpsiyon .....	15
1.1.7.2.1.2. Biyoakümülyasyon .....	16
1.1.7.2.1.3. Biyodegradasyon .....	16
1.1.7.2.1.4. Fitoremediasyon .....	17
1.1.8. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları .....	17

1.1.8.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Dışarı Tutulması .....	19
1.1.8.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Transportu (Efflux) .....	20
1.1.8.3. Metallerin Proteine Bağlanması Yolu ile Hücre içinde Alınması ....	21
1.1.8.4. Ekstraselüler Alınma .....	23
1.1.8.5. Metallerin Daha Az Toksik Formlara Dönüştürüldüğü Enzimatik Detoksifikasyonu .....	23
1.1.9. Bakteri Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler .....	25
1.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Temel Prensipleri .....	28
1.1.11. 16S rDNA Dizi Analizi .....	33
1.1.12. Filogenetik Analiz .....	34
1.1.12.1. Dizilerin Hizalanması .....	35
1.1.12.2. Yer Değiştirmenin Saptanması .....	36
1.1.12.3. Filogenetik Ağacın Oluşumu .....	36
1.1.12.3.1. Farklılıkları En Aza İndirme (Maximum parsimony: MP) Yöntemi .....	36
1.1.12.3.2. En Yüksek İhtimal (Maximum likelihood: ML) Yöntemi .....	37
1.1.12.3.3. Uzaklık (Distance) Yöntemi .....	37
1.1.13. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi .....	38
1.1.14. Çalışmanın Amacı .....	42
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>43</b>
2.1. Materyal .....	43
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri .....	43
2.1.1.1. Nutrient Agar .....	43
2.1.1.2. Nutrient Broth .....	43
2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler .....	44
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar .....	45
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	45
2.1.3.2. Kullanılan Tamponlar .....	45
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar .....	45
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA) .....	45
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS) .....	45
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit) .....	46

2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50X TAE) Hazırlanması	46
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	46
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL)	46
2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 mL)	47
2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 mL)	47
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)	47
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 mL)	47
2.1.3.2.2.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)	47
2.1.3.2.2.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 mL)	47
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 mL)	48
2.1.3.2.2.9. %70'lik Etanol (100 mL)	48
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)	48
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)	48
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	48
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	48
2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	49
2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)	49
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon (11.1 mM Tris-HCl, Triton X-100, pH 7.6)	49
2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı	49
2.1.3.2.6. SDS- PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı	50
2.1.3.2.6.1. Ayrıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)	50
2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)	50
2.1.3.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması	51
2.1.3.2.8. Yağ Asit Analizi Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı	51
2.1.3.2.8.1. Solüsyon I	51
2.1.3.2.8.2. Solüsyon II	51
2.1.3.2.8.3. Solüsyon III	51
2.1.3.2.8.4. Solüsyon IV	51
2.1.3.3. PZR Amplifikasyonu için Örneklerin Hazırlanması	52
2.2. Yöntem	53
2.2.1. Çalışma Alanı	53

2.2.2. Örneklerin Toplanması .....	54
2.2.3. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu .....	55
2.2.4. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi .....	55
2.2.5. İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Testler ile Tanımlanması .....	56
2.2.6. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması .....	56
2.2.7. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi .....	56
2.2.8. Kromozomal DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini .....	57
2.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Amplifikasyonu .....	58
2.2.10. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	59
2.2.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi .....	60
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromür ile Boyanması .....	60
2.2.13. DNA Sekans Analizi .....	60
2.2.14. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması .....	61
2.2.15. Yağ Asit Metil Ester (FAME) Analizi .....	61
2.2.16. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi .....	62
2.2.17. Plazmit DNA İzolasyonu .....	63
2.2.18. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması .....	63
2.2.19. Plazmit DNA'nın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi .....	64
2.2.20. Plazmit Eliminasyonu .....	64
2.2.21. Total Protein İzolasyonu .....	65
2.2.22. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması .....	65
2.2.22.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması .....	65
2.2.22.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması .....	66
2.2.23. SDS-PAGE Jel Elektroforezi .....	66
2.2.24. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması .....	66
2.2.25. Total Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi .....	66
2.2.26. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü .....	67
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULAR .....</b>	<b>68</b>
3.1. Stronsiyuma Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi .....	68
3.2. Bakterilerin Biyokimyasal Tanımlanması .....	68

3.3. Bakterilerin Üreme Eğrisi .....	71
3.3.1. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr021 Suşunun Üreme Eğrisi .....	71
3.3.2. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr111 Suşunun Üreme Eğrisi .....	71
3.4. Kromozomal DNA İzolasyonu .....	72
3.5. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> 'un PZR Amplifikasyonu .....	73
3.6. Stronsiyum Dirençli Sr021 Suşunun DNA Sekans Analizi .....	75
3.7. Stronsiyum Dirençli Sr111 Suşunun DNA Sekans Analizi .....	76
3.8. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması .....	76
3.9. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> 'un Yağ Asit Metil Ester Analizi .....	80
3.10. Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profili .....	81
3.10.1. Stronsiyuma Dirençli Suşların Çoklu Metal Dirençlilik Profilleri .....	81
3.10.2. Stronsiyuma Dirençli Suşların Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Profilleri .....	82
3.11. Bakterilerin Plazmit DNA Profili Analizi .....	84
3.11.1. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr021 Suşunun Plazmit DNA Analizi .....	84
3.11.2. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr111 Suşunun Plazmit DNA Analizi .....	86
3.12. Plazmit Eliminasyon Sonrası Bakterilerin Pigmentasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	87
3.13. Bakterilerin Total Protein Analizi .....	88
3.13.1. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr021 Suşunun Total Protein Analizi .....	88
3.13.2. Stronsiyum Dirençli <i>M. luteus</i> Sr111 Suşunun Total Protein Analizi .....	90
<b>4. TARTIŞMA SONUÇ</b> .....	<b>92</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>103</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemlerinin şematik gösterimi .....	19
Şekil 1.2. <i>E. coli</i> 'de CopA bakır atım pompası .....	21
Şekil 1.3. <i>Synechococcus</i> 'ta Zn <sup>2+</sup> metalinin metalotiyoneine bağlanma sistemi .....	22
Şekil 1.4. Bakterilerde civa iyonlarına karşı direnç sağlayan enzimatik detoksifikasyon sistemi .....	25
Şekil 1.5. PCR çoğalmasının basamakları .....	29
Şekil 1.6. PCR sıcaklık değişim profile .....	31
Şekil 1.7. Gaz Kromatografisinin işlem basamakları .....	40
Şekil 1.8. Yağ asidi metil ester analizi işlem sırası .....	41
Şekil 2.1. Kızılırmak lokasyonu .....	53
Şekil 2.2. Kırıkkale-Kızılırmak Nehri uydu fotoğrafı (Google Earth) .....	55
Şekil 3.1. <i>M. luteus</i> gram boyama (x100) .....	70
Şekil 3.2. <i>M. luteus</i> pigmentasyonu .....	70
Şekil 3.3. <i>M. luteus</i> Sr içermeyen ortamdaki elektron mikroskop görüntüsü .....	70
Şekil 3.4. <i>M. luteus</i> Sr içeren ortamdaki elektron mikroskop görüntüsü .....	70
Şekil 3.5. <i>M. luteus</i> Sr021 suşunun Sr içeren ve Sr içermeyen ortamdaki üreme eğrisi .....	71
Şekil 3.6. <i>M. luteus</i> Sr111 suşunun Sr içeren ve Sr içermeyen ortamdaki üreme eğrisi .....	72
Şekil 3.7. Sr dirençli suşların Kromozomal DNA Analizi .....	73
Şekil 3.8. <i>M. luteus</i> için değişik sıcaklıklardaki PZR amplifikasyonu .....	74
Şekil 3.9. <i>M. luteus</i> için değişik tuz konsantrasyonlarındaki PZR optimizasyonu ....	74
Şekil 3.10. <i>Micrococcus luteus</i> 'un soy ağacı .....	77
Şekil 3.11 <i>M. luteus</i> 'un FAME analizi sonucu dendogramı .....	80
Şekil 3.12. <i>M. luteus</i> 'un FAME profili .....	81
Şekil 3.13. <i>M. luteus</i> Sr021 suşunun plazmit DNA analizi .....	85
Şekil 3.14. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	85
Şekil 3.15. <i>M. luteus</i> Sr111 suşunun plazmit DNA Analizi .....	86

<b>Şekil 3.16.</b> Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	87
<b>Şekil 3.17.</b> Eliminasyon öncesi (24 saat) <i>M. luteus</i> .....	88
<b>Şekil 3.18.</b> Eliminasyon öncesi (72 saat) <i>M. luteus</i> .....	88
<b>Şekil 3.19.</b> Eliminasyon sonrası (24 saat) <i>M. luteus</i> .....	88
<b>Şekil 3.20.</b> Eliminasyon sonrası (72 saat) <i>M. luteus</i> .....	88
<b>Şekil 3.21.</b> <i>M.luteus</i> Sr021 suşunun total protein profili .....	89
<b>Şekil 3.22.</b> Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	89
<b>Şekil 3.23.</b> <i>M.luteus</i> Sr111 suşunun total protein profili .....	90
<b>Şekil 3.24.</b> Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi .....	91

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Sularda kirletici etki yapan unsurlar .....	2
Çizelge 1.2. Ağır metallerin vücuttaki sistem ve organlar üzerindeki etkileri .....	6
Çizelge 1.3. Ağır metallerin kullanıldıkları ve atıldıkları endüstriler .....	9
Çizelge 1.4. Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler .....	11
Çizelge 1.5. Antibiyotik direnç mekanizması .....	18
Çizelge 1.6. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar	27
Çizelge 2.1. Antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları .....	44
Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı .....	49
Çizelge 2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları .....	50
Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması .....	50
Çizelge 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması .....	50
Çizelge 2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları .....	54
Çizelge 2.7. PCR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar .....	58
Çizelge 2.8. PZR amplifikasyon koşulları .....	59
Çizelge 2.9. Gaz kromatografisi genel çalışma prensibi .....	62
Çizelge 3.1. Stronsiyum dirençli suşların bölgelere göre yayılımı .....	68
Çizelge 3.2. Stronsiyum dirençli suşların biyokimyasal özellikleri .....	69
Çizelge 3.3. <i>M. luteus</i> Sr021 suşunun sekans analiz sonuçları .....	75
Çizelge 3.4. <i>M. luteus</i> Sr111 suşunun sekans analiz sonuçları .....	76
Çizelge 3.5. 16S rDNA dizileri kullanılarak gerçekleştirilen distance matrisi .....	78
Çizelge 3.6. Stronsiyuma dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profilleri .....	82
Çizelge 3.7. Stronsiyum dirençli suşların çoklu antibiyotik dirençlilik profilleri .....	83



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

Sr	Stronsiyum
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
As	Arsenik
Be	Berilyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mo	Molibden
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Pb	Kurşun
Sb	Kalay
Se	Selenyum
Sn	Antimon
Ti	Titanyum
Tl	Talyum
V	Vanadyum
Zn	Çinko
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş Nitrat
SrCl <sub>2</sub>	Stronsiyum Klorür
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür

## KISALTMALAR DİZİNİ

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Akb	Atomik kütle birimi
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
EtBr	Etidyum Bromür
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat

## 1. GİRİŞ

İnsan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerin başında çevre sorunları gelmekte ve bu sorunlar her geçen gün gittikçe büyüyen boyutlarda karşımıza çıkmaktadır. 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 [1-3]. Günümüzde ağır metal içeren endüstriyel atıkların gelişi güzel ve kontrolsüz olarak çevreye salınımı önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Ağır metaller endüstriyel atık sularında bulunan önemli toksik maddelerdir. Atık sularında bulunan ağır metaller canlılar için yüksek toksik etkiye sahiptir [4]. Sanayi kuruluşlarında bulunan atık su arıtım tesislerinin yetersiz olması veya hiç olmaması sorunun en büyük kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmıştır [5]. İnsan aktiviteleri sonucu meydana gelen aşırı miktardaki organik ve inorganik bileşikler her yıl çevreye bırakılmaktadır. Bunların bir kısmı bilinçli olarak bir takım düzenlemelerle, bir kısmı ise kaza sonucuyla çevreye verilmektedir [4, 5]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sularında kirletici etki yapabilecek unsurlar; bakteriler, virüsler ve diğer hastalık yapıcı canlılar; organik maddelerden meydana gelen kirlenme; yapay organik kimyasal maddeler; yağlar ve benzeri maddeler; sentetik deterjanlar; zirai mücadele ilaçları; yapay ve doğal tarımsal gübreler; anorganik tuzlar; radyoaktivite; atık ısı; endüstri atıklarıdır [6]. Sularında kirletici etki yapan unsurlar Çizelge 1.1'de verilmiştir.

<b>Kirleticiler</b>	<b>Doğal girdiler</b>	<b>İnsan aktiviteleri sonucu girdiler</b>
<b>Ağır metaller</b>	Nehirlerle taşınan (kayaların erozyonu), volkanik aktiviteler ve organik maddenin parçalanması	Endüstriyel ve evsel atıklar, yüzeysel sular
<b>Hidrokarbonlar</b>	Ham petrol ve doğal gaz sızıntıları, nehirlerle taşınım, volkanlar, sudaki bakteri ve diğer organizma faaliyetleri	Gemicilik ve sondaj aktiviteleri, atmosferik girdiler, evsel ve endüstriyel atık sular, yüzeysel sular
<b>Nutrientler</b>	Nehirlerle taşınım, biyolojik aktivite, upwelling, dip sedimentleri	Endüstriyel ve evsel deşarjlar, zirai atıklar
<b>Radyoaktif elementler</b>	Nehirlerle taşınım (radyoaktif element içeren kayalar), volkanik aktiviteler, atmosferik etkileşim	Nükleer santraller, nükleer silah denemeleri, endüstriyel, tıbbi ve evsel deşarjlar
<b>Partikül madde</b>	Nehirle taşınım, biyolojik aktivite, dip sedimentlerinin karışımı, atmosfer, bulanıklık ve akıntılar	Madencilik, sondaj çalışmaları, evsel ve endüstriyel deşarj

**Çizelge 1.1.** Sularda kirletici etki yapan unsurlar [7]

Atık sularda bulunan metaller kimyasal çöktürme, iyon değiştirme, koagülasyon, membran ile ayırma gibi yöntemlerle arıtılabilmektedir [8, 9]. Ancak bu yöntemler hem pahalı hem de ikincil çevre sorunlarına yol açabilecek yöntemlerdir. Bu nedenle son yıllarda alternatif biyolojik arıtma yöntemlerinin araştırılması çalışmaları hız kazanmıştır [10, 11].

## **1.1. Kaynak Özetleri**

### **1.1.1. Çevre Kirliliği**

Günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesi ile insanoğlu daha iyi yaşam koşullarına kavuşmuş ancak bu gelişimle birlikte daha önceden bilinmeyen yepyeni sorunlar ortaya çıkmıştır. Çevre sorunları geniş alan ve toplulukları etkilemesi nedeniyle oldukça önemlidir. Çevre kirliliğini arttıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında, atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. Canlıların yaşamını zorlaştıracak, ekosistemin dengesini bozacak ve kullanım amacına uygun olmayan sulara kirlenmiş veya kirlenmiş su denilir. Etkili bir arıtım yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz ve okyanus gibi alıcı ortamlara deşarj edilmesi, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemler ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır [12].

### **1.1.2. Endüstriyel Kirlilik**

Canlı hayatının devamını sağlamada temel unsur olan su, doğal kaynakların en önemlilerinden birisidir. Suyun kalitesinin ve ortamında doğal dengesinin bozulması su kirliliği olarak kabul edilmektedir. Başlıca kullanım yerleri tarım ve endüstri alanlarıyla evsel gereksinimler olan suyun, potansiyel kullanım kalitesi belirlemektedir. Evlerde kullanılan su, sağlığa zararlı maddeleri, hastalık yapan ajanları ve ağır metal gibi maddeleri içermemeli, tadı ve kokusu güzel olmalı, tesisatlar ve ev aletlerine zarar vermeyecek nitelikte olmalıdır. Endüstri ve tarımsal alanlarda da kullanılan suyun niteliği de amaca göre farklılıklar göstermektedir [13].

Gelişen medeniyet günümüzde su kullanımını artırmıştır. Artan su ihtiyacı su kaynaklarının sınırsız kullanımı ve atık suların problem olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur. Birçok az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde atık sular temizleme işlemine tabi tutulmadan akarsulara boşaltılmaktadır. Bu durum akarsularda kirliliğin boyutlarını kontrol edilemez seviyeye çıkardığı gibi akarsulardan yeterince faydalanmayı da sınırlandırmaktadır [14].

Suların biyolojik kirlenmesinde, yüksek oranda kirletici olan çimento üretim tesisleri, demir çelik sanayi tesisleri, termik santraller, cam üretim tesisleri, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, mezbahane, mandıra, şeker fabrikaları gibi gıda sanayilerinin de önemli yeri vardır [14]. Su kirliliğine neden olan etmenler genel olarak evsel ve endüstriyel kökenli atık sular şeklinde sınıflandırılabilirse de, su kirlenmesi çok daha karmaşık bir karaktere sahiptir. Evsel kökenli atık suları; mutfak, banyo ve diğer temizlik amaçlı kullanılan sular ile kanalizasyon suları oluştururlar. Kanalizasyon atıksuları içerisindeki patojen mikroorganizmalarla akarsular büyük oranda kirlenmektedir [15, 16]. Endüstriyel aktiviteler sonucu oluşan ve hiçbir ekonomik değeri olmayan organik ve inorganik zehirli madde atıklarının meydana getirdiği su kirliliğine endüstriyel kirlilik denilmektedir [17].

### **1.1.3. Ağır Metaller ve Toksik Etkileri**

Ağır metal tanımı, fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Hg ve Zn olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar [5]. 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 [18, 19]. Ağır metaller, endüstriyel faaliyetler sonrasında oluşan atık sularında, çöp sızıntı sularında ve maden sahalarından yağmur nedeni ile sızan sularda bulunur. Bu sular göl, nehir, yeraltı suları gibi alıcı ortamlara karışır ve sedimentlerde birikir. Dolayısıyla deşarj noktasından kilometrelerce uzakta bile kirlilik değerlerini kaybetmeden korurlar. Metalik kirlilik, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle parçalanamamaktadır. Ancak metal bileşikleri buldukları ortamlarda diğer metal bileşiklerine dönüşebilmektedirler. Bu dönüşme esnasında ise, bazen bir metalin

zehirli ya da suda çözünen bileşiği de ortaya çıkabilmektedir. Atık suda bulunan ağır metallerin önemli bir miktarı arıtma çamurlarında bulunurlar. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ve denizlere ulaşarak bu bölgelerde kalırlar. Buralardan ağır metaller tekrar mobilize olarak içme sularına ve besin zincirine ulaşabilirler. Besin zincirine ulaşan ağır metaller kimyasal veya biyolojik olarak bünyeden atılamazlar ve bünyede birikirler [5, 20].

Ağır metaller, doğal sularda eser miktarda bulunurken insan faaliyetleri sonucu özellikle endüstriyel atık suların içme sularına karışması veya ağır metalle kirlenmiş partiküllerin atmosfere oradan toprak ve suya geçmesiyle sulardaki konsantrasyonları artmaktadır. Ağır metaller beslenme zinciri ile üst seviyelere doğru birikirler [21, 22].

Metaller, mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedeniyle toksiktir. Bu metaller, önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki yaparlar. Çevrede çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler [23, 24].

İnsanlar ağır metalleri su, hava ve yiyecek zinciri yoluyla alırlar. Özellikle toksik organik atıkların metallerle birleşerek veya başka bileşiklere dönüşerek daha toksik hale geçmeleri önemli sorunlar yaratmaktadır. Metallerin toksik etkileri; kimyasalın özelliklerine, organizmaya giriş yollarına, alıcı organizmanın yaş ve gelişim durumuna, organizmaya giren miktarına, süresine bağlı olarak değişmektedir. Metal toksisitesi ile ilgili iki mekanizma mevcuttur. Birincisi, enzimin aktif bölgesinde yararlı olan metal, toksik metal ile yer değiştirir. İkincisi, toksik metal moleküle bağlanır ve metalik kationun değişmesi enzimin aktivitesini değiştirir [25-27]. Ağır metaller, zihinsel, nörolojik ve hormonal faaliyetleri etkilemektedir; dolayısıyla insan davranışları üzerinde olumsuz etki yaratır. Ağır metallerin çalışmasını etkilediği sistemler, kan ve dolaşım sistemi, toksin atma sistemleri, hormonal sistem, enerji üretim sistemleri, enzimler, mide, bağışıklık, sinir ve üretim sistemleri ve boşaltım

sistemidir. Ağır metaller ayrıca, alerjik reaksiyonlara, genlerin değişime uğramasına, zararlı bakterilerin yanı sıra faydalı bakterilerin de ölümüne ve doku hasarına neden olur. Ağır metallerin etkili olduğu sistemler ve zararları Çizelge 1.2’de gösterilmiştir [20].

**Çizelge 1.2.** Ağır metallerin vücuttaki sistem ve organlar üzerindeki etkileri [20].

Ağır Metaller	Sistem/Organ	Ağır Metal Etkisi
Hg	Merkezi sinir sistemi	Beyinde tahribat
Pb		Nörolojik fonksiyonların azalması
Cd	Böbrek	Glomerular tahribat
Hg, As	Üretim sistemleri	Çocuk düşürme
Pb	Kan dolaşımı	Kan hücresi üretimi azalması
Cd		Hafif anemi (kan eksikliği)
As	Solunum sistemi	Anemi
Cd		Anfizem
As		Hücre aralarındaki lifli bağ dokunun artması
Hg		Bronjit etkileri
Se		Solunum yolları iltihabı
Zn		Akut zehirlenmeleri
Cu		
Hg, Cu	Beyin	Deformasyon
As	Karaciğer	Siroz
Cd	Akciğer	Kanser
As	Cilt	Kanser
Cd	İskelet	Osteomoloz
Se		Dışlerde çürüme
Zn		Adele, eklem ağrıları
Cd, As	Kromozom	Kromozomal bozukluk

Değişik yollardan canlı bünyesine alınan ağır metaller her organ ve dokuda farklı düzeyde birikirler. Canlı bünyesinde çeşitli metabolik yollara katıldıktan sonra vücut dışına atılabilen metallere fizyolojik öneme sahip olanlar depolanır. Eğer bunlar toksik metallere biri ise, enzimlerin yapısını bozabilmektedir [28].

#### 1.1.4. Stronsiyum’un Fonksiyonları

Stronsiyum (Sr), periyodik tablonun ikinci grubunda yer alan toprak alkali bir metaldir. Bu grup içerisinde kalsiyum ile baryum arasında yer alır. Atom numarası 38 ve atom ağırlığı 87.62 akb’dir. İlk olarak 1790 yılında Adair Crawford tarafından



strontianit minerali keşfedilmiştir. İskoç şehri olan Strontian'da keşfedildiği için bu adı almıştır. 1798 yılında ise Martin Heinrich Klaproth tarafından Sr elementi bulunmuştur. Sr, yer kabuğunda %0.04 ortalama konsantrasyon ile en çok bulunan elementler arasında 15. sırada bulunur. Sr gümüş beyazı rengindedir. Ancak oksitli yapının oluşması ile rengi çok çabuk sarıya döner. Sr genelde magnezyum ve kalsiyumdan daha reaktif ancak baryumdan daha az reaktiftir. Sr yüksek kimyasal reaktiviteye sahip olduğu için birçok element ile reaksiyon vermektedir. Havada oksitlendiği için kerosen içinde saklanmalıdır. Sr; su, oksijen, azot, flor ve kükürt ile reaksiyona girerek çeşitli bileşikler oluşturur. Bu bileşiklerinde +2 değerlikli olup güçlü bir indirgendir. Sr metali asitlerle kuvvetli reaksiyona girer ve hidrojen çıkmasına sebep olur. Nitrik asitle olan reaksiyonu çok hızlıdır ve azot oksitler oluşur. Seyreltik sülfürik asitle olan reaksiyonu çözünmeyen sülfatların oluşumundan dolayı çok yavaştır. Stronsiyumun çözünebilir tuzları asetat, klorür, bromür, iyodür, nitrat, nitrit, permanganat, sülfat, klorat, bromat, perklorattan oluşur [29]. Deniz suyunda ise %0.0008 konsantrasyon ile 10. sıradadır. Stronsiyumun doğada bulunan ve ekonomik öneme sahip olan mineralleri celestite ( $\text{SrSO}_4$ , stronsiyum sülfat) ve strontianite ( $\text{SrCO}_3$ , stronsiyum karbonat) dir. Agonite, calcite, anhydrite stronsiyum içeren başlıca minerallerdir [30, 31]. Genelde stronsiyum tüketimi stronsiyum karbonat şeklinde olmaktadır [32].

#### 1.1.5. Stronsiyum'un Çevresel Etkileri

Sr doğal çevrede toprakta bulunan bir elementtir.  $^{90}\text{Sr}$  izotopu radyoaktif özelliğe sahiptir ve canlılar için oldukça tehlikelidir. Khan ve arkadaşları [33], sanayi kuruluşlarının bulunduğu alanlardan aldıkları su örneklerinde stronsiyum konsantrasyonunun yüksek olduğunu göstermişlerdir. Özer ve arkadaşları [34], stronsiyum iyonlarının, bazı sanayi kuruluşlarının atıklarının neden olduğu belirtmiş ve bu alanlarda, büyük ölçekli sanayileşmenin olumsuz etkilerinin su kalitesinin bozulmasında belirgin olarak rol aldığı göstermişlerdir. İnsanlar sıklıkla stronsiyum tozları ile kontamine olurlar. Bunun nedeni stronsiyumun solunum havasında, toprakta, içme suyu ve besin maddelerinde bulunmasıdır. Hububat, sebze ve süt ürünlerinde yüksek konsantrasyondadır [35]. Başlıca alım yolu su ve yiyeceklerdir.

Stronsiyum kimyasal reaksiyonlar sonucunda çözünmeyen formdan çözünebilir hale geçer. Çözünebilir form da çözünemez forma oranla insan sağlığını daha fazla tehdit eder. Çözünebilir formdaki Sr içme suyunu kirletir.  $^{90}\text{Sr}$  ile karşılaşıldığında bunun %70-80'i vücudu geçer. Kemiklerde %20-30'u depo edilirken %1 oranı ise kan, ekstraselüler sıvı, yumuşak doku ve kemik yüzeyinde toplanır. Stronsiyum bulunduğu ortamda kalabilir, dokuyu bozabilir veya atılabilir. İnsan vücudu stronsiyum ve kalsiyumu birbirinden ayırt edemeyebilir ve kalsiyum yerine stronsiyum absorbe edilebilir. Ayrıca  $^{90}\text{Sr}$ ; kalsiyum ile kimyasal benzerlik gösterdiğinden kemik ve dişte toplanma özelliğindedir. Stronsiyum'un stabil formları sağlık problemi oluşturmaz. Eğer kontrolsüz dozlarda uygulanırsa kemikte malignite ve lösemi gelişimine neden olabilir. Bu risk  $^{90}\text{Sr}$  ile artar. Stronsiyumun vücuttaki oranı idrar analizi ile saptanabilir [36, 37]. Sr iyonları, hücre duvarındaki fonksiyonel gruplara (sülfidril, hidroksil, karboksil, amid, amin, karbonil, thioeter, fosfat grupları) bağlanmaktadır. Hücre duvarına bağlanan katyon miktarı arttıkça doygunluğa ulaşılmaktadır ve hücre duvarında iyonlar çökmektedir [38].

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

Atık sularında bulunabilecek ağır metaller, organik bileşikler gibi biyolojik olarak bozundurulamazlar. Bazı ağır metallerin yaygın kullanımları onların atık su içerisinde istenmeyen derişimlerde olmasına yol açar. Çeşitli endüstrilerin atık sularında bünyesinde yüksek miktarda bulunan bu ağır metaller “öncelikli kirleticiler” listelerinde yer almaktadır. Özellikle kaplama, madencilik ve metal alaşımı endüstrileri atık ve atık sularında ağır metal konsantrasyonları yüksektir [39]. Çeşitli endüstrilerde kullanılan ve atık sularında rastlanılan metaller Çizelge 1.3'de verilmiştir.

**Çizelge 1.3.** Ağır metallerin kullanıldıkları ve atıldıkları endüstriler [31]

Endüstri	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Sn	Ti	Tl	V	Zn
Metal alaşımı	✓		✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓		✓			✓
Bateri ve pil üretimi		✓						✓	✓		✓	✓		✓					✓
Tarım	✓							✓	✓						✓	✓			
Seramik ve cam üretimi	✓			✓							✓	✓		✓			✓		
Kimya, ilaç, Dişçilik	✓		✓		✓	✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓			✓	✓
Kaplama			✓		✓	✓				✓		✓			✓				✓
Elektronik cihaz üretimi		✓						✓					✓						
Gübre	✓		✓		✓			✓	✓		✓	✓							✓
Fosil yakıt yakımı	✓		✓					✓				✓	✓	✓					
Madencilik	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
Boya ve pigment	✓		✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓		✓			✓
Petrol rafinasyonu	✓			✓	✓	✓					✓	✓						✓	✓
Makine						✓	✓					✓							
Plastik üretimi			✓									✓							
Kâğıt üretimi					✓	✓		✓				✓							
Tekstil	✓				✓	✓													

✓ : kullanıldığı yerler

### 1.1.6.1. Stronsiyum'un Kullanım Alanları

Sr, nükleer güç testlerinde, renkli televizyon için görüntü tüplerinin ve demir esaslı mıknatısların yapımında, çinkonun saflaştırılmasında, elektrik endüstrisinde, şeker fabrikalarında kullanılmaktadır. Nükleer pillerin ve fosforlu boyaların yapımında da bu elementten faydalanılmaktadır [40]. Deniz taşımacılığı, hava istasyonları, uzay araçları, kontrollü miktarları göz hastalıkları ve kemik kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Sr titinatın özellikle refraktif indeksi yüksektir ve optik yayılımı elmadan fazladır ve bu yüzden optik uygulamalarda kullanılır [41]. Ayrıca alev

verdiği kırmızı renk dolayısıyla havai fişekler ve sinyal maddeleri üretiminde; cam, boya, ilaç sanayinde; çinko elektrolizinde; kuru fırın ve uçak motoru gibi makinelerde kullanılan mil yataklarını yağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Diğer bir kullanım alanı ise ferritlerdir. Ferritler seramik olarak otomotiv sanayinde, demir cevheri seperatörlerinde, fotokopi makinelerinde ve özel alaşımlarda kullanılmaktadır [32].

### **1.1.7. Metallerin Uzaklaştırılma Yöntemleri**

#### **1.1.7.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

Ağır metal içeren atık suların arıtımı, genelde işletmenin kapasitesine, atık su debisi ve karakteristiklerine, prosese, arıtma tesisine, kullanılan kimyasallara bağlı olmakla birlikte, temeli; kimyasal olarak metal iyonunun çökebilen bir şekline dönüştürülmesi ilkesine dayanır [42]. Ağır metallerin sulu ortamlardan giderilmesinde kullanılan geleneksel yöntemler; kimyasal çöktürme, iyon değişimi, aktif karbon ile adsorpsiyon, ters osmoz, filtrasyon ve membran teknolojileri şeklinde sıralanabilir [43, 44]. 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 [43, 45]. Atık su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler, avantaj ve dezavantajlar Çizelge 1.4'te verilmiştir.

**Çizelge 1.4.** Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler [46, 47]

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

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

#### 1.1.7.1.1. İndirme-Çökeltme Yöntemi

Bu yöntemle yüksek değerlikli metal, çökebilen bir şekline indirgendiikten sonra, nötralize edilir, reaktifin aşırısı metali çökeltir. Çöktürmede karıştırma, yumaklaşma (flokülasyon), koyulaştırma ve süzme işlemleri yapılır. Bu yöntem özellikle kromlu atıkların arıtımında kullanılır [48].

#### 1.1.7.1.2. Yükseltgeme-Çökeltme Yöntemi

Bu yöntemde indirgenmiş metal, kararlı, yükseltgenmiş ve çözünmeyen şekillerine dönüştürülür. Bu tür bir atık arıtma prosesinde, havalandırma, çökeltme, süzme

olmak üzere ardışık üç basamak vardır. Kolayca yükseltgenmeyen metaller için söz konusu prosese kimyasal yükseltgeme basamağını da eklemek gerekir. Bu yöntem özellikle Fe ve Mn içeren atıkların arıtımında kullanılır [48].

#### **1.1.7.1.3. Nötralizasyon-Çöktürme Yöntemi**

$Cr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  gibi ağır metal iyonları ortama kireç, soda ve/veya sodyum hidroksit katılarak nötralize edilir, hidroksitleri şeklinde çöktürülerek atık sudan uzaklaştırılır [48].

#### **1.1.7.1.4. İyon Değişimi**

Bu süreçte, seyreltik çözeltilerinden metal iyonları değişim reçinesi üzerine elektrostatik kuvvetleri tarafından tutulan iyonları ile değiştirilir. Dezavantajları ise yüksek maliyet ve belli iyonların kısmen kaldırılmasıdır [48-51].

#### **1.1.7.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri**

Atık metallerin arıtılmaları için biyolojik arıtma teknikleri en çok başvurulan yöntemlerdir. Başta sıvı atıkların arıtılması için kullanılan biyolojik sistemler olmak üzere katı atıkların kompost yapılarak yok edilmesinde, kömürün ve diğer fosil yakıtların içindeki kükürtün yakılmadan önce azaltılarak hava kirliliğinin önlenmesi gibi çevre kirlenmesini önleyici birçok uygulamada mikroorganizmalardan çok geniş oranda yararlanılmaktadır [48].

#### **1.1.7.2.1. Biyoremediasyon**

Biyoremediasyon, mikroorganizmalar kullanılarak zararlı maddeleri toksik olmayan bileşiklere dönüştüren bir proses olup, kimyasal sıvıların ve tehlikeli atıkların

artılması için kullanılan ümit verici tekniklerden biridir [52].

Bakteriler zararlı atıkları, zararsız yan ürünlere dönüştürdükten sonra ya ölürler ya da sayıları normal popülasyon düzeyine ulaşır. Böylece ekolojik denge bozulmaz. Ayrıca, toprakta bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ile toprak rehabilitasyonu için en uygun kompozisyon oluşturulabilmektedir [52]. Bazı durumlarda atıkları işlemede kullanılan mikroorganizmaların yan ürünleri yararlı ürünler oldukları için geri kazanım sağlayabilmektedir. Anaerobik arıtma teknolojisi buna örnek olarak verilebilir. Atıklarında organik madde yoğunluğu fazla olan fabrikalarda uygulanan bu teknolojiye, uygun biyokimyasal parametrelerin sağlandığı reaktörler kullanılır. Bu reaktörlere anaerobik koşullarda yaşayan metan bakterileri, organik atıkları parçalayarak kirliliği giderirken bir yandan da metan gazı üretirler. Sonra oluşan bu metandan elektrik üretilerek işletmeye ek bir enerji kaynağı sağlanır. Özellikle gıda, kâğıt vb. endüstriler bu yöntem için çok uygundur [52].

Biyoremediasyonda rol oynayan mikroorganizmalar funguslar, mayalar ve bakterilerdir [53, 54]. Bir mikroorganizmanın canlılığını sürdürebilmesi için besine ve enerjiye ihtiyacı vardır. Doğada mikroorganizmalar toprakta çok çeşitli organik maddeleri parçalayarak kendileri için gerekli olan besin ve enerji kaynağını sağlarlar. Bu besin maddelerinin başında petrol ve türevi maddeler, pestisitler, solvent maddeler vb. gelmektedir. Ayrıca metilen, klorit ve kükürt gibi kimyasal maddeler de besin ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [52]. Biyoremediasyon olayında kontaminant maddeleri parçalayabilen ve onları toksik olmayan yan ürünlere dönüştüren mikroorganizmaların büyümeleri teşvik edilerek mikroorganizmaların doğal olarak bu prosesinden yararlanır. Yani biyoremediasyon uygulaması atıkların döküldüğü bölgeye besin aktarımı yapılarak, toprağın bakteri kompozisyonuna göre, doğal olarak toprakta bulunan bakterilerin etkin duruma geçirilmesi ya da toprağa yeni bakteriler aktarılması şeklinde olabilir. Mikroorganizmalar kontaminantlara maruz kaldığında artan bir yetenek ile bu maddeleri degrades etme yönünde bir gelişme gösterirler. Genellikle bu toksik maddeyi parçalayarak enerji elde eden strainler ön plana çıkmaktadır [52].

Biyoremediasyonun avantajları:

1. Biyoremediasyon ekolojik olarak güvenli doğal bir prosestir.
2. Kontaminantların bir besin kaynağı olarak mevcut olması durumunda var olan mikroorganizmalar artmaktadırlar. Kontaminantlar azaldığında popülasyon kendiliğinden azalmaktadır.
3. Biyolojik parçalanmadan çıkan atıklar genellikle karbondioksit, su, yağ asitleri gibi zararsız bileşiklerdir. Orijinal pollütanttan daha toksik bir ürün oluşturma olasılığı çok azdır.
4. Biyoremediasyonda kontaminantlar çevresel bir ortamdan bir diğerine transfer edilmeden hedef kimyasal maddeler tamamen ortadan kaldırılmaktadır.
5. Biyoremediasyon tehlikeli atıkların bertaraf edilmesi için sıklıkla kullanılan teknolojilere göre daha ucuzdur. Örneğin, biyoremediasyon ile bir bölgenin temizlenme maliyeti 45–50 milyon \$ iken atıkların ortadan kaldırılması için bir fırın inşa etme maliyeti 140 milyon \$'a kadar çıkmaktadır. Ayrıca atıkların taşınması da pek tercih edilmez [52].

Biyoremediasyonun deavantajları ise:

1. Sahip olduğu bazı sınırlamalar biyoremediasyonun bir temizleme teknolojisi olarak yaygın kullanımını engeller.
2. Biyoremediasyona başlamadan önce çok iyi bir araştırma yapılması gerekmektedir ve kompleks kontaminant karışımı ve bölgeler için uygun biyoremediasyon teknolojisi mühendisine gerek duyulmaktadır. Toprakta mikroorganizmaların izolasyonu için mikrobiyologlara, parçalanma yol izinin belirlenmesi için ise biyokimyacılara gerek duyulmaktadır,
3. Biyoremediasyonla yapılan temizleme işlemi yakma veya toprağın kazılıp atılması ile karşılaştırıldığında uzun bir zaman almaktadır,
4. Bazı toksik yan ürünlerin oluşumuna karşı önceden tedbir almak gereklidir [52].

Yerinde (*in situ*) biyoremediasyon kirlenmiş sahaların az maliyetle temizlenmesinde, kimyasal maddeleri parçalamak için doğal mikroorganizmaların kullanıldığı üstün nitelikli bir metottur. Bu teknoloji, maliyetinin düşük olması, kirliliğin kazılmasını ve taşınmasını gerektirmeden yerinde arıtım sağlaması açısından daha



caziptir [55]. Buna karşın yerinde biyoremediasyon bazı dezavantajlara sahiptir. Diğer ıslah metotlarıyla karşılaştırıldığında bu metot daha fazla zaman alabilir. Kontrol edilemeyen çevresel şartlardaki değişikliklere direkt maruz kalmaları nedeniyle mikrobiyal aktivitede mevsimsel azalmalar olabilir. Mikroorganizmalar hücre gelişimleri için daha fazla enerji ve besinlere ihtiyaç duyabilirler. Bu nedenle mevcut atık maddeye ilave besin eklenebilir [56]. Yerinde yapılmayan (*ex situ*) biyoremediasyon kirliliğin doğal ortamından kazılarak alınmasını gerektirir. Bunun amacı mikrobiyal parçalamayı kolaylaştırmaktır. Kirlenmiş sahadan uzakta gerçekleştirilen *ex situ* biyoremediasyon metotları, yerinde yapılan metotlara göre daha hızlıdır. Geniş alana yayılmış kirleticiler için uygulanabilir fakat daha pahalı bir yöntemdir [56].

Biyolojik artım yöntemleri biyosorpsiyon, biyoakümülyasyon, biyodegradasyon ve fitoremediasyon olmak üzere 4 gruba toplayabiliriz [49, 57, 58].

#### **1.1.7.2.1.1. Biyosorpsiyon**

Bir çözeltilerden mikrobiyal biyokütle ile metalin geri kazanımı biyosorpsiyon olarak adlandırılır [59]. Biyosorpsiyon kinetiği iki basamakta incelenir. Birinci basamak mikroorganizma ile metal arasında çok kısa sürede dengenin kurulduğu fiziksel adsorpsiyon (pasif adsorpsiyon) veya iyon değişimidir. İkinci basamak ise metabolik aktiviteye bağlı olarak oluşan kimyasal adsorpsiyondur.

Biyosorpsiyon ile metallerin ayrılması hücre duvarı bileşenleri ve metal arasındaki etkileşimin sonucudur. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks yaparak adsorplanabilecekleri gibi bazı mikroorganizmalar hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyerek çözeltilerden metal iyonlarını bağlayabilirler [60]. Ayrıca hücre duvarındaki proteinler iyonları bağlamak için fonksiyonel gruplarını ve peptid bağlarını da tercih edebilirler [61].

### **1.1.7.2.1.2. Biyoakümülyasyon**

Biyoakümülyasyon bir kimyasalın belirli bir zamanda canlıdaki konsantrasyonunun çevredeki konsantrasyonuna göre artışıdır. Eğer bir kimyasal bir organizma tarafından hızlı bir şekilde alınıp hızlı bir şekilde depo ediliyorsa, metabolize olması veya hücreden atılması yavaş ise, bu takdirde birikim gerçekleşmektedir. Bu nedenle biyoakümülyasyon son yıllarda pestisitlerin ruhsatlandırılmasında sık kullanılan ve çok önemle üzerinde durulan bir kriter olmaya başlamıştır [62, 63].

Biyoakümülyasyon bir organizmanın büyümesi ve gelişmesi için normal ve gerekli olan bir işlemdir. Biyoakümülyasyon bir kimyasalın çevreden organizma hücresine girmesi ile başlar. Genel olarak kimyasallar yüksek konsantrasyonda buldukları bir ortama doğru hareket etme eğilimindedirler. Bununla beraber birçok 20 faktörün kimyasalın özelliğine göre bu eğilimi arttırıp azalttıı bilinmektedir. Maddenin hücre içine girişı ne kadar hızlı ve hücrede belli yer veya dokulara bağlanabilmesi ne kadar yüksek ise biyoakümülyasyon potansiyeli o kadar yüksektir. Sonuç olarak biyoakümülyasyon; kimyasalın çevredeki konsantrasyonuna, organizmaya giriş miktarına, organizmanın onu hücreden atma hızına bağlıdır [62, 63].

### **1.1.7.2.1.3. Biyodegradasyon**

Biyodegradasyon doğal bir proses olmasına rağmen bazı biyodegrade olabilen organik maddeler doğada parçalanmadan kalmaktadır. Bu durumun en önemli nedeni bir çok çevresel koşulun proses üzerinde etkili olmasıdır [52].

- Kimyasal madde konsantrasyonunun mikroorganizmaya toksik etki yapacak düzeye erişmesi uyum sorununa yol açar,
- Mikrobiyal çeşitlilik biyodegradasyon için elverişsiz veya yetersiz olabilir,
- Çevresel koşulların çok asidik veya bazik olması,
- Besin içeriği yönünden dengelenmemiş maddelerin (petrol ve petrokimyasal atıklar) degradasyonunda azot, fosfor, kükürt vb. iz elementlerin eksikliği,
- Nem durumunun elverişsiz olması,

- Kimyasal atığı enerji kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalar için oksijen ve amonyak gibi elektron akseptörlerinin eksikliği de nedenler arasında yer alır [52].

#### **1.1.7.2.1.4. Fitoremediasyon**

Son on yılda popülaritesi giderek artmakta olan fito-ıslah, toprak ıslahına ait pasif bir teknolojidir. Fitoremediasyon çevredeki kirleticilerin alınmasında ya da onların zararsız hale getirilmesinde yeşil bitkilerin kullanımı olarak tanımlanır [64]. Bitkiler organik kirleticileri bozabilir, parçalayabilir yada metallerde olduğu gibi bünyesine alarak stabilize edebilir [65]. Diğer ıslah teknolojileri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük masraflı, estetik olarak memnun edicidir [66]. Bundan başka fitoremediasyon çevresel açıdan önemli bir sıkıntı yaratmaması sebebiyle avantajlıdır. Çünkü uygulanan yöntem toprak matriksini değiştirmez. Böylece başarılı bir fitoremediasyondan sonra toprak direkt olarak tarımsal amaçlar için kullanılabilir. Toksik ağır metaller ve organik kirleticilerin her ikisi de fitoremediasyonda hedef alınan kirleticilerdir [67].

#### **1.1.8. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları**

Yaklaşık 4 milyar yıl önce hücresel yaşamın başından beri organizmalar ısı, ozmotik stres, radyasyon ve toksik maddeler gibi stres koşullarıyla karşı karşıya kalmıştır. Yaşayan sistemler evrimleri boyunca bu streslere karşı özel taşıma mekanizmaları, metal bağlayıcı proteinler gibi sistemlerden faydalanarak adapte olmuşlardır [68].

Genelde tek veya birçok antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarına karşı direnç oluşumu; plazmit yapılar aracılığı ile meydana gelmektedir. Antibiyotiklere karşı gelişen dirençlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir [69]. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnci genetik olarak ya kromozomal ya da plazmitlerinde kodlanır. Özgül dirençler, bir lokasyonda

ya da diğerinde tipik tarzda genetik temellere sahiptir [70]. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, doğal ve kazanılmış (mutasyonel ve aktarılabılır) direnç olmak üzere iki şekilde mümkündür [71]. Doğal direncin temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya antibiyotığın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması durumu vardır. Bu duruma örnek olarak hücre duvarı olmayan *Mycoplasma*'nın  $\beta$ -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 [72]. 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 ortamdaki 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 [72]. Çizelge 1.5'de antibiyotikler, direnç mekanizması ve direncin genetik temeli gösterilmiştir.

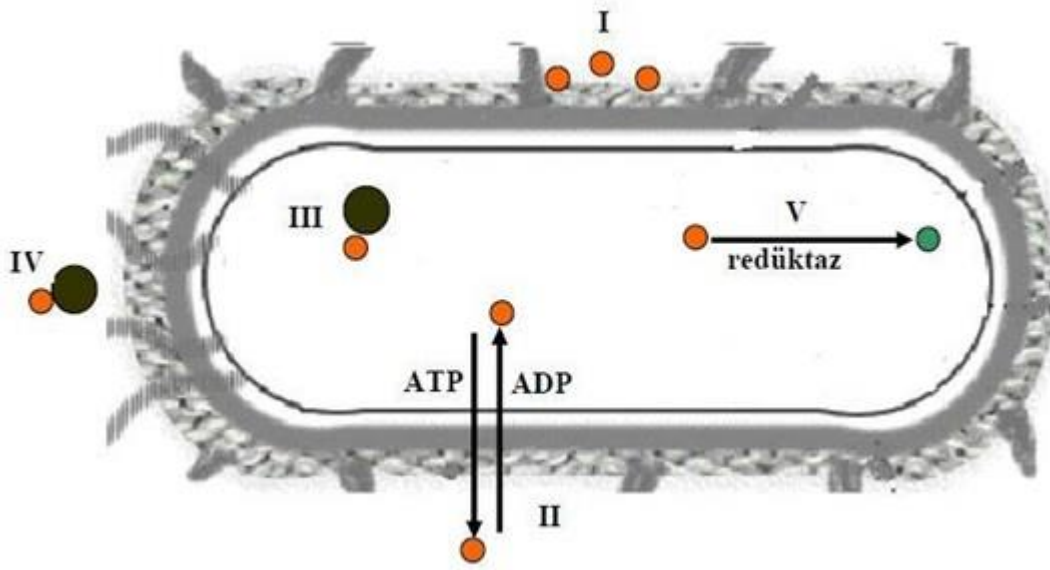
**Çizelge 1.5.** Antibiyotik direnç mekanizması [70]

Direnç Mekanizması	Antibiyotik Örnek	Direncin Genetik Temeli	Mikroorganizmanın Mevcut Olduğu Organizma
Geçirgenliğin azaltılması	Penisilinler	Kromozomal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterik Bakteri
Antibiyotik inaktivasyonu (örneğin penisilaz; metilaz, fosforilaz ve diğer modifiye eder)	Penisilinler	Plazmit ve Kromozomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterik Bakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Kloromfenikol		
	Aminoglikozitler	Plazmit	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hedef bölgenin değiştirilmesi	Eritromisin, Rifamisin, Streptomisin, Norfloksasin	Kromozomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterik Bakteri
Dirençli biyokimyasal yolun geliştirilmesi	Sülfoamidler	Kromozomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterik Bakteri
Hücresinin dışına pompalama	Tetrasiklinler	Plazmit	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Kloromfenikol, Eritromisin	Kromozomal	Enterik Bakteri <i>Staphylococcus sp.</i>

Ağır metal direnci için beş bilinen mekanizma vardır [73].

- I) Geçirgenlik bariyeri ile metallerin dışarıda tutulması,
- II) Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu (efflux),
- III) Metallerin proteine bağlanması yolu ile hücresinde alıkonması,
- IV) Ekstraselüler alıkonma ve
- V) Metallerin daha az toksik formlara dnüşürüldüğü enzimatik detoksifikasyon.

Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemlerinin şematik gösterimi şekil 1.1’de verilmiştir.



**Şekil 1.1.** Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemlerinin şematik gösterimi [73]

#### 1.1.8.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Dışarıda 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 [74, 75].

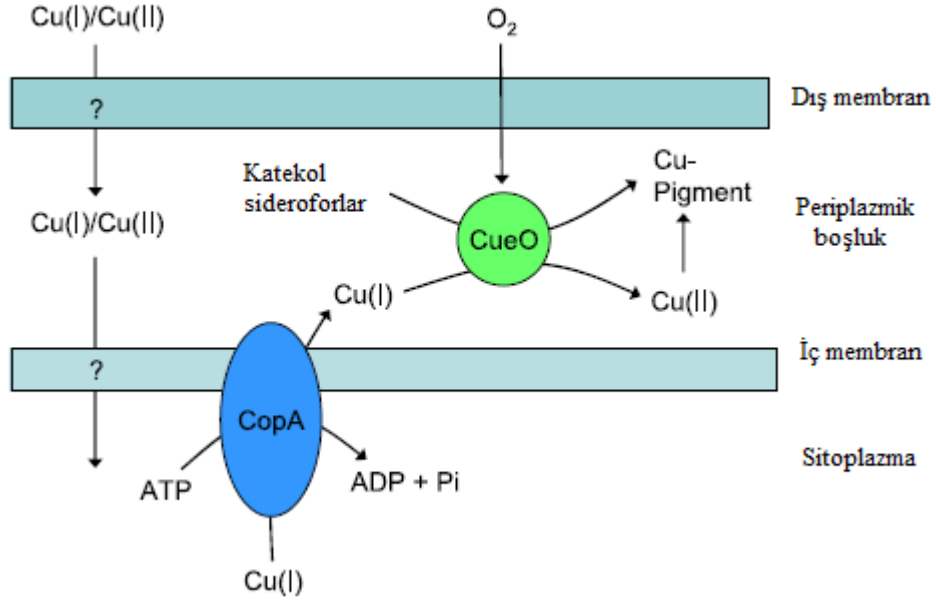
Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri

oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücrenel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E. coli*'de  $Cu^{2+}$  dirençliliğidir. *E. coli*'de bir membran kanal proteini olan Porin Proteinleri'nin üretimi değiştirilerek  $Cu^{2+}$ 'nin hücreye girişi engellenir [76]. Bu sıklıkla tek gen mutasyonu ile açıklanmaktadır. Bu mutasyon sayesinde metal iyonlarına karşı zarın geçirgenliği azalmaktadır [77, 78].

### 1.1.8.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Transportu (Efflux)

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmadır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplâzmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarı atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı ya da ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [51].

Cánovas ve arkadaşları [79] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun gümüş, kadmiyum, çinko ve krom metallerine karşı atım sistemi ile direnç geliştirdiklerini incelemişlerdir. Kadmiyum ve çinko dirençliliklerinin ATPaz'ın katalizlediği atım mekanizması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Metal iyonlarının hücreden dışarı atılımı için proteinlerin rolleri vardır. *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun krom atım sistemi için ChrA proteini, gümüş ve bakır atım sistemi için CusC, CusB, CusA proteinleri, kadmiyum ve çinko ATPaz bağımlı atım sistemi için de CadA2 proteinin sorumlu olduğunu göstermişlerdir. *E. coli*'nin bakır atım mekanizması olan Cus sistemi Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



**Şekil 1.2.** *E. coli*'de CopA bakır atım pompası [80].

Mikroorganizmaların yüksek miktardaki toksik maddelerle başa çıkabilmesi için, pek çok 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 [81]. Kılıç ve Dönmez [82] yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa*, *Micrococcus* ve *Ochrobactrum* türlerinin, ortamda Cr (VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak daha fazla EPS ürettiklerini saptamışlardır. Aquino ve Stuckey [83] ise sisteme Cr (VI) verildikten sonra, EPS miktarında %30'a yakın, protein miktarında %45'e yakın, karbonhidrat miktarında %300'e yakın, DNA miktarında ise %50'ye yakın artış olduğunu belirtmişlerdir.

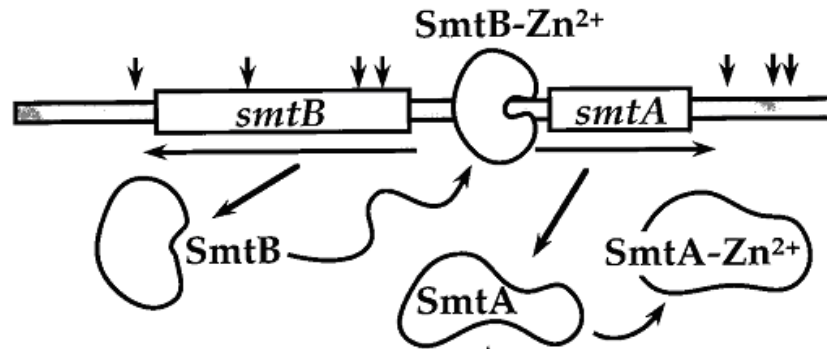
### 1.1.8.3. Metallerin Proteine Bağlanması Yolu ile Hücre İçinde Alınması

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücresel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Genellikle  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metalleri

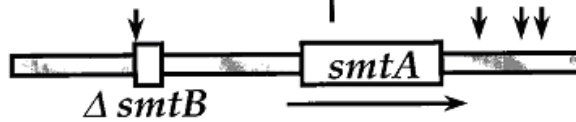
bu yolla biriktirilmektedir. *Synechococcus*'taki metallothionein ve *Pseudomonas*'ın sisteince zengin proteinleri de bu tip birikime örnek oluşturmaktadır. *Synechococcus*'ta  $Zn^{2+}$  metalinin metallothioneine bağlanma sistemi Şekil 1.3'de gösterilmiştir. *Synechococcus* direnç sistemi *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen içermektedir. SmtA proteini,  $Zn^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  gibi metalleri bağlayabilen metallothioneini kodlamaktadır. SmtA, yüksek konsantrasyondaki  $Zn^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  ile indüklenmektedir ve *smt B* gen ürününden repress edilmektedir [77].

SmtB proteini, *smtA* ekspresyonunu ve metallothionein üretimini önleyen transkripsiyonel represör olarak görev yapmaktadır. Sistemdeki metallothionein hayvan metallothioneininden daha fazla sistein içermektedir. SmtA metallothioneindeki sistein amino asitleri toksik kationları tutan bir bariyer gibi görev yapmaktadır. SmtB proteini, DNA bağlanma proteinlerine benzer bir motif içermektedir. Proteinin yapısal analizleri, dört tane  $Zn^{2+}$  bağlanma bölgesinin olduğunu göstermektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*, siyah bakır sülfat çökmesi ile  $Cu^{2+}$ 'nin hücre içinde tutulmasını gerçekleştirmektedir [77].

#### A. İNDÜKSİYON



#### B. DELESYON



Şekil 1.3. *Synechococcus*'ta  $Zn^{2+}$  metalinin metallothioneine bağlanma sistemi [86]



#### 1.1.8.4. Ekstraselüler Alıkonma

Metallerin hücre dışında tutulması, bakterilerde, mayalarda ve funguslarda gösterilmiştir. Mayalarda  $Ni^{2+}$  dirençliliği bu yolla olmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*, büyük miktarda glutasyonu boşaltarak  $Ni^{2+}$  absorpsiyonunu azaltmaktadır. Mayanın taşıdığı metilglioksal direnç geni, metalin yoğun olduğu ortamda ekstraselüler metalglutasyon kompleksleri oluşturma yeteneğindedir. Direnç, toksik metalin bu komplekse bağlanması ve hücre zarından geçememesi ile olmaktadır. Buna benzer bir mekanizma funguslarda  $Cu^{2+}$  direncinde görülmektedir. Bu fungus, metaloksalat kompleksi oluşturmak için oksalat salgılamaktadır. *Citrobacter* de  $Cd^{2+}$  direnci oluşturmak için çözünmeyen kadmiyum fosfat kompleksleri meydana getirmektedir [77].

Metallerin dış zara veya kılıf proteinlerine spesifik olmayan bir şekilde bağlanması da metalin geçirgen zardan içeri alınmaması ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, bakterilerin doğal olarak bulundurdukları ekstraselüler polisakkarit kısım metal iyonlarını biyolojik olarak tutmakta ve onları hücre bileşenleri ile etkileşiminden korumaktadır. Bu polisakkarit kısım metal iyonlarının tutunabileceği bölgeler de oluşturabilmektedir [77, 84]. Ekstraselüler olarak metal direnci gösteren bakterilerden bazıları, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus*'tur. Bu suşlar, koruyucu ekzopolisakkarit kısmı olmayan bakterilere göre iki kat daha fazla metal direnci göstermektedir. Deniz bakterisi *Vibrio alginolyticus*  $Cu^{2+}$  değişiminde  $Cu^{2+}$  bağlayan ekstraselüler proteinler sentezlemektedir. Buradaki mekanizmada metal kelasyonu şeklinde olmaktadır [77].

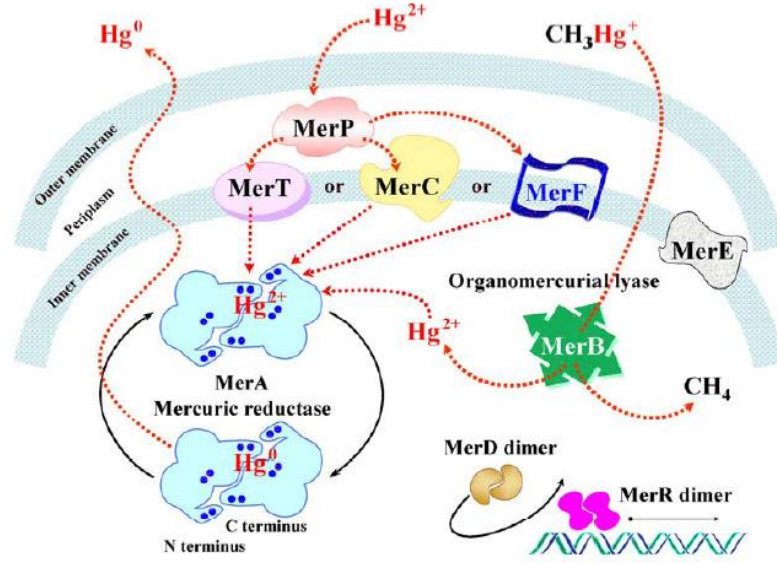
#### 1.1.8.5. Metallerin Daha Az Toksik Formlara Dönüştürüldüğü Enzimatik Detoksifikasyon

Metallerin daha az toksik forma dönüştürülmesi genellikle hücre içinde ve enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu tip direnç mekanizmasına gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerde rastlanmaktadır. Aşağıda bugüne kadar indirgenme mekanizmaları belirlenmiş  $(AsO_4)^{3-}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi metallerin mikroorganizmalarca daha az toksik

forma dönüştürülmeleri açıklanmıştır.

*E. coli* ve *S. aureus*'taki arsenat direnci dirençli hücreler tarafından arsenatın indirgenerek içeri alınmasıyla ilgilidir. Arsenat yapısı bakımından fosfatla (( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup>) oldukça yakından ilgilidir. Metalin toksikliği bir biyoelement olan fosfor metabolizması ile karışmasının sonucudur [79]. Arsenik iyonlarına bakteriyel direnç gösteren *S. aureus*'un plazmitlerinde keşfedilmiştir. Arsenik direnç plazmitleri arsenit, arsenat ve antimon<sup>3+</sup>'a direnç göstermektedir. Arsenik direnci, en çok *Staphylococcal* ve *Rhodococcus* plazmitlerinde yaygındır. Ayrıca gram-negatif bakterilerde de görülmüştür. Başka bir toksik ağır metal olan civa ise bütün ağır metaller arasında en toksik olan olarak bilinmektedir. Civanın mikroorganizmalara yararlı bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Yüksek konsantrasyonda civa, biosidal etki gösterirken, düşük konsantrasyonda bulunması da mutajenik etki göstermektedir [85, 86].

Civaya direnç gösteren bakterilerde *mer* operonu bulunmaktadır. Operon, hem  $\text{Hg}^{2+}$ 'yı detoksifiye etmekte hem de taşımaktadır. Kendi kendini düzenleyebilen operon,  $\text{Hg}^{2+}$  yokluğunda transkripsiyonu azaltan düzenleyici bir protein kodlamaktadır. Aynı zamanda operondaki genler periplazmik bağlanma proteinleri ve membrana bağlı taşıma proteinlerini de kodlamaktadır. Periplazmik bağlanma proteinleri  $\text{Hg}^{2+}$ 'yı biriktirirken taşıma proteinleri bunları detoksifikasyon için sitoplâzmaya götürmektedir [77]. Şekil 1.4'de bakterilerde civa iyonlarına karşı direnç sağlayan enzimatik detoksifikasyon sistemi gösterilmiştir.



**Şekil 1.4.** Bakterilerde civa iyonlarına karşı direnç sağlayan enzimatik detoksifikasyon sistemi [87]

### 1.1.9. Bakteri Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [88]. Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 16S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile moleküler mikrobiyal ekoloji olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [89].

1. Biyokimyasal Yöntemler: Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili geniş bilgi vermektedir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir. Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı oldukça azdır ve bakteriyel çeşitliliğe ait resmin tamamını tespit etmek oldukça zordur. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir. Fakat moleküler ve ekolojik tahminler bu sayının kat kat fazla olduğu görüşündedir [90, 91]. Bununla birlikte, mikroorganizma çeşitliliğinin ve dağılımının belirlenmesinde, moleküler tekniklerin kullanılması kültürden bağımsız ve geniş aralıkta mikroorganizma türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda arıtma sistemlerinde hem arıtma verimini değerlendirmek hem de mikroorganizma gruplarındaki değişimi izleyebilmek için moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır [92].

2. Moleküler Yöntemler: Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rRNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur [93]. Bu özellik organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile ilave istatistikî olarak ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Tüm organizmalarda çok miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu 16S ve 23S rRNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen genlerdir. Bununla birlikte, pek çok mikroorganizmanın 16S rRNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve günden güne genişleyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır [94].

Atıksu ya da kirletilmiş alanların arıtılmasında rol alan mikrobiyal grupları belirleme ile ilgili çalışmalarda klonlama ve gen kütüphanesi oluşturma, denatürleyici jel elektroforezi (DGGE), floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), ribosomal genlerarası boşluk analizi (RISA, ARISA), çoğaltılmış ribosomal DNA kesim analizi (ARDRA), uçtan kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (T-RFLP) gibi birçok yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 1.6). Bu derleme çalışmasında bu yöntemler, uygulamadaki avantaj ve dezavantajları ile birlikte ele alınmaktadır [95].

**Çizelge 1.6.** Mikrobiyal çeşitliliği belirlemede kullanılan teknikler ve kıyaslamalar [95]

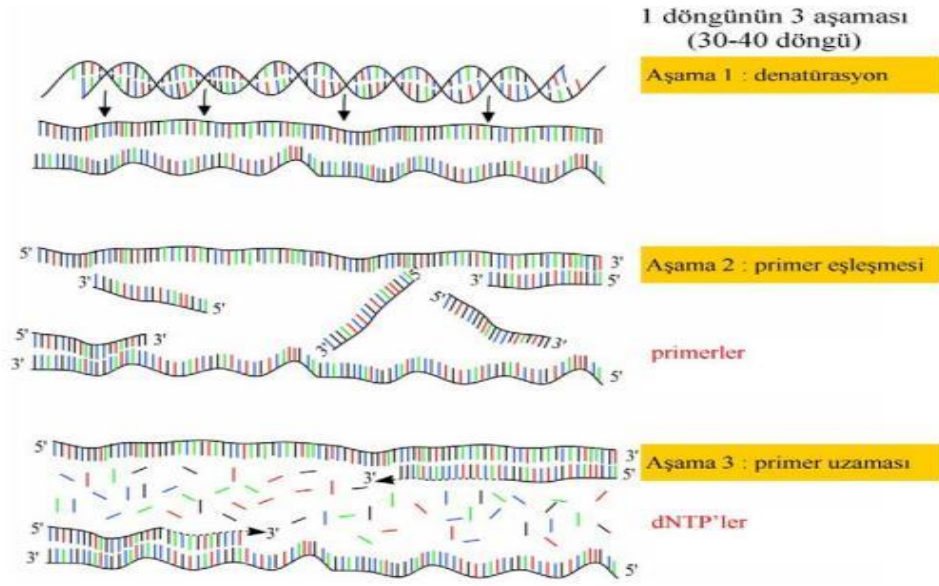
<b>Teknik</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Kısıtlamaları</b>	<b>Kullanım örnekleri</b>
Çoğaltılmış ribosomal DNA kesim analizi	Kültürden bağımsız Geniş bir aralıktaki mikroorganizmalar için uygun bir analiz yöntemidir.	DNA ekstraksiyonu ve PZR sapmaları Sayısal değildir.	Aktif çamurda mikrobiyal çeşitliliğin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

Yukarıdaki moleküler yöntemlere ek olarak son yıllarda mikroorganizmaların karboksilik grupların metilasyonu ile yağ asitlerinin metil esterlerinin (FAME) analizinde bakteriyal identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır [96].

#### **1.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Temel Prensipleri**

PZR, bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak *in vitro* olarak amplifikasyonunu sağlayan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir [97].

Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır [98]. Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşur [98]. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar. Sentezlenen DNA ürününün saptanması, kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleşmektedir [99]. Şekil 1.5'de PZR amplifikasyonunun basamakları gösterilmiştir.



**Şekil 1.5.** PZR amplifikasyonunun basamakları [99]

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

**Kalıp DNA:** Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA, plazmit ve faj DNA, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir. PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir [100].

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

Primerler: Gen çoğaltılması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotit primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Bu primerler genellikle oluşumu bilinmeyen çeşitli nokta mutasyonlarının olduğu bölgelere bağlanma amacıyla seçilir. Buna rağmen PZR ve TEM'in farklı tipleri arasında ayırım yapamaz [100, 101].

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

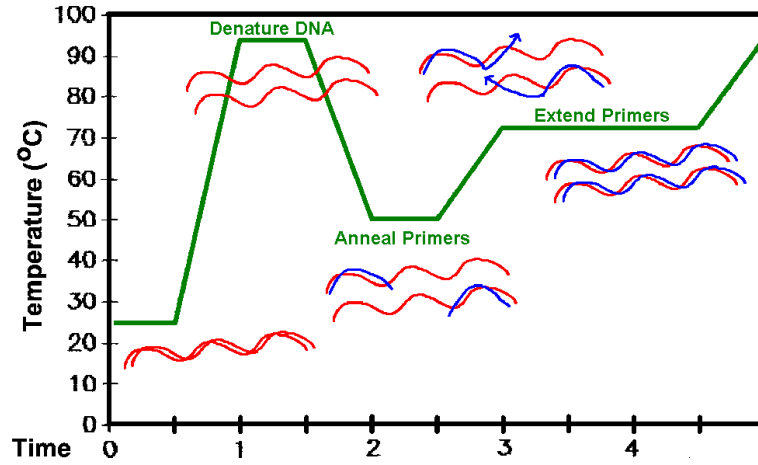
Tamponlar ve  $MgCl_2$ : PZR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır.  $Mg^{2+}$  iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın  $T_m$  değerini 1 arttırmaları, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. ( $T_m$  değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) Bu nedenle  $MgCl_2$ 'ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır [100].

DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon): Kalıp DNA (template DNA), 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [102, 103].

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [104].



Primer Uzaması (Primer Extension): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [105]. PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır [103]. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PZR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır. PZR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat ile boyanarak gözlemlenir [103].



Şekil 1.6. PZR sıcaklık değişim profili [106]

PZR yönteminde temel bileşenler; kalıp DNA, kalıp DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli oligonükleotidler (primerler), deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPler), tampon,  $MgCl_2$  ve ısıya dayanıklı DNA polimerazdır. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilir ki buna Taq DNA polimeraz adı verilir [107].

PZR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PZR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PZR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuvarında yeniden ayarlanması gerekmektedir [92]. Eğer PZR şartları yeni PZR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle

karşılaşılabilmektedir [103-105]. Bu problemler;

- PZR'dan beklenen ürün ya az alınır ya da hiç alınmaz.
- Primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
- Primerler yanlış şekilde uzayabilir.
- Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemi yavaşlatır.
- Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.

PZR'm avantajları;

- Tekniğin çok hızlı aynı zamanda da oldukça spesifik oluşu en önemli özelliklerindendir.
- Kan, serum, doku, hücre gibi materyallerin yanı sıra oldukça eski zamanlara ait olan kurutulmuş örneklerden (antropolojik çalışma) de nükleik asitler ekstrakte edilebildiğinden ve hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonlarının bile bu iş için yeterli olabilmesi nedeniyle oldukça pratik bir yöntem olarak kabul edilir.
- Toksin oluşturan etkenlerin ve saptanması güç olan toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar koşullarında üretilmeleri oldukça güç olan virusların teşhis edilebilmesini sağlamaktadır.
- Dirençliliğe neden olan genin belirlenmesi ile antibakteriyel ilaçlara dirençli olan bakterilerin saptanmasında kullanılır. Örneğin, *Staphylococcus aureus*'da metisilin direnç geni PZR ile tespit edilmiştir.
- Adli tıpta başta babalık tayini olmak üzere pek çok alanda, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygınlaşarak kullanılmaktadır [105, 108].

Son olarak PZR, kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, adli tıpta, onkogenesisin araştırılmasında, probe'ların oluşturulmasında, klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin belirlenmesinde, geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında, Restriksiyon Fragment Length

Polimorfizm (RFLP) Analizinde, Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanmasında, DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir [109].

#### **1.1.11. 16S rDNA Dizi Analizi**

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem genus hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir [110].

Sekans analizi, etken DNA'sının belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır [111]. Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının [112] geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotit dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert [113] ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir [111].

DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayırımı üzerine kurulmuştur. İzolatların ayırımı için DNA sekanslamasının kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları

bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir [114].

PZR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması, dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi bazı güçlükler de mevcuttur [115]. Ayrıca 16S rDNA geni, antimikrobiyal özelliği olan çeşitli kimyasallara duyarlıdır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, organizmanın bu kimyasallara duyarlılığını etkileyebilir ve antimikrobiyal ajanlara fenotipik direnç, 16S rDNA gen dizilimi sayesinde fark edilir [116, 117]. Bununla birlikte bu karakteristikler, 16S rDNA gen diziliminin klinik mikrobiyolojide kullanıldığı gibi bakteriyel tanımlamada ya da cins ve tür düzeyinde yakın ilişkilerin kararlaştırılmasında kullanımının önüne geçmez veya bunu etkilemez. Ancak bu karakteristikler genetik açıdan daha uzak mesafeli ilişkilerin ortaya çıkarılmasında daha büyük etkiye sahiptir [118].

#### **1.1.12. Filogenetik Analiz**

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik analiz farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilir. Moleküler filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde oluşan değişikliklerin hızını ve karakterini saptamaya ve böylece genler ve organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [119].

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanı tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler

ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir [120]. Ağaçtaki öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder, ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır [121]. Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayrt edilirler. Ağaç dallarının paterni topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler [121].

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmeler neticesinde çeşitli türlerden elde edilen diziler GenBank, EMBL gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak kullanıcıların hizmetine sunulmuştur [121]. Moleküler filogenetik analiz temel olarak üç basamakta gerçekleştirilir. Bu basamaklar hizalama, yer değiştirmenin saptanması ve filogenetik ağacın oluşturulması şeklinde sıralanabilir.

#### **1.1.12.1. Dizilerin Hizalanması**

Nükleotid ya da aminoasit dizilerinin ikili ya da çoklu karşılaştırılabilmesi için bu dizilerin alt alta aynı hizada dizilmesi işlemidir. Bunun için çok çeşitli yöntemler vardır, kullanılacak yöntemin seçimi dizilerin sayısına ve uzunluğuna bağlıdır. Hizalama elle veya gözle yapılabilir ancak dizi sayısı ve uzunluğu arttıkça elle yapılan hizalama zaman alıcı ve hatalara açık hale geleceğinden Clustral, TreeAlign gibi bilgisayar programları geliştirilmiştir [121].

Hizalama sırasında eşleşen ve eşleşmeyen nükleotidler çeşitli işaretler ile gösterilebilir. Sıklıkla tercih edilen eşleşen nükleotidlerin yıldız (\*) ile eşleşmeyenlerin ise boşluk ile gösterilmesi şeklindedir. Eksi (-) ile gösterilen boşluk evrim süresince bir ya da daha fazla dizi karakterlerinin insersiyon ya da

delesyonlardır. Bu boşlukların dizideki insersiyonları mı delesyonları mı gösterdiği bilinemeyeceğinden nötral bir terim olan 'indel' (insersiyon-delesyon) kullanılmaktadır [121].

### **1.1.12.2. Yer Değiştirmenin Saptanması**

Yer değiştirmede yer alan yöntemlerden bazıları ve genel özellikleri şöyledir [121].

1. Jukes-Cantor: Yer değiştirmelerin rastgele ortaya çıktığı ve mutasyon hızının tüm nükleotidler için eşit olasılıkta olduğu varsayılır.
2. Kimura 2-Parameter: Transisyonların, transversiyonlardan daha sık olduğu varsayılır.
3. Tajima-Nei: Jukes-Cantor'a benzer. Transisyon/Transversiyon oranının tüm nükleotidlerde aynı olduğunu varsayar.
4. Jin-Nei Gamma: Belli kurallara göre, nükleotid yer değişim oranının bölgeden bölgeye farklı olduğunu varsayar.
5. Tamura: Sabit bir yer değiştirme oranını varsayar. Transisyon ve transversiyondaki farklılıkları da dikkate alır.

### **1.1.12.3. Filogenetik Ağacın Oluşumu**

Filogenetik ağaç oluşturulurken genellikle üç yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden ikisi karakter temelli yöntemler olarak bir başlık altında toplanabilen Maksimum Parsimoni ve Maksimum Benzerlik yöntemleridir. Diğerisi ise uzaklık yöntemidir.

#### **1.1.12.3.1. Farklılıkları En Aza İndirme (Maximum Parsimony) Yöntemi**

İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir. Maksimum Parsimoni (MP), minimum evrimsel metod (parsimoni=tutumluluk) olarak tanımlanabilir. Evrimsel biyolojide tutumluluk demek, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin

sonuca varılırken, araştırmacının karmaşık yerine basit açıklamaları, başka bir deyişle açığa çıkan evrimsel değişmenin miktarını azaltan veri yorumlarını tercih etmesi demektir. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa ıkmiş olan evrimsel değişmenin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [120].

#### **1.1.12.3.2. En Yüksek İhtimal (Maximum Likelihood) Yöntemi**

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir [122]. Araştırmacıya sunulan bütün bilginin daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinden en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağı yaratmak için ortaya konmuştur. Bu yöntem, farklı tipteki nükleotit değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir sorusunu sormaktadır. Bu yöntem için bir bilgisayar programı, her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder [122].

#### **1.1.12.3.3. Uzaklık (Distance) Yöntemi**

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotid değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu (neighbours) olarak adlandırılır. Uzaklık metotları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir [121]. Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır [120]. Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için kullanılabilir. Bunlar içinde en çok kullanılan ise Komşu Bağlantı Metodu (Neighbour joining)'dur [121].

Komşu Bağlantı Metodu içerik olarak “cluster” analizle alakalıdır. Ancak, dallar boyunca moleküler değişikliklerin eşit olmayan oranları için metot izin verir. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklıdır. Bu yöntemde bir tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez [119].

### **1.1.13. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi**

Bakteriyel lipid kompozisyonu ve taksonomik sınıflandırma arasındaki ilişki bakteriyel identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır [123].

Yağ asidi metil esterlerindeki (FAME) farklılıklar aynı zamanda genetiksel akrabalıkların da dolaylı bir göstergesi olup; bu profiller kullanılarak bakterilerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar 40 yılı aşkın bir süredir yürütülmektedir [124-126]. Ancak, ilk defa 1980’li yıllarda MIDI firması tarafından ABD’de geliştirilerek hizmete sunulan bilgisayar kontrollü bir gaz kromatografi sistemi yardımı ile kültüre alınabilen her türlü mikroorganizmanın tanısında kullanılabilen Mikrobiyal Tanı Sistemi [127] geliştirilmiştir.

Yağların bakterilerde kapsülde, hücre zarı ve zarlı organellerin yapısında yer aldığı ve hücre zarının selektivitesine etki ederek antibiyotiklerin aktivitesi üzerine etki ettikleri bilinmektedir [128]. Yağ asidi profillerine dayanan bakterial sınıflandırmalar nükleik asit homolojisine dayalı sınıflandırmalarla iyi karşılaştırılmış durumdadır. Lipid analizleri metodolojisindeki gelişmeler birçok bakteri için bu ilişkiyi sağlamıştır. Lipid ekstraksiyonlarının gaz kromatografisi, hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu metod bakteriyel lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir. FAME analizleri halofilik bakteriler için de uygulanmıştır.

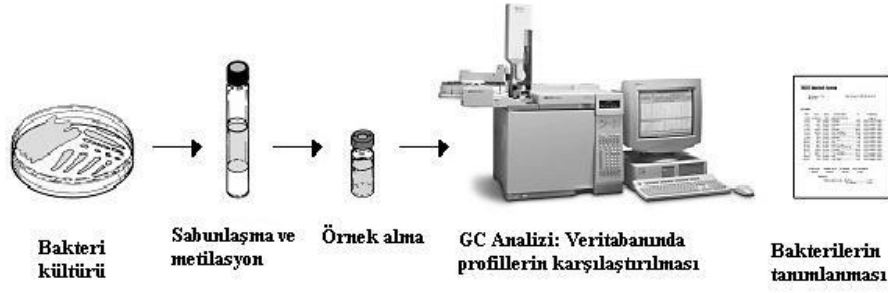
Gaz kromatografisi uçucu madde karışımlarının analizi için kullanılan bir yöntemdir.



Analiz edilecek madde uygun bir kolonda bulunan sabit faz arasından hareket eden bir inert gaz yardımıyla geçirilir. Analiz edilecek madde kolonun girişinde bulunan enjektör kısmının yardımıyla buhar halinde kolona verilir. Kolonda her bileşen sabit fazdan mobil faza ve mobil fazdan sabit faza farklı hızlarda göç ederek devamlı taşınırlar ve böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Kolonun sonuna konan uygun bir dedektörle tespit edilerek miktarlarıyla orantılı olarak tespit edilirler. Gaz kromatografisinde kullanılan sabit faz katı ise gaz kromatografisi, sabit faz sıvı ise gaz-sıvı kromatografisi söz konusudur. Gaz kromatografisinde kolon yüksek sıcaklıkta tutularak ayrılacak maddeler gaz halinde geçirildiğinden kaynama noktası 500°C'ye kadar olan bileşikler ayrılabilir. Çünkü bugün için ancak bu sıcaklığa dayanabilecek sabit fazlar geliştirilmiştir [123].

Gaz kromatografik işlem basamaklarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Ekstraksiyon: Sıvı veya katı örnek analiz edilecek bileşikleri çözebilen bir çözücü ile ekstrakte edilir. Bu işlem bir blenderda veya bir ayırma hunisinde gerçekleştirilir.
2. Temizleme: Ekstraksiyon sonucu ele geçen ekstraktta ilgilenilen bileşiklerin dışında pek çok bileşik bulunmaktadır. Analizde girişimlerden korunmak için bu kirletici bileşiklerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için pratikte kolon, ince tabaka kromatografileri ve ayırma hunisinde sıvı-sıvı partiyon kromatografisinden yararlanılmaktadır.
3. Konsantrasyon: Temizlenmiş ekstrakttaki çözücünün buharlaştırılarak örneğin konsantre edilmesi gerekir. Bunun için vakumlu döner buharlaştırıcıdan yararlanılır.
4. Türevlendirme: Temizlenmiş ve konsantre edilmiş örnek içerisindeki bazı bileşenlerin analizi için bileşik çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile başka bir forma dönüştürülür ve böylece gaz kromatografisi dedektörü tarafından duyarlı hale gelmiş olur. Bu işlem her gaz kromatografik analizde zorunlu değildir. Türevlendirme basamağı bazen önceki basamakla yer değiştirebilir [129].



**Şekil 1.7.** Gaz kromatografisinin işlem sırası [127]

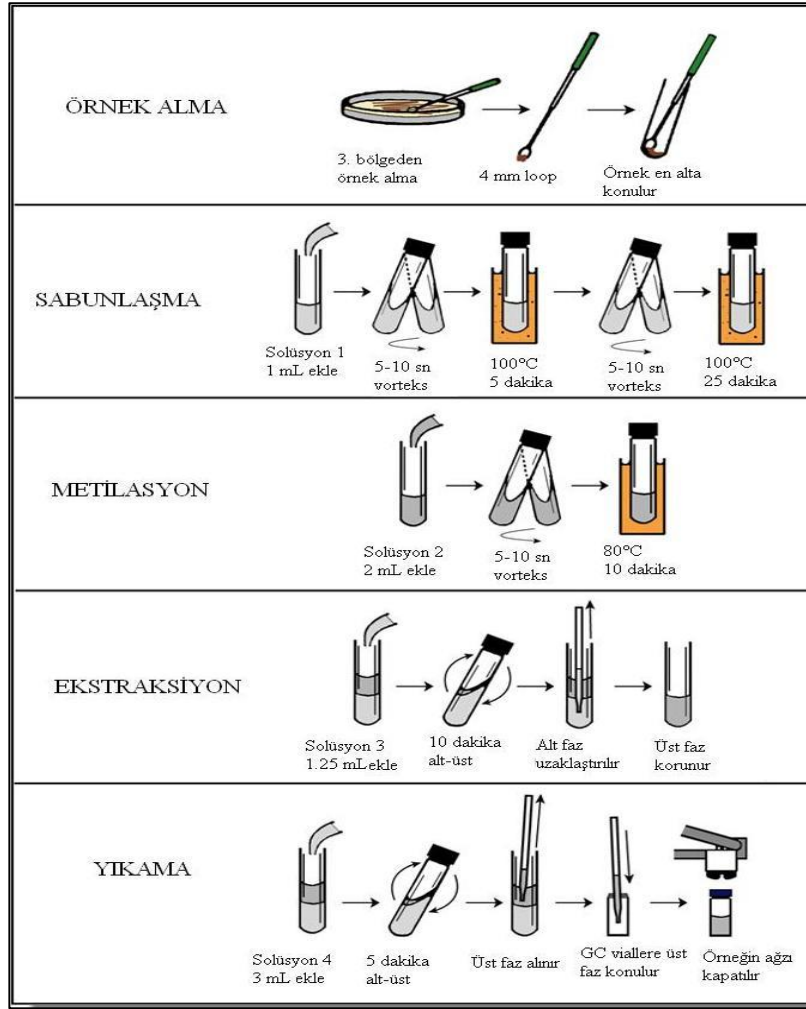
Gaz kromatografisinin avantajlarını

- Kısa sürede örneklerin ayrılması,
- Oldukça kompleks karışımları ayırabilme ve çok küçük miktarları tespit edebilme yeteneğine sahip olması,
- Gaz kromatografisi doğru ve tekrarlanabilir analiz sonuçları vermesi olarak sıralayabiliriz.

Gaz Kromatografisinin Dezavantajları ise

- Gaz kromatografisinin en büyük dezavantajı numunelerin belli bir uçuculuğa sahip olma zorunluluğudur.
- Kompleks karışımlar için gaz kromatografisinde analizden önce ekstraksiyon ve türevlendirme gibi ön işlemler gerekebilir.
- Kolon sıcaklığında stabil olmayan maddeler için uygun değildir. Yüksek polariteli maddeler için gaz kromatografisi uygun ayırma tekniği değildir.
- Yüksek molekül ağırlıklı maddelerle çalışılmamaktadır [130].

Vreeland ve arkadaşları [131] yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bir "Permian" bakteri ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapmadığı ancak test edilen Bacteria üyeri arasındaki farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır.



**Şekil 1.8.** Yağ asidi metil ester analizi işlem sırası [127]

MIS sisteminin mikrobiyal tanı rutin çalışmaları için gerek zaman açısından gerekse de ekonomik olması bakımından çok uygun tanı yöntemi olduğu bilinmektedir. Son yıllarda aynı tür bakterilerin farklı strainlerindeki yağ asidi farklılıklarının konukçu dizisine Duran ve arkadaşları [132] ve antibiyotik duyarlılığına Nischwitz ve arkadaşları [133] bağlı olarak değiştiğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Bu sonuçlar MIS sisteminde elde edilen FAME profillerinin tanıya ilave olarak farklı amaçlar için de kullanılabileceğini göstermektedir.

#### 1.1.14. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Sr ağır metale karşı dirençli suşların izolasyonu, identifikasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Sr dirençli suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK değerleri belirlenmiş ve MİK değeri en yüksek olan suşlar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşlar biyokimyasal testler, yağ asidi ve 16S rDNA sekans analizleri kullanılarak tanımlanmıştır. Sr dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallerle karşı çoklu dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran proteini ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkilendirilmesi kurulmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1. Nutrient Agar

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

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

##### 2.1.1.2. Nutrient Broth

İzole edilen bakterilerin üreme eğrisi, plazmit izolasyonu, dna izolasyonu, protein izolasyonu gibi deneyler için kullanılmıştır.

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

Gerekli ölçeklerde hazırlanan besiyeri 121°C'de 1 Atm basınçta otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

### 2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Bakterilerin antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik disklerinin tamamı Merck ve Sigma marka olup isimleri ve içerdikleri madde miktarları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

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

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

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

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

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

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

Deneylerde kullanılan bakteri suşlarının plazmit DNA izolasyonu yapılarak profilleri belirlenmiştir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Toplam hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

### 2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

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

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

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



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

10 gram SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tampon hazırlanmıştır.

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

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

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

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

**Çizelge 2.3.** SDS PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0.8 bisakrilamid (100 mL)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	1 M Tris-HCl (pH 6.8) 50 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 46 mL. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 mL)	0.5 g amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 mL'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 M) 3 g, 14.4 g glisin (192 mM), 1 g SDS (%0.1) tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH 8.3
ÖrnekTamponu (5x) (10 mL)	1 M Tris-HCL (pH 6.8) 0.6 mL, %50 Gliserol 5 mL, %10 SDS 2 mL, 0.5 mL 2-merkaptotanol, %1 Bromfenol mavisi 1 mL, 0.9 mL distile su. Buzdolabında saklanır.

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

**Çizelge 2.4.** Ayırıcı jelin hazırlanması

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

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

**Çizelge 2.5.** Dengeleyici jelin hazırlanması

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

#### **2.1.3.2.7. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması**

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

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

##### **2.1.3.2.8.1. Solüsyon I**

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

##### **2.1.3.2.8.2. Solüsyon II**

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

##### **2.1.3.2.8.3. Solüsyon III**

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

##### **2.1.3.2.8.4. Solüsyon IV**

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

### 2.1.3.3. PZR Amplifikasyonu için Örneklerin Hazırlanması

16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılacaktır. Diziler forward primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve reverse primer: 5'-CCCG GGATCCAAGCTTAC GGCTACCTTGTTACGACTT-3' primerleri kullanılacaktır. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA ( 100 ng), 5 µL 16S Forward Primer ( 20 pmol), 5 µL 16S Reverse Primer ( 20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polimeraz içeren), 61.5 µL steril distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp santrifijlenecektir. Thermal cyler da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılarına kadar -20°C'de saklanacaktır [134].

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı

Çalışma alanı olarak Kırıkkale şehrinden de geçen Türkiye'nin en büyük nehri olan Kızılırmak Nehri seçilmiştir. Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğarak yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun nehirdir. Adını akarsu yatağının tabanında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkli kumlu-killi tortudan alır. Uzunluğu 1355 km.dir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi nehir, İç Anadolu'nun en doğusundaki Sivas ilinde Kızıldağ'ın güney yamaçlarından yaklaşık  $39.8^\circ$  kuzey  $38.8^\circ$  doğu noktasından doğar, ilk önce batı ve güney batıya  $38.7^\circ$  kuzey  $34.8^\circ$  doğu noktasma kadar akar, daha sonra yay şeklinde biçimlenir. İlk batıya, daha sonra kuzey doğudaki Tuz Gölü'nü geçerek kuzey batıya akar. Daha sonra kuzey ve kuzey doğuya yönelir. Burada Delice Irmağı ile  $40.47^\circ$  doğu  $34.14^\circ$  batı noktasında birleşir. Sonra zigzaglar çizerek kuzey batıya akar.  $41.10^\circ$  doğu  $34.42^\circ$  batı da Devrez Nehri ile birlikte akar ve kuzey doğuya doğru döner. Sonuçta Karadeniz'e  $41.72^\circ$  kuzey  $35.95^\circ$  doğu noktasında boşalır. Sırasıyla Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır (Şekil 2.1) [135].



Şekil 2.1. Kızılırmak lokasyonu [135]

Kızılırmak Nehri Türkiye'nin en uzun akarsuyu olduğundan ülkemiz açısından çok önemli bir su kaynağıdır. Özellikle geçtiği illerde veya yakın illerde hem içme suyu, hem sulama hem de enerji üretimi açısından hayati öneme sahiptir. Günümüzde

kuraklık ve küresel ısınma tehlikesinin gözle görülür derecede arttığı düşünülürse su kaynaklarının kullanımı, işletilmesi gibi konular ön plana çıkmıştır [135].

### 2.2.2. Örneklerin Toplanması

Kırıkkale il sınırları içerisinde Kızılırmak Nehri üzerinde endüstriyel kuruluşlara yakın olarak belirlenen ve Çizelge 2.6'da gösterilen 12 istasyondan 2009 yılında su örnekleri toplanmıştır.

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

<b>Bölge No</b>	<b>Bölge Adı</b>	<b>Bölge Koordinatları</b>
1	Kesikköprü Barajı Girişi	39° 23' 53,41''K, 33° 25' 18,44''D, 775m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98''K, 33° 24' 56,99''D, 819.5m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60''K, 33° 23' 25,53''D, 781m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39''K, 33° 24' 00,99''D, 801m
5	Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii	39° 32' 26,97''K, 33° 23' 59,54''D, 760m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02''K, 33° 24' 38,51''D, 750.5m
7	Sulubük - Kıyıbağı Mevkii	39° 37' 04,85''K, 33° 26' 11,19''D, 771m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39' 42,39''K, 33° 27' 13,46''D, 766.5m
9	Kapulukaya Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62''K, 33° 28' 59,95''D, 741m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08'' K, 33° 27' 42,27''D, 718.5m
11	Mezbahane- MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92''K, 33° 28' 07,85''D, 706.5m
12	Irmak Mevkii- Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25''K, 33° 25' 04,24''D, 699.5m





**Şekil 2.2.** Kırıkkale-Kızılırmak Nehri uydu fotoğrafı (Google Earth)

### **2.2.3. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu**

Stronsiyum ağır metalini tolere eden suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Sr dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı  $SrNO_3$  ağır metalleri içeren nutrient agar (NA) besiyeri ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir.  $37^{\circ}C$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Sr dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

### **2.2.4. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi**

Sr ağır metale dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan

konsantrasyonlarda  $\text{SrNO}_3$  eklenerek saptanmıştır.  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiş ve üreme olan petrilerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki Sr metali bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saatlik süre sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu o suşların MİK değeri olarak saptanmıştır.

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

Kırıkkale ili sınırları içerisinde geçen Kızılırmak Nehri'nden Sr dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiş ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiş ve API 20 kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır.

### **2.2.6. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması**

Sr dirençli saf kültürler  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilerek koloni morfolojisi ve hücre morfolojisi özelliklerine bakılmıştır. Suşların koloni morfolojisinde koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkanlık/yapışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojisinde ise gram boyama ile mikroskop (immersiyon yağı ve x100 büyütme ile) altında incelenerek gram reaksiyonu esasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

### **2.2.7. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

MİK değerleri belirlenen Sr metalinin bulunduğu nutrient broth ortamında, kültürlerden 100  $\mu\text{L}$  örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Sr metalinin bulunmadığı NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Sr içeren kültürler  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren,  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 'de her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkartılmıştır.

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

İzole edilen Sr dirençli bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [136]. 15 mL'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 5.7 µL TE tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz-K ve 30 µL RNAaz eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NaCl tamponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Aynı hacimde kloroform/izoamil alkol solüsyonunu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Pellet üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrede yapılmıştır. Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorpsanları hesaplanmış (OD<sub>260</sub> ve OD<sub>280</sub>) ve bu değerler arasındaki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranının 1.6 ile 1.8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha yukarıda olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha aşağıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir [137]. Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA'ların miktarlarının hesaplanması için OD<sub>260</sub> değeri kullanılmış ve DNA miktarları;

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme oranı} \times 50$$

formülü ile hesaplanmıştır [137].

### 2.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Amplifikasyonu

16S rRNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılacaktır. Diziler (forward) F primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACA GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve (reverse) R primer: 5'-CCCGGGAT CCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S Forward Primer (20 pmol), 5 µL 16S Reverse Primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polimeraz içeren), 61.5 µL steril distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp santrifüjlenecektir [134].

PZR protokolünün optimizasyonu için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda optimum protokol tespit edilmiş olup tüm örnekler spesifik primerler kullanılarak bu protokole göre PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonunda Çizelge 2.7'de kullanılan DNA, F primer, R primer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Tampon, Taq DNA Polimeraz ve PZR toplam karışım miktarları belirtilmiştir. Son hacim su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 2.7.** PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar

Genomik DNA	1.86 µL
F Primer	0.50 µL
R Primer	0.50 µL
dNTP	2.00 µL
MgCl <sub>2</sub>	3.75 µL
Tampon	5.00 µL
Taq DNA pol.	0.75 µL
Su	35.64 µL
PZR toplam karışım	50.00 µL

Techne TC-Plus marka otomatik termocycler PZR amplifikasyonu amacıyla

kullanılmıştır. Döngüler; 95°C’de 5 dakika ön denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 59°C’de 30 saniye bağlanma basamağı, 72°C’de 2 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C’de 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [138].

**Çizelge 2.8.** PZR amplifikasyon koşulları

Analiz Modu	Sıcaklık - Zaman	Döngü	
Ön denatürasyon	95°C - 5 dakika	1 döngü	
Amplifikasyon	Denatürasyon	94°C - 1 dakika	30 döngü
	Primerlerin bağlanması	59°C - 30 saniye	30 döngü
	Yeni iplikçiğin yazılımı	72°C - 2 dakika	30 döngü
Soğutma	72°C - 10 dakika	1 döngü	

#### 2.2.10. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

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

### **2.2.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi**

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

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

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel yatağı alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromür boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası, jeli 1 mM MgSO<sub>4</sub> solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Daha sonra U.V. transillüminatör üzerine konulan jelin fotoğrafları çekilmiştir [139].

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

İzole edilen Sr021 ve Sr111 suşlarının 16S rDNA gen sekansları yapılmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünlerinin DNA sekans analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır. Gelen nükleotid dizilerinin, çift yönlü dizi analizi ile 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuştur.

#### **2.2.14. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması**

Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Sr021 ve Sr111 izolatlarının nükleotid dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. 16S rDNA gen sekansları NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre BLAST analizi kullanılarak dizilmiş ve MEGA 5.1 Bootstrap Test of Phylogeny (neighborjoining) yazılımı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur [140].

#### **2.2.15. Yağ Asit Metil Ester (FAME) Analizi**

Seçilen Sr021 ve Sr111 suşlarının yağ asit analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Sherlock tarafından tarif edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [127]. Örnekler nutrient agara dört bölgeden oluşan çizgi ekim yapılmış 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üçüncü bölgede gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile alınıp 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipitlerin parçalanıp, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine Solüsyon I'den 1 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiştir. 100°C'lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra vortekslenmiş ve daha sonra tekrar 100°C'lik su banyosunda 25 dakika tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanmış, serbest yağ asitlerine ester bağlarıyla metil eklenmiş ve yağ asit metil esterler elde edilmiştir. Bunun içinse 100°C'lik su banyosundan çıkarılan tüplere Solüsyon II'den 2 mL ilave edilmiş ve 5-10 saniye vortekslenmiş ve 80°C'lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında soğutulan tüplerin üzerine Solüsyon III'den 1.25 mL ilave edilmiş ve 10 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu basamak sonunda tüplerde altta asidik, üstte organik sıvı faz olmak üzere iki faz gözlenmiştir. Tüplerdeki asidik faz pastör pipeti ile uzaklaştırılmış, yağ asit metil esterler asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanmış ve organik faz muhafaza edilmiştir. Son basamakta ise tüplerin üzerine Solüsyon IV'den 3 mL ilave edilmiş ve 5 dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Böylece serbest yağ asit metil esterlerinin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Tüplerde gözlenen üst faz pastör pipeti ile 2 mL viellere alınmıştır.

Örneklerin yağ asidi analizi gaz kromatografisi (Shimadzu GC-2010) ile gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.9'da gaz kromatografisinin çalışma prensipleri verilmiştir. Yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları ve toplam yağ asitleri miktarları, analiz edilen örneklerin kromatogramındaki pikleri, standarttaki bütün yağ asitlerinin alkonma zamanları tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.9.** Gaz kromatografisi genel çalışma prensibi

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

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

Kızılırmak'tan izole edilen Sr ağır metale dirençli her bir suşun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallerde de dirençlilikleri tespit edilmiştir. Böylece suşların metallerle karşı çoklu dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

Stronsiyuma dirençli suşun, çoklu metal direnç profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Cd, Al, Li, Ba, Cr, Mn, Pb, Ni, Fe, Cu, Co, Sn, Ag, Zn, Hg ve Sb ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme görülen örneklerde suşların ortama ekilen metale karşı dirençli, üreme görülmeyen örneklerde ise suşların o metale karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.



### 2.2.17. Plazmit DNA İzolasyonu

İzole edilen Sr dirençli bakterilerin plazmit DNA izolasyonu Birnboim ve Doly tarafından tanımlanan metodun modifiye hali kullanılarak yapılmıştır [141]. Plazmit DNA'sı izole edilecek bakterilerin 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda SrNO<sub>3</sub> metalinin bulunduğu NB besiyerine ekimleri yapılmıştır.

Bakteriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen kültürlerden 1.5 mL alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve tekrar 1.5 mL kültür konularak işlem tekrarlanmış ve süpernatant atılmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µL Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA) ilave edilmiştir. Tüplerdeki karışım önce pipetaj yapılmış, daha sonra homojen oluncaya kadar vortekslenmiş ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Tüpler buz içerisinden çıkartılıp üzerlerine 200 µL Solüsyon II (NaOH/SDS) ilave edilerek çok yavaş şekilde alt üst edilip karıştırılmıştır. Karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 150 µL Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit) ilave edilmiş ve tüpler yavaşça birkaç kez alt üst edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınıp pellet atılmıştır. %100'lük etanolden 900 µL tüplere konulmuş ve -20°C'de bir gece bekletilmiştir. Gece sonunda bekletilmiş olan numune 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine %70'lik etanolden 1mL eklenerek 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve sıvı kalmayacak şekilde vakum yapılmıştır. Pelletin üzerine 20 µL su, 5 µL proteinaz-K ve 5 µL RNAaz konulmuştur. Son olarak da 5 µL DNA Loading 6X boya ilave edilmiş ve elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

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

%0.7'lik agaroz jel hazırlamak için 0.35 g agaroz tartılıp 50 mL 1x TBE tamponu ile çözüldükten sonra mikrodalga fırında ısıtılarak eritilmiştir. Jel yatağına önceden tarak yerleştirilmiş ve yatak su terazisi ile dengeye getirilmiştir. Çözelti yaklaşık 45-

50°C'ye kadar soğutulmuş ve jel yatağına dökülmüştür. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice alınmış, jel yatağı örneklerin yürüyeceği, içinde tampon çözeltinin bulunduğu elektroforez tankına aparat yerleştirilmiştir. 20-25 µL'lik miktarlarda DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan birine 3 µL marker DNA (Lambda DNA/Hind III) yüklenmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu eklenmiştir. 80 V/cm<sup>2</sup> voltaj ve 40 mA akım uygulanarak yaklaşık 6 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır.

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

Plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA HindIII 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 metot ile DNA bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

### **2.2.20. Plazmit Eliminasyonu**

İzole edilen Sr dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılmıştır [142]. Sr dirençli suşların optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Plazmit eliminasyon çalışmalarında NB besiyerine ekimi yapılan Sr dirençli suşlar için en yüksek denenen sıcaklık 43°C olup, bu sıcaklıkta her iki bakterinin de üremediği gözlemlenmiştir. Her iki suş için de 42°C denenmiş ve bu sıcaklıkta üreme olduğu gözlenmiştir. Sr içeren ve içermeyen iki farklı NA besiyeri hazırlanmış ve 42°C'de üreyen Sr dirençli suşlardan ekim yapılmış, 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.21. Total Protein İzolasyonu**

Sr meteline dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [143] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 mL'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda SrNO<sub>3</sub> metalinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 5 mL steril su eklenerek 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelletler üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz tüplere transfer edilmiştir. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

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

Total protein analizleri Laemli'ye [144] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

#### **2.2.22.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

16.7 mL Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk), 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 mL %10'luk APS (amonyum 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 [144].

#### **2.2.22.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması**

3.4 mL %30'luk Akrilamid/Bis Akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 mL %10'luk APS ve 200 mL %10'luk SDS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 mL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım, polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir [144].

#### **2.2.23. SDS-PAGE Jel Elektroföresi**

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

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

Elektroförez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitleme çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dakikalık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [145]. SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

#### **2.2.25. Total Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 250, 130, 100, 70 ve 55 kDa 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 metot ile bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar, jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerde tarama yapılmış ve değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe, iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazında belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği, bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [146].

### 3. ARAŞTIRMA BULGULAR

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

Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak Nehri üzerinde 12 farklı bölge belirlenmiştir. Bu bölgelerden alınan su örneklerinden stronsiyuma dirençli bakteriler izole edilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi farklı bölgelerden stronsiyuma dirençli toplam 7 suş izole edilerek MİK değerleri saptanmıştır. En yüksek MİK değeri SrNO<sub>3</sub> için 2000 mg/L olan 2. ve 11. bölgeden izole edilen suşlar Sr021 ve Sr111 kodları verilerek ileri çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir.

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

Örnek Alınan Bölgelere Göre Bakteri Üreme Durumları												
Ağır Metal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sr	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

(-); üreme yok, (+); üreme var

#### 3.2. Bakterilerin Biyokimyasal Tanımlanması

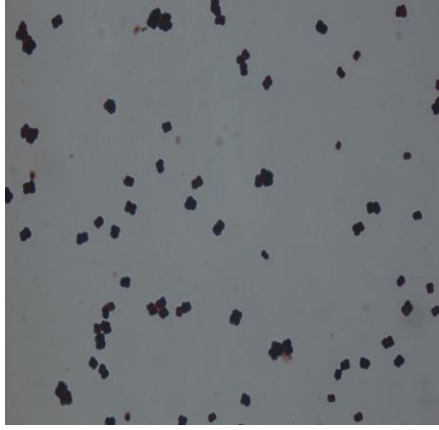
Sr021 ve Sr111 suşlarının biyokimyasal ve morfolojik testleri yapılmış ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

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

Biyokimyasal Özellikler	Stronsiyum Dirençli Suşlar	
	Sr021	Sr111
Morfoloji	Kok	Kok
Gram Reaksiyon	+	+
Pigmentasyon	Sarı	Sarı
Hareket	-	-
Katalaz	+	+
Oksidaz (OXI)	+	+
Üreaz (URE)	-	-
Arginin hidr (ARG)	-	-
Koagülaz	-	-
Mannitol (MAN)	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-
Maltoz (MLT)	-	-
Ksiloz (XYL)	-	-
Mannoz (MNE)	+	+
Sitrat (CIT)	-	-
Inositol (INO)	-	-
Adonitol (ADO)	-	-
Nitrat	-	-
Laktoz (LAC)	-	-
Gliserol Ferm.	-	-
Eskulin Hidrolizi (ESC)	-	-
β-galak ONPG (ONP)	-	-
<b>Tanımlanan Türler</b>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

(-); negatif , (+); pozitif

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi stronsiyuma dirençli gram pozitif hücre duvarına sahip, sarı pigment oluşturan, kok şeklindeki, katalaz, oksidaz pozitif ve koagülaz negatif olan suşlar *Micrococcus luteus* olarak tanımlanmıştır. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de sırasıyla *M. luteus*’un gram boyama sonuçları ile pigment oluşturmaları gösterilmiştir.

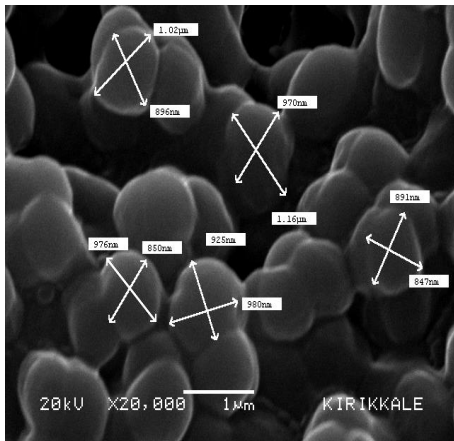


Şekil 3.1. *M. luteus* gram boyama (x100)

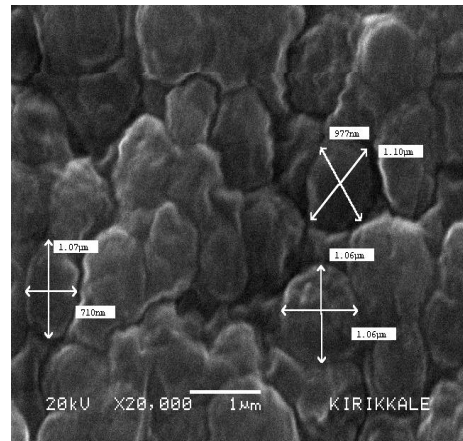


Şekil 3.2. *M. luteus* pigmentasyonu

Şekil 3.3'de Sr içermeyen ortamda üreyen *M. luteus* ve Şekil 3.4'de ise Sr içeren ortamda üreyen *M. luteus*'un taramalı elektron mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.3. *M. luteus* Sr içermeyen ortamdaki elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 3.4. *M. luteus* Sr içeren ortamdaki elektron mikroskop görüntüsü

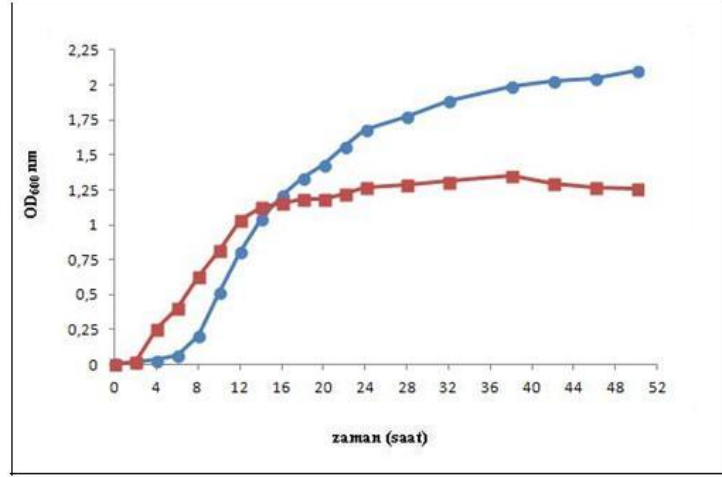
Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'den de anlaşıldığı gibi stronsiyum metali içermeyen ortamda üremiş olan *M. luteus* suşlarının yüzeylerinin daha düzgün olduğu ve boyutlarının (0.93 x 0.88 nm) stronsiyum metali içeren ortamda üremiş olan yüzeyleri daha düzgün olmayan *M. luteus*'un boyutlarından (1.03 x 96 nm) farklılık gösterdiği belirlenmiştir.





### 3.3. Bakterilerin Üreme Eğrisi

#### 3.3.1. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr021 Suşunun Üreme Eğrisi

Sr dirençli *M. luteus* Sr021 suşunun metal içeren ve metal içermeyen ortamdaki üreme eğrisi belirtilmiş ve Şekil 3.5’de gösterilmiştir.

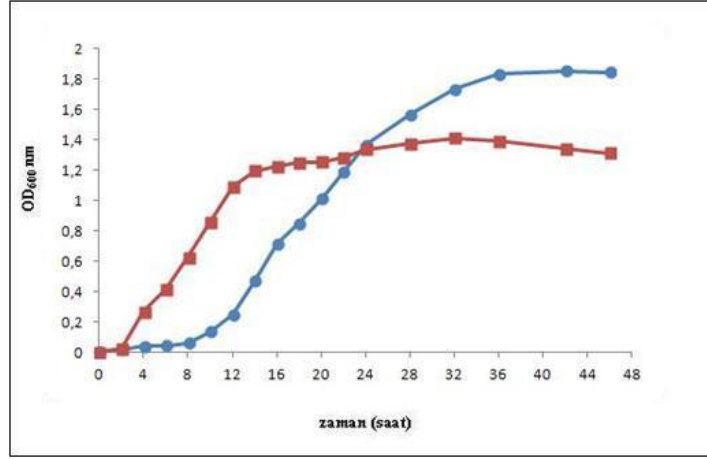


Şekil 3.5. *M. luteus* Sr021 suşunun  Sr içermeyen ve  Sr içeren ortamdaki üreme eğrisi

*M. luteus* Sr021 suşu Sr içeren ortamda log fazına 2 saatte girerken, Sr içermeyen ortamda 6 saatte girdiği tespit edilmiştir. Sr içermeyen ortamda log fazına geç girdiği halde OD’nin Sr içeren ortama göre en yüksek değer olan 2.25 seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum Sr’un *M. luteus* Sr021 suşunun üremesinde etkisi olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Sr021 suşunun Sr içermeyen ortamda ikiye katlanma süresi 3 saat, Sr içeren ortamda ise ikiye katlanma süresi 1.5 saat olarak tespit edilmiştir.

#### 3.3.2. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr111 Suşunun Üreme Eğrisi

Sr dirençli *M. luteus* Sr111 suşunun metal içeren ve metal içermeyen ortamdaki üreme eğrisi belirtilmiş ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

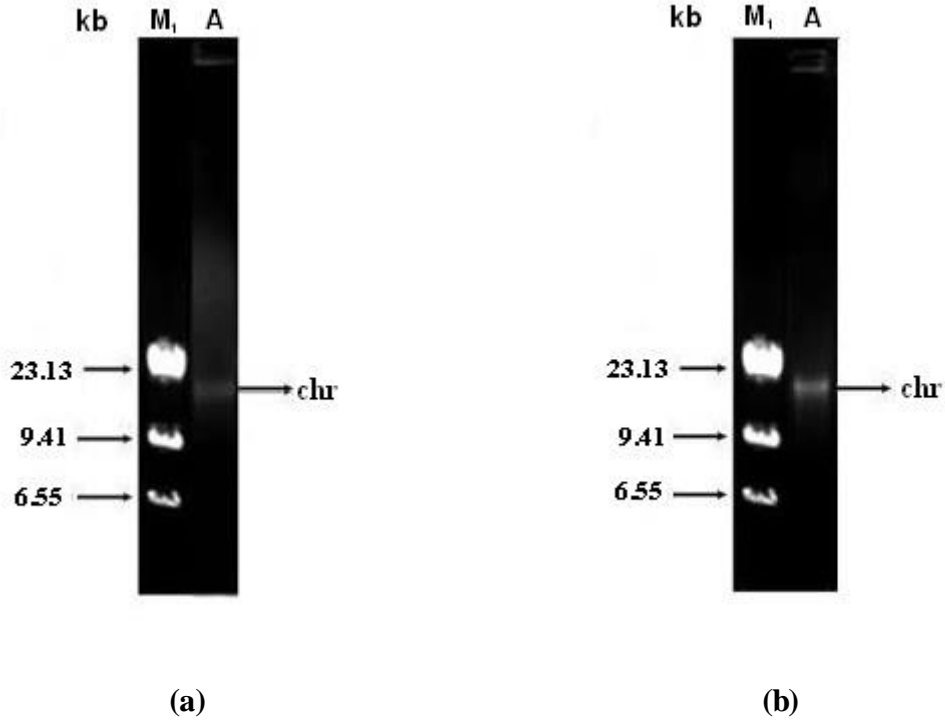


**Şekil 3.6.** *M. luteus* Sr111 suşunun ● Sr içermeyen ve ■ Sr içeren ortamdaki üreme eğrisi

*M. luteus* Sr111 suşu Sr içeren ortamda log fazına 2 saatte girerken, Sr içermeyen ortamda 8 saatte girdiği tespit edilmiştir. Sr içermeyen ortamda log fazına geç girdiği halde OD'nin Sr içeren ortama göre en yüksekdeğer olan 1.9 seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum Sr'un *M. luteus* Sr111 suşunun üremesinde etkisi olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Sr111 suşunun Sr içermeyen ortamda ikiye katlanma süresi 4.1 saat, Sr içeren ortamda ise ikiye katlanma süresi 1.5 saat olarak tespit edilmiştir.

### 3.4. Kromozomal DNA İzolasyonu

Sr dirençli *M. luteus* Sr021 ve *M. luteus* Sr111 suşlarından kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülerek bantlar kontrol edilmiş ve PZR amplifikasyonu çalışmalarında bu suşlara ait DNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır.



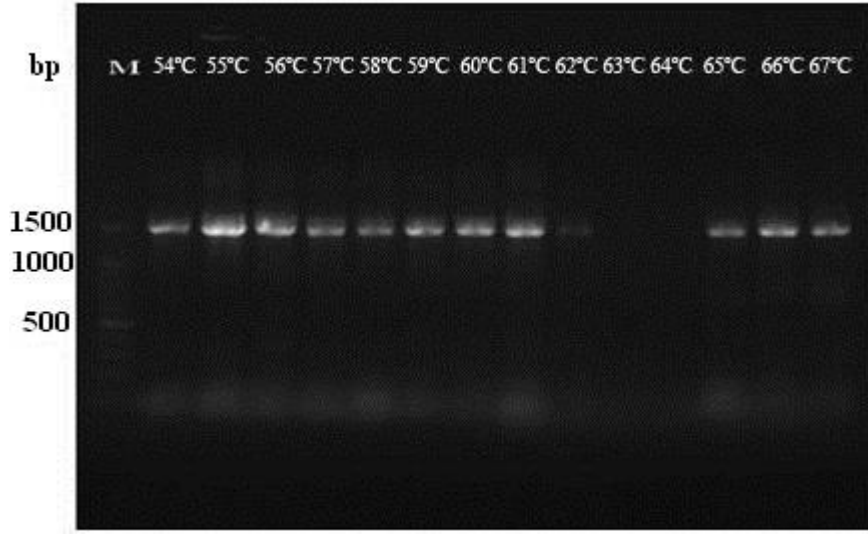
**Şekil 3.7.** Sr dirençli *M. luteus* Sr021 (a) ve *M. luteus* Sr111 (b) suşlarının DNA analizi

M<sub>1</sub>: Lambda DNA-HindIII Marker, chr; Kromozomal DNA

### 3.5. Stronsiyum Dirençli *M. luteus*'un PZR Amplifikasyonu

PZR amplifikasyonunda örnekleri amplifiye etmek için standart 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılmıştır. Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu kullanılan DNA, F primer, R primer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Taq buffer, Taq DNA Polimeraz, PZR Master Mix, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Buna göre; 95°C'de 5 dakika denatürasyon, ardından 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 30 saniye yapışma-annealing, 72°C'de 2 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon ile sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezi tamamlanmıştır. Programın son aşamasında

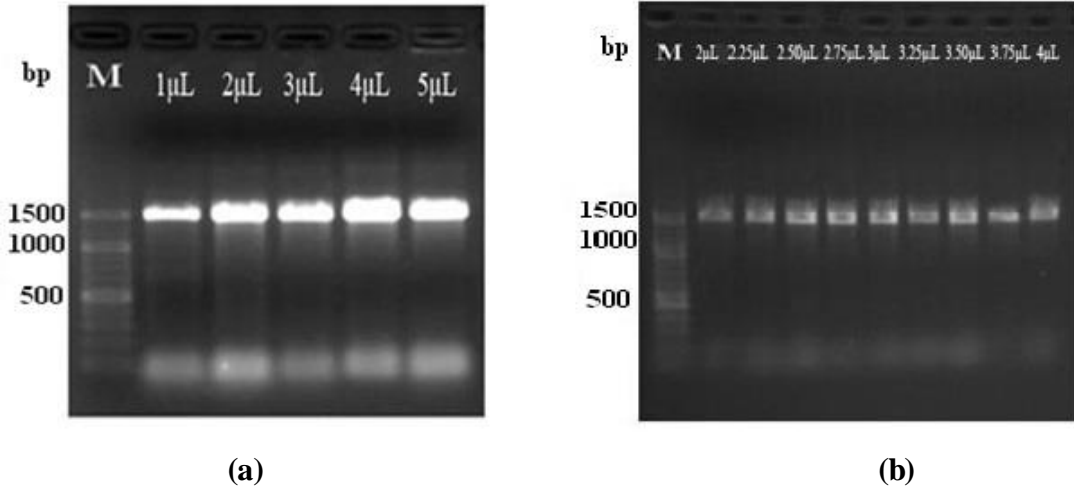
bekleme sıcaklığı 4°C olarak tercih edilmiştir. Uygulanan bu parametreler sonucunda etkili bir amplifikasyon elde edilmiştir.



**Şekil 3.8.** *M. luteus* için değişik sıcaklıklardaki PZR amplifikasyonu

M; Marker (DNA O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder)

Uygulanan sıcaklıklar sonucunda 59°C en uygun sıcaklık olarak belirlenmiştir. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun optimizasyonu belirlenen bu sıcaklıkta yapılmıştır. Şekil 3.9'da uygulanan MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları gösterilmiştir. Bu konsantrasyonlar en net bantın 2 µL ile 4 µL arasında olacağı görülmüştür. Sonraki aşamalarda ise konsantrasyonla 0.25 µL oynanarak MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu sağlanmıştır.



**Şekil 3.9.** *M. luteus* için değişik MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarındaki PZR optimizasyonu

M; Marker (DNA O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder)

Uygulanan işlemler sonucunda spesifik olmayan bağlanmaların olmadığı 59°C'de 3.75 µL MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda en etkili amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. Stronsiyum Dirençli Sr021 Suşunun DNA Sekans Analizi

DNA sekans analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır. Elde edilen nükleotid dizilerinin çift yönlü dizi analizi ile 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuş ve nükleotid dizileri Çizelge 3.3'de gösterildiği gibi sıralanmıştır.

**Çizelge 3.3.** *M. luteus* Sr021 suşunun sekans analiz sonuçları

Suşun Kodu	16S rDNA ile Tanımlama ve % Homoloji	EMBL Numarası	Nükleotid Baz Dizisi
Sr021	<i>Micrococcus luteus</i> (%99) <i>Micrococcus endophyticus</i> (%99) <i>Micrococcus antarcticus</i> (%98) <i>Micrococcus flavus</i> (%97) <i>Arthrobacter ramosus</i> (%96) <i>Arthrobacter pascens</i> (%96) <i>Arthrobacter nicotianae</i> (%95) <i>Arthrobacter soli</i> (%95) <i>Kocuria aegyptia</i> (%94) <i>Rothia nasimurium</i> (%93)	NR 037113 NR 044365 NR 025285 NR 043881 NR 026193 NR 026191 NR 026190 NR 044338 NR 043511 NR 025310	GCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAAC GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTA ACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTA ATACCGGATAGGAGCGCCACCGCATGGTGG GTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGAC TCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAAATG GCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCT GAGAGGGTGACCGGCCACTGGGACTGAGA CACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA TGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCT TCGGGTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAA GCCAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCAC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA ACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATG GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGG TCTGTGCTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGA TCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCA GTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGG TGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA TGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGA CGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAA CGTTGGGCACTAGGTGTGGGACCATTCAC GTTTCGCGCGCAGCTAACGCATAAGTGCC

Sr dirençli Sr021 suşunun 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçları, yapılan biyokimyasal testler ve pigmentasyon oluşturması da dikkate alınarak NR 037113 Gen Bank No'lu %99 homoloji oranında *M. luteus* DSM20030 bakterisi olduğu belirlenmiştir.

### 3.7. Stronsiyum Dirençli Sr111 Suşunun DNA Sekans Analizi

DNA sekans analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır. Elde edilen nükleotid dizilerinin çift yönlü dizi analizi ile 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri bulunmuş ve nükleotid dizileri Çizelge 3.4'de gösterildiği gibi sıralanmıştır.

Çizelge 3.4. *M. luteus* Sr111 suşunun sekans analiz sonuçları

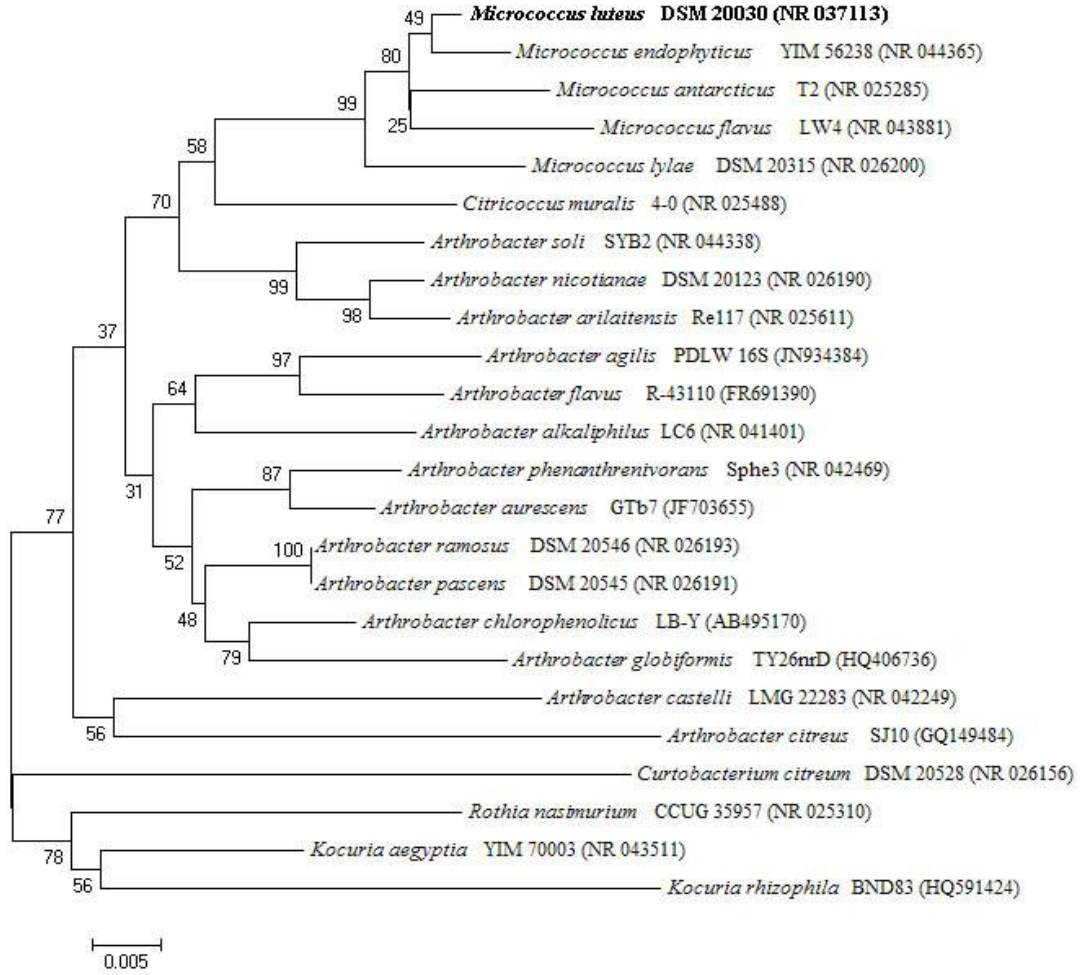
Suşun Kodu	16S rDNA ile Tanımlama ve % Homoloji	EMBL Numarası	Nükleotid Baz Dizisi
Sr111	<i>Micrococcus luteus</i> (%99) <i>Micrococcus endophyticus</i> (%99) <i>Micrococcus antarcticus</i> (%98) <i>Micrococcus lylae</i> (%98) <i>Micrococcus flavus</i> (%97) <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> (%96) <i>Citricoccus muralis</i> (%96) <i>Arthrobacter arilaitensis</i> (%95) <i>Arthrobacter alkaliphilus</i> (%94) <i>Curtobacterium citreum</i> (%93)	NR 037113 NR 044365 NR 025285 NR 026200 NR 043881 NR 042469 NR 025488 NR 025611 NR 041401 NR 026156	TGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGFTTACGG CATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCG CTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTA CAGCCCAGAGACCTGCCTTTCGCCATCGGTG TTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTAC ACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACTGCACTCT AGTCTGCCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGT TAAGCCCCGGACTTTCACGACAGACGCGACA AACCGCTACGAGCTCTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTCGACCCCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTT CTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGTTCTTCC CTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCG TCATCCCTCACGCGGCGTCTGCTGCATCAGGC TTGCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTG CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGT CCCAGTGTGGCCGGTCAACCCTCTCAGGCCGG CTACCCGTCGTGCCTTGGTGAGCCATTACCT CACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATC CAAAAACCGATAAATCTTTCCAACACCCACCA TGCGGTGGGCCTCCTATCCGGTATTAGACC CAGTTTCCCAGGCTTATCCCAGAGTTAAGGG CAGGTTACTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGG ACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTCATC

Sr dirençli Sr021 suşunun 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçları, yapılan biyokimyasal testler ve pigmentasyon oluşturması da dikkate alınarak NR 037113 Gen Bank No'lu %99 homoloji oranında *M. luteus* DSM20030 bakterisi olduğu belirlenmiştir.

### 3.8. Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

16S rRNA gen sekansları NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre BLAST analizi kullanılarak dizilmiştir [147]. Sıralanan tüm dizilerin MEGA 5 Bootstrap Test of

Phylogeny (neighbour-joining) yazılımı ile analiz edilmesi sonucunda Şekil 3.10'da gösterilen filogenetik ağaç oluşturulmuştur [148].



**Şekil 3.10.** *Micrococcus luteus*'un soy ağacı (0.005, nükleotidler arasındaki fark)

Türler arasındaki genetik uzaklığı en az olan suşları göstermek için filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinin türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için uzaklık matrisi hesaplanmıştır. Çizelge 3.5'de 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen distance matrisi verilmiştir. Bu çizelge kapsamında *Micrococcus luteus*'a en yakın birim 0.008 ile *Micrococcus endophyticus* suşu olduğu tespit edilmiştir. Bu değer iki suşun birbirlerine en yakın akraba olduklarının göstergesidir. *Micrococcus luteus*'a en uzak birim ise 0.078 ile *Kocuria rhizophila* suşudur. Bu değer ise iki suşun birbirleri ile akrabalık derecelerinin en uzak olduğunun göstergesidir.

**Çizelge 3.5.** 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri (distance matrix)

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Arthrobacter nicotianae</i>																							
<i>Arthrobacter romasus</i>	0.028																						
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	0.033	0.020																					
<i>Rothia nasimurium</i>	0.060	0.056	0.058																				
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	0.010	0.033	0.036	0.057																			
<i>Curtobacterium citreum</i>	0.073	0.071	0.077	0.079	0.072																		
<i>Arthrobacter castelli</i>	0.063	0.058	0.059	0.071	0.060	0.085																	
<i>Micrococcus luteus</i>	0.041	0.035	0.040	0.055	0.044	0.073	0.063																
<i>Kocuria aegyptia</i>	0.050	0.042	0.042	0.049	0.053	0.066	0.060	0.049															
<i>Micrococcus antarcticus</i>	0.044	0.046	0.048	0.064	0.045	0.081	0.062	0.017	0.055														
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	0.044	0.029	0.023	0.063	0.050	0.072	0.061	0.045	0.050	0.055													
<i>Micrococcus flavus</i>	0.048	0.048	0.053	0.063	0.045	0.082	0.061	0.018	0.063	0.024	0.057												
<i>Citricoccus muralis</i>	0.036	0.035	0.045	0.059	0.040	0.078	0.058	0.036	0.053	0.039	0.052	0.044											
<i>Arthrobacter soli</i>	0.018	0.028	0.038	0.065	0.021	0.070	0.065	0.041	0.053	0.045	0.047	0.054	0.034										
<i>Arthrobacter pascens</i>	0.028	0.000	0.020	0.056	0.033	0.071	0.058	0.035	0.042	0.046	0.029	0.048	0.035	0.028									
<i>Micrococcus lylae</i>	0.047	0.041	0.044	0.056	0.051	0.079	0.069	0.017	0.054	0.026	0.047	0.032	0.042	0.048	0.041								
<i>Micrococcus endophyticus</i>	0.043	0.041	0.044	0.061	0.046	0.076	0.067	0.008	0.053	0.016	0.051	0.021	0.039	0.044	0.041	0.020							
<i>Arthrobacter agilis</i>	0.056	0.043	0.038	0.064	0.053	0.078	0.058	0.052	0.052	0.056	0.046	0.060	0.042	0.051	0.043	0.058	0.056						
<i>Kocuria rhizophila</i>	0.078	0.074	0.070	0.069	0.081	0.094	0.080	0.078	0.056	0.084	0.079	0.091	0.074	0.080	0.074	0.083	0.081	0.078					

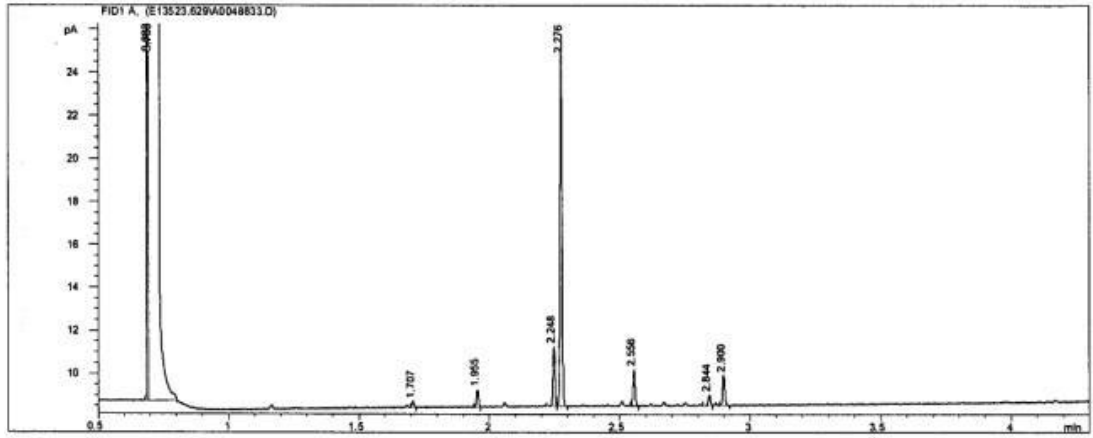


**Çizelge 3.5. (devam)**

<i>Arthrobacter aureescens</i>	0.042	0.017	0.028	0.063	0.047	0.067	0.059	0.045	0.049	0.055	0.015	0.055	0.047	0.041	0.017	0.049	0.051	0.049	0.079				
<i>Arthrobacter flavus</i>	0.050	0.033	0.029	0.068	0.047	0.074	0.064	0.053	0.055	0.057	0.032	0.061	0.049	0.045	0.033	0.055	0.057	0.024	0.081	0.036			
<i>Arthrobacter globiformis</i>	0.046	0.029	0.027	0.071	0.049	0.087	0.067	0.052	0.051	0.060	0.037	0.062	0.057	0.048	0.029	0.055	0.053	0.052	0.082	0.042	0.045		
<i>Arthrobacter citreus</i>	0.083	0.067	0.065	0.084	0.088	0.095	0.072	0.072	0.069	0.082	0.058	0.084	0.076	0.080	0.067	0.082	0.073	0.064	0.094	0.053	0.069	0.071	
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	0.048	0.030	0.034	0.066	0.050	0.074	0.055	0.056	0.055	0.063	0.039	0.065	0.049	0.044	0.030	0.056	0.060	0.038	0.079	0.033	0.034	0.046	0.064

### 3.9. Stronsiyum Dirençli Suşun Yağ Asit Metil Ester Analizi

Sherlock [127] tarafından tarif edilen metoda göre Sr dirençli suşun yağ asit metil ester analizi gerçekleştirilmiş ve yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları ve toplam yağ asitleri miktarları, analiz edilen örneğin kromatogramındaki pikleri, standarttaki bütün yağ asitlerinin metil esterlerinin alkonma zamanları Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.11. Sr dirençli suşun FAME analiz sonucu dendogramı (Agilent 6890, USA, cihaz çıktısı)

Volume: DATA File: E135236.29A Samp Ctr: 4 ID Number: 8833  
Type: Samp Bottle: 3 Method: RTSBA6  
Created: 5/23/2013 3:30:59 PM  
Sample ID: Sr11

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6921	344916	0.004	----	6.6743		----	< min rt	
0.7002	9.673E+8	0.016	----	6.7344	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.7075	335	0.008	1.027	12.7141	13:0 anteiso	1.33	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
1.9547	876	0.008	0.989	13.6282	14:0 iso	3.34	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
2.2479	3005	0.008	0.957	14.6317	15:0 iso	11.09	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.2756	18702	0.009	0.955	14.7241	15:0 anteiso	68.85	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.5556	1957	0.009	0.935	15.6343	16:0 iso	7.05	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
2.8437	628	0.008	0.920	16.5551	17:1 anteiso w9c	2.23	ECL deviates 0.003	
2.8995	1727	0.009	0.918	16.7326	17:0 anteiso	6.11	ECL deviates 0.000	Reference -0.008

ECL Deviation: 0.001 Reference ECL Shift: 0.007 Number Reference Peaks: 6  
Total Response: 27230 Total Named: 27230  
Percent Named: 100.00% Total Amount: 25937  
Profile Comment: Total response less than 50000.0. Concentrate and re-run.

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.531	Brevibacillus-choshinensis
	0.493	Paenibacillus-polymyxa (Bacillus)
	0.366	Arthrobacter-ramosus
	0.346	Arthrobacter-oxydans
	0.326	Micrococcus-luteus-GC subgroup B

Şekil 3.12. Sr dirençli suşun FAME profili (Agilent 6890, USA, cihaz çıktısı)

Yapılan yağ asit analizleri sonucunda Sr dirençli suşun yağ asitlerinin iso (i) ve anteiso (ai) formunda olduğu, %68.85 oranında pentadekanoik asit (ai-C<sub>15:0</sub>) ve %11.09 oranında pentadekanoik asit (i-C<sub>15:0</sub>) içerdiği bulunmuştur.

### 3.10. Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

#### 3.10.1. Stronsiyuma Dirençli Suşların Çoklu Metal Dirençlilik Profilleri

Stronsiyum dirençli suşların çoklu metal dirençlilikleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Sr021 suşu Ag, Sn, Li, Al ve Ba metallerine, Sr111 suşu ise Sn, Li ve Ba metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Sr021 suşunun Hg, Pb, Mn, Zn, Fe, Ni, Sb, Cd, Cr, Co ve Cu metallerine, Sr111 suşunun ise Hg, Pb, Mn, Zn, Fe, Ni, Sb, Ag, Cd, Al, Cr, Co ve Cu metallerine karşı kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.6.** Stronsiyuma dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profilleri

Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili	
		Sr021	Sr111
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	195	S	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	S	S
MnSO <sub>4</sub>	1000	S	S
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	S	S
FeCl <sub>3</sub>	450	S	S
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	395	S	S
K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1400	S	S
AgNO <sub>3</sub>	8	R	S
Cd(NO <sub>3</sub> ) 4H <sub>2</sub> O	750	S	S
SnCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	160	R	R
LiCl	5000	R	R
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	R	S
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	R	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9H <sub>2</sub> O	1100	S	S
Co(NO <sub>3</sub> ) 6H <sub>2</sub> O	750	S	S
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	S	S

(R); direçli, (S); duyarlı

### 3.10.2. Stronsiyuma Dirençli Suşların Çoklu Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Stronsiyum dirençli suşların çoklu antibiyotik dirençlilikleri Çizelge 3.7’de gösterilmiştir. Sr021 suşunun aminoglycosides antibiyotiklerinden gentamicin ve tobramicin’e, quinolones antibiyotiklerinden pefloxacin’e ve cephalosporins antibiyotiklerinden aztreonam’a, Sr111 suşunun ise β lactams antibiyotiklerinden Piperacilin’e, aminoglycosides antibiyotiklerinden Gentamicin ve Tobramicin’e, quinolones antibiyotiklerinden pefloxacin’e, cephalosporins antibiyotiklerinden

aztreonam'a ve sulfonamides antibiyotiklerinden trimethoprim-Sulfamethoxazole'ye çoklu antibiyotik dirençlilik gösterdiği belirtilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Stronsiyum dirençli suşların çoklu antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili	
	Sr021	Sr111
Ampicillin (AMP) (10)	S	S
Amoxicillin-Clavulanic acid (AMC) (20/10)	S	S
Oxacillin (OXA) (1)	S	S
Penicillin (PEN) (10)	S	S
Ticarcillin (TIC) (75)	S	S
Ticarcillin-Clavulanic acid (TIM) (75/10)	S	S
Amikacin (AMK) (30)	S	S
Gentamicin (GEN) (10)	R	R
Tobramicin (TOB) (10)	R	R
Ciprofloxacin (CIP) (5)	S	S
Pefloxacin (PEF) (5)	R	R
Aztreonam (ATM) (30)	R	R
Cefepime (FEP) (5)	S	S
Ceftazidime (CAZ) (30)	S	S
Sulbactam-Cefoperazone (CFP) (75/30)	S	S
Bacitracin (BAC) (10)	S	S
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) (25)	S	R
Tetracycline (TET) (30)	S	S
Rifampin (RIF) (5)	S	S
Erythromycin (ERY) (15)	S	S
Vancomycin (VAN) (30)	S	S
Chloramphenicol (CHL) (30)	S	S
Imipenem (IPM) (10)	S	S
Piperacilin (PIP) (100)	S	R
Piperacilin-Tazobactam (TZP) (100/10)	S	S

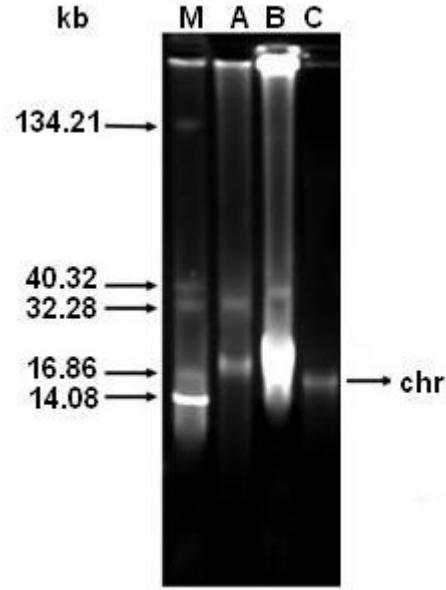
(R); dirençli, (S); duyarlı

### **3.11. Bakterilerin Plazmit DNA Analizi**

Stronsiyum dirençli Sr021 ve Sr111 suşlarının metal dirençliliği ile plazmit profilleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkartmak amacıyla metal içeren ve metal içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit ve kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır.

#### **3.11.1. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr021 Suşunun Plazmit DNA Analizi**

Stronsiyum dirençli *M. luteus* Sr021 suşunun plazmit DNA profili çıkarılarak kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.13'de gösterildiği gibi *M. luteus* Sr021 suşunun Sr içeren ve içermeyen her iki ortamda da 32.28 kb boyutunda plazmit varlığı gözlenmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 32.28 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *M. luteus* Sr021 suşunun Sr içeren ortamda ürettiği, gentamicin, tobramicin, pefloxacin ve aztreonam antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *M. luteus* Sr021 suşunda Sr direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

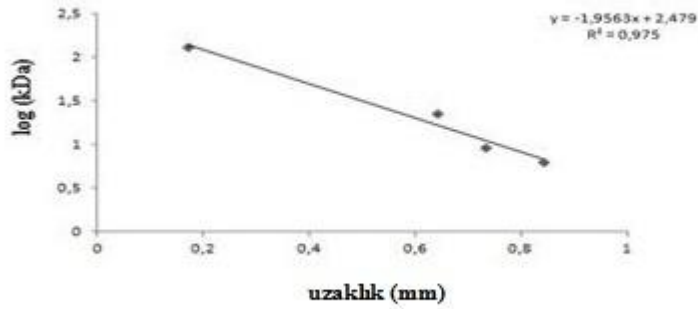


**Şekil 3.13.** *M. luteus* Sr021 suşunun plazmit DNA analizi

M: *Agrobacterium tumefaciens*, A: Sr içermeyen, B: Sr içeren ortam, C: Plazmit DNA eliminasyonu,

*Agrobacterium tumefaciens* moleküler ağırlığı bilinen plazmit marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit bantlarının moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır.

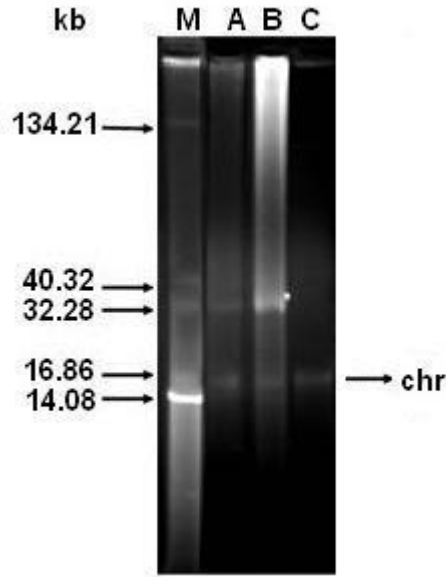
Şekil 3.14'de plazmit DNA moleküler ağırlıkların belirlenmesi için çizilmiş standart eğri gösterilmiştir.



**Şekil 3.14.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### 3.11.2. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr111 Suşunun Plazmit DNA Profili

Stronsiyum dirençli *M. luteus* Sr111 suşunun plazmit DNA profili çıkarılarak kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.15’de gösterildiği gibi *M. luteus* Sr111 suşunun Sr içeren ve içermeyen her iki ortamda da 32.28 kb boyutunda plazmit varlığı gözlenmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 32.28 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *M. luteus* Sr111 suşunun Sr içeren ortamda ürediği, gentamicin, tobramicin, pefloxacin, aztreonam, trimethoprim-sulfamethoxazole ve piperacilin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *M. luteus* Sr111 suşunda Sr direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



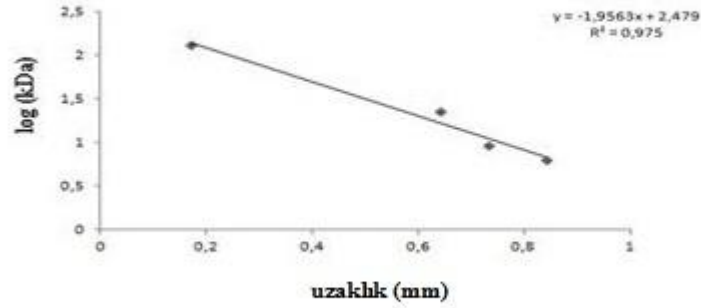
**Şekil 3.15.** *M. luteus* Sr111 suşunun plazmit DNA analizi

M; *Agrobacterium tumefaciens*, A; Sr içermeyen B; Sr içeren ortam, C; Plazmit DNA eliminasyonu,

*Agrobacterium tumefaciens* moleküler ağırlığı bilinen plazmit marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit bantlarının moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.16'da plazmit DNA moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için çizilmiş standart eğri gösterilmiştir.

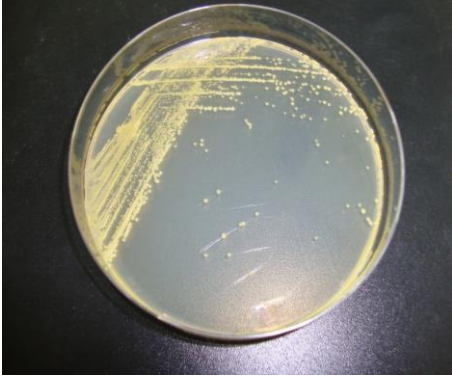


Şekil 3.16. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

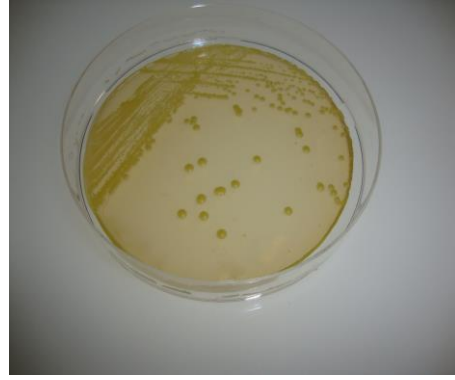
### 3.12. Plazmit Eliminasyon Sonrası Bakterilerin Pigmentasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzole edilen Sr dirençli bakteriler hem nutrient agar hem de nutrient broth ortamlarına ekilip 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Üremekte olan bakteriler, her 24 saatte bir ortam rengi açısından takip edilmiştir. Bakteriler 72 saat ve sonrasında hem nutrient agar hem de nutrient broth ortamlarında ortamın rengini pembeye çevirdikleri tespit edilmiştir. (Şekil 3.18)

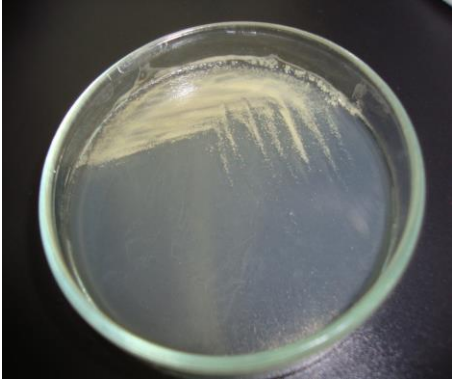
72 saat sonunda *M. luteus*'un ortamın rengini pembe yaptığı görülmüştür. Ancak bu renk değişimini yeteneğinin kromozomal DNA mı yoksa plazmit DNA mı üzerinde olduğuna karar verilememiştir. *Micrococcus luteus*'un plazmit DNA profilinden de yardım alınarak 32.28 kb'lık bir adet DNA plazmiti içerdiği görülmüştür. Daha önceden plazmit DNA eliminasyon yöntemi ile bu plazmiti giderilmiş örneklerden ekim yapılmıştır. 4 gün boyunca kültür gözlenmiş ancak herhangi bir renk değişimini gözlenmemiştir. Sonuç olarak ise *M. luteus*'un ortamın rengini değiştirme yeteneğinin plazmit DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. (Şekil 3.20).



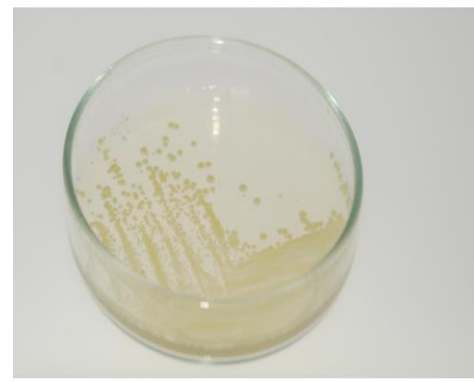
**Şekil 3.17.** Eliminasyon öncesi  
(24 saat inkübasyon)



**Şekil 3.18.** Eliminasyon öncesi  
(72 saat inkübasyon)



**Şekil 3.19.** Eliminasyon sonrası  
(24 saat inkübasyon)



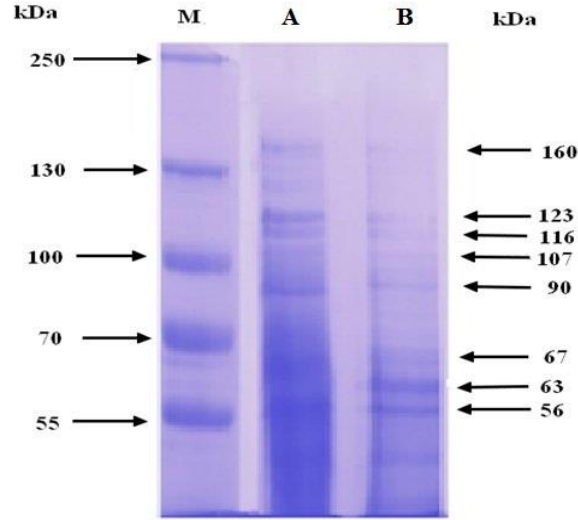
**Şekil 3.20.** Eliminasyon sonrası  
(72 saat inkübasyon)

### 3.13. Bakterilerin Total Protein Analizleri

#### 3.13.1. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr021 Suşunun Total Protein Analizi

Stronsiyum dirençli *M. luteus* Sr021 suşunun total protein profili belirlenmiştir. Şekil 3.21'de gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı olarak elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 160 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %82, 123 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %77, 116 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon

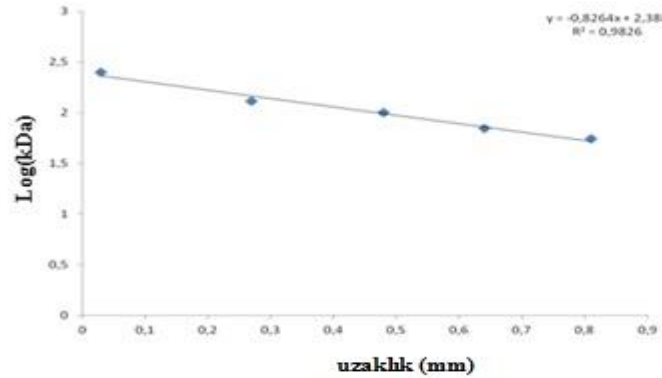
metalsiz ortama oranla %59, 107 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %57, 90 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %68, 63 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %62 ve molekül ağırlığı 56 kDa olan bantta metal ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %79 azalmıştır.



**Şekil 3.21.** *M. luteus* Sr021 suşunun total protein analizi

M; Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder),  
A; Sr içermeyen, B; Sr içeren ortam

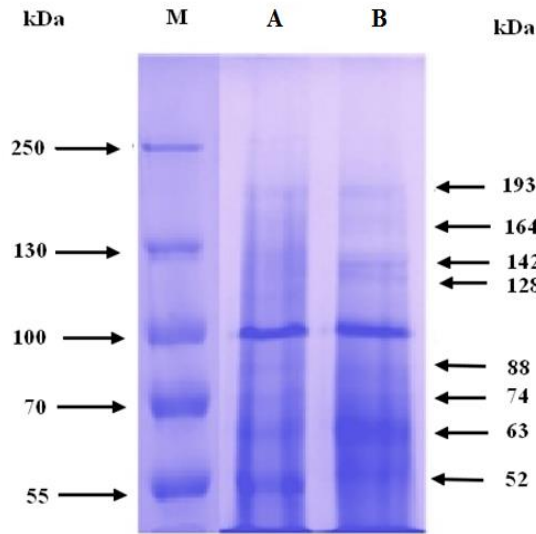
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder moleküler ağırlığı bilinen protein marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır. Şekil 3.22’de total protein moleküler ağırlıkların belirlenmesi için çizilmiş standart eğri gösterilmiştir.



**Şekil 3.22.** Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### 3.13.2. Stronsiyum Dirençli *M. luteus* Sr111 Suşunun Total Protein Analizi

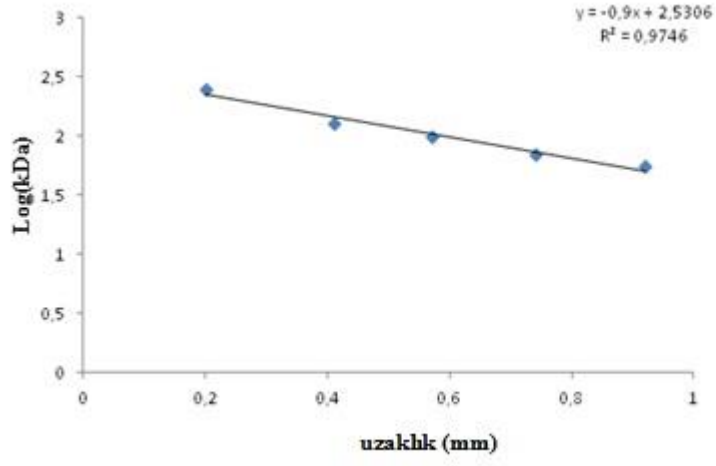
Stronsiyum dirençli *M. luteus* Sr111 suşunun total protein profili belirlenmiştir. Şekil 3.23'de gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı olarak elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 193 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %74 azalmıştır. Molekül ağırlığı 128 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %71, molekül ağırlığı 100 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %4 azalmıştır. Molekül ağırlığı 88 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %43, molekül ağırlığı 74 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %34, molekül ağırlığı 63 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %65 artmıştır. Molekül ağırlığı 52 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metallsiz ortama oranla %22 azalmıştır.



Şekil 3.23. *M.luteus* Sr111 suşunun total protein profili

M; Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder),  
A; Sr içermeyen, B; Sr içeren ortam

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder moleküler ağırlığı bilinen protein marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlıkları bu standart eğri üzerinden hesaplanmıştır. Şekil 3.24'de total protein moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için çizilmiş standart eğri gösterilmiştir.



Şekil 3.24. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

#### 4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenmiş olan 12 istasyondan toplanan su örneklerinden 7 istasyonda Sr dirençli bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler içerisinde MİK değeri 2000 mg/L olan iki suş 2. ve 11. bölgelerden izole edilmiş Sr021 ve Sr111 kodları verilerek sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Söz konusu her iki suşta biyokimyasal testler, 16S rDNA sekans ve yağ asidi analizleri kullanılarak *Micrococcus luteus* olarak tanımlanmıştır. Sr dirençli Sr021 suşu Kesikköprü Barajı su tutma bendinden izole edilmiştir. Kesikköprü Barajı su tutma bendinde Kızılırmak boyunca yerleşmiş olan sanayi kuruluşlarının atık suları bu bölgede toplanıyor olması olası bulaşım kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan Sr111 kodlu suş ise Mezbahane-Makina Kimya Enstitüsü (MKE) mevkiinden izole edilmiştir. *M. luteus*'un daha önce yapılan çalışmalarda hayvan derisinde ve dışkıında bol miktarda bulunduğu belirtilmektedir [149]. Söz konusu lokasyonun mezbahane alanında olması bulaşım kaynağının burada kesilen hayvanların atıklarından olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu bölgede savunma sanayisinde etkin rolü olan MKE Tesisleri bulunmaktadır. Sr savunma sanayisinde kullanılan ağır metallerden biridir [32].

Biyoremediasyon çalışmalarında kontaminant maddeleri parçalayabilen ve onları toksik olmayan yan ürünlere dönüştüren mikroorganizmaların büyümeleri teşvik edilerek mikroorganizmaların doğal olarak bu prosesinden yararlanır. Mikroorganizmalar birçok kontaminantlara maruz kaldığında artan bir yetenek ile bu maddeleri degrades etme yönünde bir gelişme gösterirler. Genellikle birden fazla toksik maddeleri parçalayarak enerji elde eden suşlar ön plana çıkmaktadır [52]. Bu suşlarda çoklu antibiyotik ve çoklu metal dirençliklerinin bir arada bulunması biyoremediasyon çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan bir durum haline gelmiştir. Bu amaçla Sr dirençli bakterilerin çoklu antibiyotik ve diğer ağır metallerle karşı olabilecek çoklu dirençlilik profilleri incelenmiştir. Sr021 *M. luteus* suşunun Ag, Sn, Li, Al ve Ba metallerine, Sr111 *M.luteus* suşu ise Sn, Li ve Ba metallerine çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençlilik profillerine bakıldığında ise Sr021 *M. luteus* suşunun gentamicin, tobramicin, pefloxacin ve aztreonam

antibiyotiklerine, Sr111 *M.luteus* suşu ise piperacilin, gentamicin tobramicin, pefloxacin, aztreonam ve trimethoprim-sulfamethoxazole antibiyotiklerine çoklu antibiyotik dirençlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Brendlyn ve arkadaşlarının [150] yaptığı bir çalışmada atık sulardan izole ettiği *M. luteus* için Sr MİK değerini 50 mg/L olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada Sr iyonlarının *M. luteus* tarafından hücre yüzeyine bağlanması ve metalin proteinlere bağlanması ile hücre içine alınarak giderildiği gösterilmiştir. Brown ve arkadaşları [151] yaptıkları bir çalışmada atık sulardan Sr dirençli *Shewanella oneidensis* suşunu izole etmişlerdir. Bu suşun Sr için MİK değeri 720 mg/L olduğunu göstermişlerdir. Simon ve arkadaşları [152] yaptıkları bir çalışmada atık sudan Sr ve Mg dirençli *Saccharomyces cerevisiae* suşunu izole etmişlerdir. Bu suşun Sr için MİK değerinin 200 mg/L, Mg için ise 400 mg/L olduğunu göstermişlerdir. Tajer ve arkadaşları [153] yapmış oldukları bir çalışmada radyoaktif atık sulardan Sr dirençli *Bacillus* sp. suşunu izole etmişlerdir. Bu suşun Sr için MİK değerinin 100 mg/L olduğunu göstermişlerdir. Jackson ve arkadaşlarının [154] yaptığı bir çalışmada Plankenburg nehriindeki metal konsantrasyonlarını Al için 11.56 mg/L, Ni için 0.17 mg/L, Fe için 12.2 mg/L olduğunu tespit etmişlerdir. Olası metal dirençliliğine sahip mikroorganizmalar ise *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Delftia tsuruhatensis*, *Kocuria kristiane*, *Comamonas testosteroni*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Sphingomonas* sp. ve *Microbacterium* sp. olarak tanımlanmışlardır. Bozanta ve arkadaşları [155] yaptıkları bir çalışmada radyoaktif atık sulardan izole edilen *M. luteus* için MİK değerleri toryum için 77 mg/L, uranyum için 38.8 mg/L ve bakır için 33.5 mg/L olduğunu göstermişlerdir. *M. luteus*'un toryum, uranyum ve bakır metallerine karşı çoklu metal dirençlilik gösterdiği belirtmiş ve radyoaktif atık sulardaki ağır metal giderilmesinde kullanılan mikroorganizmaların çok yönlü giderime katkıda bulunacağı belirtmişlerdir. Altalhi [156] yapmış olduğu çalışmada topraktan izole ettiği *M. luteus* suşunun Zn için MİK değeri 300 µg/mL, Cu için 40 µg/mL, Cd için 25 µg/mL, Ni için 300 µg/mL, Mn için 100 µg/mL, Pb için 1000 µg/mL olduğunu tespit etmiştir. Lo ve arkadaşlarının [157] yaptığı bir çalışmada metal içeren endüstriyel atık ve evsel atık sulardan 19 adet metal dirençli ve dirençli olmayan bakteriler izole etmişlerdir. Beş farklı metal için (Cu, Ni, Zn, Pb ve Cr) biyosorpsiyon kapasitesi incelenmiş ve metal konsantrasyonları 100 mg/L olarak tespit edilmiştir. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ve *M. luteus* suşlarının Cu ve Pb

metallerinin önemli miktarda giderilmesinde rolü olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda ise *M. luteus* suşunun Cu, Ni, Zn, Pb ve Cr metallerine çoklu metal dirençliliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Zaied ve arkadaşları [158] fabrikaların kirlettiği atık sulardan bakteri izolasyonu yapmışlardır. Biyokimyasal testler sonucu tanımlanan *M.luteus* suşunun çoklu antibiyotik dirençlilik profilleri incelenmiş, ampisilin, ibiamox, haiconcil, nystatin ve amoksilin antibiyotiklerine çoklu dirençlilik gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan biyoremediasyon çalışmalarında *M. luteus*'un Fe metalini %96, Sr metalini ise %48 oranında ortamdan giderdiğini göstermişlerdir. Sathiyamurthy ve arkadaşları [159] atık sulardan ve sedimentlerden izole ettikleri *M. luteus* suşunun çoklu metal ve çoklu antibiyotik dirençliliklerini birlikte incelemişlerdir. *M. luteus*'un Cd, Zn, Fe ve Hg metallerine; penisilin, ampisilin, kanamisin, streptomisin ve polimiksin antibiyotiklerine çoklu direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Maria ve arkadaşları [160] deniz suyundan izole ettikleri bakterilerin çoklu metal ve çoklu antibiyotik dirençliliklerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda *M. luteus* suşunun Cr, Cd, Zn ve Hg metallerine ayrıca kloramfenikol, ampisilin, streptomisin, tetrasiklin ve kanamisin antibiyotiklerine çoklu direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Dikbaş ve arkadaşları [161] Erzurum ili Oltu ilçesinde tatlı sulardan bakteri izolasyonu yapmışlar ve biyokimyasal testler ile tanımlamışlardır. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda tanımlanan *M. luteus* suşunun penisilin oksasilin ve apramisine çoklu antibiyotik dirençliliği olduğunu göstermişlerdir. Acar [162] yaptığı bir çalışmada antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için 10 bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* NRRL B-23, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Yersinia enterocolitica* RSKK 1501, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Proteus vulgaris* RSKK 96026, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375) ve bir maya (*Candida albicans*) türü kullanmıştır. Standart antibiyotik disk olarak, nistatin, ampisilin, penisilin, gentamisin, oksasilin ve tetrasiklin kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *Micrococcus luteus* suşunun ampisilin, penisilin, oksasilin ve tetrasikline çoklu antibiyotik dirençliliği gösterdiği ve minimum dirençliliğin ise tetrasikline olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara ile bizim yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında elde ettiğimiz sonuç *M. luteus*'un suşunun Sr direncinin çok daha fazla olduğu ve biyoremediasyon çalışmalarında kullanılabilirliği açısından



önemli bir potansiyel oluşturabileceği belirlenmiştir. Ayrıca *M.luteus* suşunun  $\beta$  lactam antibiyotiklerine daha çok direnç gösterdiği belirlenmiştir. Aktan [163] yaptığı çalışmada Kızılrınak'tan izole ettiği *E. faecalis*'in Sr (2000 mg/L), Al (300 mg/L), Ba (2700 mg/L), Cr (1100 mg/L), Fe (450 mg/L), Li (5000 mg/L), Ni (395 mg/L), Sn (160 mg/L), Ag (8 mg/L) ve Zn (825 mg/L) metallerine de dirençli olduğunu belirlemiştir. Ayrıca bu suşun amikasin, aztreonam ve gentamisin antibiyotiklerine karşı da dirençlilik gösterdiğini tespit etmiştir. Orman [164] yaptığı çalışmada lityum dirençli *S. aureus*'un antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profillerini incelemiş ve *S. aureus*'un Sr (2000 mg/L), Sn (160 mg/L), Ni (395 mg/L), Al (300 mg/L), Ag (8 mg/L), Ba (2700 mg/L) gibi metallere ve ampisilin, aztreonam, gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacilin, trimeth-sulfâ gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun ise Sr (2000 mg/L), Pb (1200 mg/L), Sb (1400 mg/L), Ag (8 mg/L), Li (5000 mg/L), Al (300 mg/L), Ba (2700 mg/L) gibi metallere ve bacitracin, oxacillin, trimeth-sulfâ gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Koçhan [165] yaptığı çalışmada Ni dirençli bakterinin çoklu antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profilini incelenmiştir. *Comamonas testosteroni* suşunun Sr (2000 mg/L), Al (300 mg/L), Li (5000 mg/L), Ba (2700 mg/L), Ag (8 mg/L), Sn (160 mg/L) metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Antibiyotik direnç profiline bakıldığında ise penicillin, ampisilin, sulbactam, oxacillin, vancomycin, gentamicin, netilcimin, pefloxacin, trimeth-sulfâ antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği saptanmıştır. Akbulut [166] yaptığı çalışmada Mn ve Zn dirençli bakterilerin çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini incelemiştir. Mn dirençli *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının Sr (2000 mg/L), Al (300 mg/L), Li (5000 mg/L), Ba (2700 mg/L), Pb (1200 mg/L), Fe (450 mg/L), Ag (8 mg/L), Cu (450 mg/L), Sn (160 mg/L), Ni (395 mg/L), Zn (825 mg/L), Sb (1200 mg/L) metallerine çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Zn dirençli *A. haemolyticus* suşunun ise Sr (2000 mg/L), Mn (1000 mg/L), Ag (8 mg/L), Cu (450 mg/L), Sn (160 mg/L), Li (5000 mg/L), Al (300 mg/L), Ba (2700 mg/L) ve Ni (395 mg/L) metallerine karşı çoklu direnç gösterdiğini belirtmiştir. Mn dirençli bakterilerden *S. marcescens*'in ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam antibiyotiklerine, *A. haemolyticus*'un ise aztreonam, ceftazidime, gentamicin, oxacillin, piperacillin,

piperacilin/tazobactam ve trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiştir. Zn dirençli *A. haemolyticus* suşunun ise gentamicin, pefloxacin, trimeth sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu dirençlilik gösterdiğini belirlemiştir. Serim [167] yaptığı çalışmada Kızılırmak'tan izole ettiği baryum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Sr (2000 mg/L), Li (5000 mg/L), Cr (1100 mg/L), Ag (8 mg/L) metallerine ve aztreonam, ceftazidim, gentamicin, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiğini tespit etmiş, baryum dirençli diğer bir şus olan *Stenotrophomonas rhizophila'nın* Sr (2000 mg/L), Al (300 mg/L), Li (5000 mg/L), Pb (1200 mg/L), Ag (8 mg/L), Sn (160 mg/L) ve Ni (395 mg/L) metallerine ve ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacın, gentamicin, erythromycin, imipenem, netilimin, oxacillin, pefloxacin, penicillin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ticarcillin, ticarcillin/CA, trimeth-sulfa ve tobramycin gibi antibiyotiklere karşı çoklu dirençlilik gösterdiğini belirlemiştir. Bu sonuçlar çoklu metal ve çoklu antibiyotik dirençliliğinin bu çalışmada bulunan suşlarda olduğu gibi bir arada bulunduğunu göstermesi açısından paralellik göstermektedir.

Son yıllarda biyokimyasal yöntemler yanında moleküler yöntemler bakteri tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bakterilerden 16S rRNA çoğaltılmasını sağlayan üniversal primer kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması filojenik çalışmalarda standart yöntem olarak yerini almıştır. Son 25 yılda, rRNA'yı kodlayan genlerin analizini içeren teknikler prokaryotik taksonomisini tamamen değiştirmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar rRNA genlerinin, protein sentezinin gerçekleştiği ribozomdaki önemli rollerinden dolayı evrimsel açıdan son derece korunmuş olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu korunmuşluk, ribozomal proteinlerin primer yapısını da yansıtmaktadır [168, 169]. Sr dirençli suşlar biyokimyasal olarak tanımlandıktan sonra moleküler olarak da tanımlamak için 16S rDNA sekans analizi yapılmıştır. Öncelikle suşlardan DNA izolasyonu yapılmış ve 16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer olan 27F ve 1492R kullanılmıştır. 16S rDNA sekans analizi ile tanımlama yapmak için *M. luteus*'un total DNA izolasyonu ve purifikasyonu yapılmış sonrasında ise evrensel primerler kullanılarak değişen sıcaklık ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında

PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonunda 59°C 3.75 µL (50 mM) MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda spesifik olmayan bağlanmaların olmadığı gösterilmiştir. Optimum şartlar altında yapılan PZR sonucu elde edilen bantların 16S rDNA sekansları belirlenmiş ve 16S rDNA sekanslarının NCBI Gen Bankası sonuçlarına göre Sr dirençli her iki suşunda NR 037113 Gen Bank No'lu %99 homoloji oranında *Micrococcus luteus* DSM20030<sup>T</sup> bakterisi olduğu belirlenmiştir. Salem ve arkadaşlarının [170] yaptığı bir çalışmada *M. luteus*'un PZR amplifikasyonu için iki evrensel oligonükleotid UP1-F/5' ve UP1-R/5' kullanılmışlardır. PZR amplifikasyonu 56°C'de gerçekleştirmişlerdir. Biyokimyasal özellikleri ve 16S rRNA (rDNA) geninin kısmi dizi analizi temelinde %99 homoloji oranında *Micrococcus luteus* DSM20030<sup>T</sup> olduğunu belirtmişlerdir. D'Onofrio [171] ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada atık sulardan bakteri izolasyonu yapmışlar ve izole edilen bakterilerin tanımlanmasında 27F ve 1492R primerleri kullanmışlardır. 16S rDNA sekanslarının NCBI gen bankasına göre sonuçlarında %99.5 homoloji oranında *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> bakterisi olduğunu belirtmişlerdir. Wieser ve arkadaşları [172] bataklıktan 9 adet bakteri izolasyonu yapmışlar, bu bakterilerin tanımlanmasında biyokimyasal ve 16S rDNA sekans analizini kullanmışlardır. Biyokimyasal testler ile *M. luteus* olarak tanımlanan tüm suşlar 16S rDNA sekans analizine göre ise %98 *M. luteus* DSM20030<sup>T</sup>, %98 *M. antarcticus* AS 1.2372<sup>T</sup> ve %97 *M. lylae* DSM 20315<sup>T</sup> olarak tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bizim yaptığımız çalışmadaki 16S rDNA sekans sonuçları paralellik göstermektedir.

İzole edilen bakteriler ayrıca yağ asidi metil ester analizi kullanılarak da tanımlanmaya çalışılmıştır. İzole edilen suşların yağ asitleri metil esterlerinin dendogramları ve toplam yağ asitleri miktarları tespit edilerek tanımlanmıştır. Yapılan yağ asit analizleri sonucunda *M. luteus*'da sırayla %68.85 oranında pentadekanoik asit (ai-C<sub>15:0</sub>), %11.09 oranında pentadekanoik asit (i-C<sub>15:0</sub>), %7.05 oranında palmitik asit (C<sub>16:0</sub>), %6.11 oranında heptadekanoik asit (C<sub>17:0</sub>) bulunmuştur. Dastager ve arkadaşlarının [173] yapmış oldukları çalışmada *Micrococcus* sp. için yağ asidi metil ester analizi çalışmaları sonucunda i-C<sub>15:0</sub>, ai-C<sub>15:0</sub>, ai-C<sub>17:0</sub> ve i-C<sub>17:0</sub> yağ asitleri baskın formları, küçük miktarlarda i-C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, i-C<sub>11:0</sub> 3-OH ve i-C<sub>14:0</sub> yağ asitlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Salem ve

arkadaşlarının [170] yapmış olduğu çalışmada *M. luteus* için yapılan yağ asit metil ester analizinde en çok ai-C<sub>15:0</sub> (49.42%) ve i-C<sub>15:0</sub> (32.63%) olduğunu göstermişlerdir. Wieser ve arkadaşları [172] yapmış oldukları çalışmada *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> suşu için yapılan yağ asidi metil ester analizinde %52.5 ai-C<sub>15:0</sub> %37.3 i-C<sub>15:0</sub> olduğunu göstermişlerdir. Sivasamy ve arkadaşarı [174] yapmış oldukları çalışmada *M. luteus* için yapılan yağ asidi metil ester analizinde %51.50 oranında palmitik asit (C<sub>16:0</sub>) olduğunu göstermişlerdir. *M. luteus*'un tanımlanmasında i-C<sub>15:0</sub> ve ai-C<sub>15:0</sub> yağ asitlerinin belirleyici etkide olduğu, bu çalışmalarda yağ asit analizi yapılan *M. luteus* için çıkan değerlerinin çalışmamız ile karşılaştırıldığında paralellik gösterip oldukça düşük yüzdede olduğu dikkat çekicidir. Ancak Vreeland ve arkadaşları [131] yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bakteri ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür (species) düzeyinde ayırım yapmadığı ancak cins (genus) farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır. Mırık ve arkadaşlarının [175] yapmış olduğu çalışmada Doğu Akdeniz bölgesinden bakteri izolasyonu yapmış ve bakterilerin tanımlanması için geleneksel ve yağ asidi analizi yöntemini kullanmıştır. Geleneksel yöntemle 170 bakteri suşu tespit edilmiştir. Seçilen 19 bakterilerin yağ asidi analizi yöntemi ile tanımlanmasında %37-76 arasında değişen bir benzerlik endeksi tespit edilmiştir. Suşların yağ asidi analizi ile cins düzeyinde tanımlamanın yararlı olacağını ancak tür belirlenmesinde bu yöntemin bir yarar sağlamayacağını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda bulduğumuz FAME sonuçları destekler niteliktedir.

Plazmitlerin taşıdığı genler, çoğunlukla transpozonlar ve insersiyon elementler gibi hareketli genom bölgeleri ile ilişkilidir. Bu sayede söz konusu genlerin bölge spesifik rekombinasyon aracılığı ile yer değiştirmesi mümkün olmaktadır. Bazı durumlarda transpozisyonel yapılar, plazmitlerle kromozomlar, virüsler ya da başka plazmitler arasında da oluşabilmektedir. Bu durumun en tipik örneği ilaç dirençlilik genlerinde saptanmıştır [176]. Antibiyotik dirençlilik adaptif bir mekanizma olduğu için dirençlilik ve virülenslik genleri evrimleşmeleri açısından büyük oranda ortak özellikler içermektedirler. Her iki özelliği kodlayan genler veya gen gruplar kromozomal DNA ve plazmit DNA üzerinde bulunabilmektedir. Bu genlerin genomda farklı DNA moekülleri üzerinde bulunması, hareketli elementler ya da

virüsler tarafından taşınması ile gerçekleşmektedir. Yapılarında antimikrobiyal dirençlilik genlerini taşıyan çok sayıda transpozon ya da insersiyon elementi tanımlanmıştır [177]. Çalışmamızda Sr dirençliliği ve antibiyotik dirençliliğinin plazmit DNA ve kromozomal DNA ile ilişkisini belirlemek amacı ile Sr dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda her iki suşunda Sr içeren ve içermeyen ortamda da 32.28 kb boyutunda plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 32.28 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *M. luteus* Sr021 suşunun Sr içeren ortamda ürettiği, gentamicin, tobramicin, pefloxacin ve aztreonam antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği belirlenmiştir. Aynı şekilde plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 32.28 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *M. luteus* Sr111 suşunun Sr içeren ortamda ürettiği, gentamicin, tobramicin, pefloxacin, aztreonam, trimethoprim-sulfamethoxazole ve piperacilin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *M. luteus* suşlarının Sr direnç genlerinin plazmit ile ilişkili olmadığı ve kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Liebl ve arkadaşlarının [178] yaptığı bir çalışmada atık sulardan izole edilen *M. luteus* suşunun biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu çalışmalar kapsamında *M. luteus* suşunun eritromisin ve linkomisine dirençli olduğu belirtilmiştir. *M. luteus* suşunda 4.2 kb'lık plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda plazmidi giderilmiş ve eritromisin dirençliliğinin de kaybedildiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda eritromisin dirençlilik geninin plazmit DNA üzerinde olduğu gösterilmiştir. Santo ve arkadaşları [179] yapmış oldukları çalışmada Cu dirençli *M. luteus* suşunun plazmit profillerini incelemişlerdir. Yapılan plazmit eliminasyon çalışmaları doğrultusunda 5.7 kb'lık plazmiti giderilmiş *M.luteus* suşunun Cu içeren ortamda ürettiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda *M. luteus* suşunun Cu dirençlilik geninin kromozomal DNA üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Tavasaki ve arkadaşları [180] yaptıkları bir çalışmada antibiyotik dirençliliğinde plazmitin rolünü tespit etmek için su örneklerinden 20 antibiyotik kullanarak bakteri izolasyonu yapmış ve bunların çoklu antibiyotiğe dirençli olanları seçmişlerdir. Seçilen bakterilerden gram negatif olanlar *Neisseria mucosa*, *N. sicca*, *Branhamella catarrhalis*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter intermedium*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Enterobacter aerogenes* olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif olanların ise *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* ve

*Micrococcus luteus* olarak tanımlanmışlardır. Bu suşlar penicilin, ampisilin, tetrasiklin, amoksisilin, kanamisin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğunu göstermişlerdir. karşı dirençli olduğunu göstermişlerdir. Yapılan plazmit DNA çalışmaları sonucunda molekül ağırlığı 2850-3170 bp aralığında plazmit olduğu belirtilmiştir. Yapılan plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda penicilin, ampisilin, tetrasiklin, amoksisilin, kanamisin ve kloramfenikole karşı dirençliliğin ortadan kalktığını ve antibiyotik dirençliliğinde plazmitin önemli bir yeri olduğunu göstermişlerdir. Oladipo ve arkadaşları [181] izole ettikleri *M. luteus* suşunun Cu, Zn, Co, Ni metallerine çoklu metal dirençlilik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 3258 pb'lık plazmidi giderilmiş *M. luteus* suşunun Cu, Zn, Co ve Ni metallerine karşı direncinde bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda çoklu dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğunu göstermişlerdir. Martin ve arkadaşları [182] yapmış oldukları bir çalışmada Arjantin sulak alanlardan eritromisine dirençli *M. luteus* suşunu izole etmişlerdir. Yapılan plazmit çalışmaları sonucunda *M. luteus*'da 8.6 kb'lık pLMA1, 6.2 kb'lık pLMH5 ve 4.5 kb'lık pLMV7 kodları verilen 3 plazmit olduğunu göstermişlerdir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında 8.6 kb'lık pLMA1 plazmiti elimine edilmiş ve *M. luteus* suşunun eritromisin içeren ortamda üremediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda pLMA1 plazmiti üzerinde eritromisin dirençlilik geninin olduğunu göstermişlerdir.

Endüstriyel atık suların en önemli kirleticilerinden olan ağır metal iyonları bazı mikroorganizmalar tarafından bu iyonlarca kirletilmiş sulardan kolaylıkla uzaklaştırılmaktadır. Bu canlılar tarafından gerçekleştirilen ağır metal giderimi, ağır metallerle karşı canlı hücrenin oluşturduğu çeşitli direnç mekanizmaları ile mümkün olmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış mikrobiyal direnç mekanizmaları metalin hücre içine alınmaması, metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması, metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi, metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması ve metalin hücre dışında tutulması gibi sistemleri kapsamaktadır. Bu direnç sistemleri tamamen proteinlerle kontrol edilmektedir. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek için bazı proteinlerin sentezini arttırma veya farklı proteinler sentezleme yoluna gidebilmektedir [183]. Çalışmamızda proteinlerin metal ekspresyonuna etkisini belirlemek için Sr dirençli

*M. luteus* Sr021 suşunun total protein profili incelenmiştir. Molekül ağırlığı 160 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %82, 123 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %77, 116 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %59, 107 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %57, 90 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %68, 63 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %62 ve molekül ağırlığı 56 kDa olan bantta metal ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla % 79 azalmıştır. Sr dirençli *M. luteus* Sr111 suşunun total protein profili belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 193 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %74 azalmıştır. Molekül ağırlığı 128 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %71, molekül ağırlığı 100 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %4 azalmıştır. Molekül ağırlığı 88 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %43, molekül ağırlığı 74 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %34, molekül ağırlığı 63 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %65 artmıştır. Molekül ağırlığı 52 kDa olan bantta metalli ortamdaki ekspresyon metalsiz ortama oranla %22 azalmıştır. Özer ve arkadaşları [34] yapmış olduğu çalışmada stronsiyuma dirençli *S. paucimobilis* ve *P. fluorescens* suşlarının total ve dış membran protein analizlerini yapmışlardır. Metal varlığında total ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermişlerdir. Romansu ve arkadaşları [184] yapmış oldukları çalışmada arsenik dirençli *M. luteus* suşunun total protein profillerini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda 85 kDa ve 79 kDa ağırlığındaki bantların metal ekspresyonunda etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Kung ve arkadaşları [185] yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri *M.luteus*'da w proteinin olduğunu belirtmişlerdir. W proteini Mg metalinin giderilmesine katkıda bulunduğunu ve antimikrobiyal etkiye neden olduğunu belirtmişlerdir. Auda ve arkadaşları [186] yapmış oldukları çalışmada Zn dirençli *M. luteus*'un protein profili incelemiş ve metal ekspresyonunda total proteinin etkili olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan bu tez çalışması ile Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan stronsiyum ağır metale karşı dirençli suşların izolasyonu, identifikasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu incelenmiştir. Biyokimyasal testler, yağ

asidi ve 16S rDNA sekans analizi esas alınarak Sr dirençli suşlar tanımlanmıştır. Sr dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere karşı çoklu dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Genetiksel karakterizasyon çalışmalarında suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran proteini ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Ancak, stronsiyuma dirençli mikrobiyal sistemler ve stronsiyum iyonlarına karşı direnç sağlayan temel moleküler mekanizmalar hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu bakımdan yapılan bu çalışmanın literatürde bu konuda olan eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen lokal suşların Sr biyoremediasyon çalışmalarında etkin olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.



## KAYNAKLAR

- [1] 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.
- [2] Çepel, N., Ekolojik Sorunlar ve Çözüm Önerileri, Tübitak Popüler Bilim Kitapları. 183, 2003.
- [3] Keleş, S. ve Göl, C., Çok fonksiyonlu bir orman çıktısı: Su. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Tabiat ve İnsan Dergisi. 1 (2): 3-12, 2004.
- [4] Gacriescu M., Removal of heavy metals from environment by biosorption. Engineering in Life Sciences. 3, 219-232, 2004.
- [5] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri. 1, 12, 2002.
- [6] Doğan, M. ve Soylak, M., Su Kimyası. Erciyes Üniversitesi Yayınları. 120. Kayseri, 2000.
- [7] Bilim-Teknoloji-Sanayi Tartışmaları Platformu Deniz ve Denizaltı Kaynaklarından Yararlanma Teknoloji Çalışma Grubu, Bütünleşik Kıyı Yönetim Alt Grup Raporu. TÜBİTAK Bilim ve Teknoloji Politikaları Daire Başkanlığı, Ankara, 2002.
- [8] Dönmez, G.Ç., Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T., A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. Process Biochemistry. 34, 885-892, 1999.
- [9] Lee, S.H., Yang, J.W., Removal of Cu in aqueous solution by apple wastes. Separation Science and Technology. 32 (8): 1371-1387, 1997.

- [10] Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*. 37, 4311-4330, 2003.
- [11] Iyer, A., Mody, K. And Jha, B., Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*. 50 (3): 340-343, 2005.
- [12] Jordao, C.P., Pereira, J.C., Brune, W., Pereira, J.L., Braathen, P.C., Heavy metal dispersion from industrial wastes in the vale do aço. *Environmental Technology*. 17 (5): 489-500, 1996.
- [13] Akman, Y., Ketenöğlu, O., Evren, H., Kurt, L., Düzenli, S., Çevre kirliliği, Çevre biyolojisi. 168. Palme Yayıncılık, Ankara. 2000.
- [14] Toroğlu, E., Toroğlu, S., Alaeddinoğlu, F., Water pollution in the Aksu River. *Coğrafi Bilimler Dergisi*. 4 (1): 93-103, 2006.
- [15] Mascher, F., Bacteriological examinations of drinking water in the district of Melut (Upper Nile Province) South Sudan. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*. 31, 23-30, 1987.
- [16] De, A., Sen, P.C., Tewari, I.C., Enteropathogenic bacteria in river Ganges in Varanasi. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 36, 425-432, 1993.
- [17] Tünay, O., Endüstriyel Kirlenme Kontrolü. İstanbul İTÜ Yayınları. 1578, 130, 1996.
- [18] Nieboer, E., Richardson, D.H.S., The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environment Pollution*. 1, 3-26, 1980.
- [19] Roesijadi, G., Robinson, W.E., Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation and Release. *Aquatic Toxicology*. 387-420. Ed: by D.C. Malins and G.K. Ostrander. Lewis Publishers, Boca,

Raton, LA, 1994.

- [20] Siegel, F. R., Environmental Geochemistry of Potential Toxic Metals. Verlag Berlin Heidelberg. New York, 2002.
- [21] M. Türkoğlu, Van Gölünden Alınan Su, Sediment ve İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas, 1811) Örneklerinde Bazı Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 2008.
- [22] Ustun, G.E., The assessment of heavy metal contamination in the waters of the Nilüfer Stream in Bursa. *Ekoloji*. 20 (81): 61-66, 2011.
- [23] Gadd, G.M., Microbial control of heavy metal pollution. 59–88. Cambridge Press, Cambridge, 1992.
- [24] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van, T.M., Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*. 17, 177-184, 1994.
- [25] Rainbow, P. S., Phillips, D.J.H., Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. 26 (11): 593-601, 1993.
- [26] Rainbow, P.S., Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 31, 183-192, 1995.
- [27] Rainbow, P.S., Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what?. *Environmental Pollution*. 120, 497-507, 2002.
- [28] Yazkan, M., Özdemir, F., Gölükçü, M., Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacean in the Gulf of Antalya. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 28, 95-100, 2004.

- [29] <http://www.mineralienatlas.de/lexion/index.php/strontium> (Erişim tarihi: 08.05.2013)
- [30] <http://mineral.galleries.com>; <http://webmineral.com> (Erişim tarihi: 08.05.2013)
- [31] U. Kaplan, Sıvı Nükleer Atıklardan Stronsiyumun Uzaklaştırılmasında Hidrolizlenmiş Poliakrilonitril Fiberin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 2008.
- [32] [http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden\\_kullanim#stronsiyum](http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanim#stronsiyum) (Erişim tarihi: 08.05.2013)
- [33] Khan, M.M.A., Umar, R., Lateh, H., Study of trace elements in groundwater of western uttar pradesh. Scientific Research and Essays. 5 (20): 3175-3182, 2010.
- [34] Özer, G., Ergene, A. and İçgen, B., Biochemical and molecular characterization of strontium-resistant environmental isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Sphingomonas paucimobilis*. Geomicrobiology Journal. 30 (5): 381-390, 2013.
- [35] Özdemir, F., Esen, E., Strontium and osteoporosis. Osteoporoz Dünyasından 10 (2): 77-79, 2004.
- [36] Brandi, M.L., New treatment strategies, ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs, American Journal of Medicine. 95, 69-74, 1993.
- [37] Marie, P.J., Optimizing bone metabolism in osteoporosis, insight into the pharmacologic profile of Strontium Ranelate, Osteoporos International. 14 (13): 9-12, 2003.

- [38] Wang, Y., Zhang, H., Guo, D., Pei, Z., Sr(II) Removal from aqueous solution by *Pseudomonas fluorescens* biomass, equilibrium and kinetic studies, Third International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation. 3, 326-329, 2011.
- [39] McKay, G., Use of Adsorbents for the Removal of Pollutants From Wastewaters. CRC Press, USA, 1996.
- [40] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/periodik/kullanim2.html>  
(Erişim tarihi: 09.05.2013)
- [41] <http://www.osteoporozdunyasindan.com/tr/makale/190/31/Tam-Metin>  
(Erişim tarihi: 09.05.2013)
- [42] Sağ, Y., Kaya, A., Ağır Metal İyonlarının *R. arrhizus*'a Çok Bileşenli Biyosorpsiyonunun İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, 1-14, 1999.
- [43] Wilmoth, R.C., Kennedy, J.L., Removal of trace elements from acid mine drainage. Industrial Environmental Research Laboratory. 1979.
- [44] Liu, H., Chenb, B., Lana, Y., Chenga, Y., Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. Chemical Engineering Journal. 97, 195-201, 2004.
- [45] McDonald, D.G., Grandt, A.F., Limestone-lime treatment of acid mine drainage. EPA Project Summary, 600 (7): 81-33, 1981.
- [46] Nataraj, S.K., Sridhar, S., Shaikha, I.N., Reddy, D.S., Aminabhavi, T.M., Membrane-based microfiltration/electrodialysis hybrid process for the treatment of paper industry wastewater. Separation and Purification Technology 57, 185-195, 2007.

- [47] Volesky, B., Detoksification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. 59, 203-216, 2001.
- [48] A. Çabuk, Removal of Heavy Metals from Waste Water Using Immobilized Bacterial Biomass in Fixed Bed Bioreactor. Yüksek Lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2001.
- [49] Ahalya, N., Ramachandra, T.V., Kanamadi, R.D., Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemistry And Enviroment*. 7 (4): 71-79, 2003.
- [50] Ahluwalia, S.S., Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. 1-15, 2006.
- [51] Ö. Akçelik, Ağır Metallerin *Saccharomyces cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [52] Alexander, M., Biodegradation and bioremediation second edition. Academic Press, New York, 1999.
- [53] Frazar, C., The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites. National Network of Environmental Studies. 2000.
- [54] Strong, P. J., Burgess, J. E., Treatment methods for wine-related ad distillery wastewaters: a review. *Bioremediation Journal*. 12, 70-87, 2008.
- [55] Boopathy, R., Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol*. 74, 63-67, 2000.
- [56] Vidali, M., Bioremediation an overview. *Pure Application Chemistry*. 73 (7): 1163-1172, 2001.
- [57] B.E. Taştan, Atık Sulardan Bakır (II), Nikel(II), Krom(VI) ve Reaktif Boyar

Madde Gideriminde *Aspergillus* sp. Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008.

- [58] Rajendran, P. and Gunasekaran, P., Nanotechnology for bioremediation of heavy metals. School of Biological Sciences. 211-221, 2007.
- [59] Tsezos, M., Volesky, B., Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering*. 23, 583-604, 1981.
- [60] Shumate, S.E., Standberg, G.W., Parrott, J.R., Biological removal of metal ions from aqueous process streams. *Biotechnology and Bioengineering*. 30 (2): 169-174, 1995.
- [61] Kuyucak, N., Volesky, B., Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters*. 10, 147, 1988.
- [62] Rocha-Gutierrez, B.A., Method Development For Pesticides Analysis In Breast Milk Using Stir Bar Sorptive Extraction Followed. Thesis master of Science. The University of Texas, USA, 2005.
- [63] İmre, Z., Toksikoloji. Doyuran Matbaası, İstanbul, 1988.
- [64] Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., Phytoremediation of metals using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Birstechnology*. 8, 221-226, 1997.
- [65] Micheal, R., Contaminants and remedial options at select metals-contaminated sites. *Environment Protection Authority*. 540 (95): 512, 1995.
- [66] Glass, D.J., Economic Potential of Phytoremediation. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. 15-31. Ed: by I. Raskin, B.D. Ensley, John Wiley and Sons Inc., New York, 1999.

- [67] Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., Phytoremediation, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 49, 643–668, 1998.
- [68] Grass, G., Rensing, L., Rensing, C., Metal toxicity. Metallomics. 3, 1095-1097, 2011.
- [69] R.S. Balcı, Seyhan Baraj Gölü'nün Bakteriyolojik Kirlilik Düzeyinin Belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik Dirençliliği. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [70] Madigan, M.T., Matinko, J.M., Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
- [71] <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx>  
(Erişim tarihi: 10.05.21013)
- [72] Ekici, H., Yarsan, E., Antibiyotiklere direnç ve dirençliliğin boyutlarının çok yönlü değerlendirilmesi. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi. 8 (3-4): 85-93, 2008.
- [73] G. Çıtır, A Study on Cobalt Adaptation and Memory Retention of Freshwater Bacteria Isolates. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2010.
- [74] P. Özdemir, Atık Ekmek Mayası Kullanılarak Nikel (II)'nin Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 2002.
- [75] Gadd, G.M., Molecular Biology and Biotechnology of Microbial Interactions With Organic and Inorganic Heavy Metal Compounds. Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. 225-257. Ed: by: R.A. Herbert, R.J. Sharp, Glasgow, 1992.
- [76] Rouch, D.A., Lee, B.T.D. and Morby, A.P., Understanding cellular responses



- to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14, 132-141, 1995.
- [77] Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W., Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45, 198-207, 2000.
- [78] Rensing, C., Grass, G., *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 27, 197-213, 2003.
- [79] Canovas, D., Cases, I., Lorenzo, V., Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environmental Microbiology*. 5, 1242-1256, 2003.
- [80] Magnani, D., Solioz, M., How Bacteria Handle Copper. University of Berne, Dept. of Clinical Pharmacology. 260-278, 2007.
- [81] Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yue, Z.B., Production of extracellular polymeric substances from *Rhodopseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69, 216-222, 2005.
- [82] 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.
- [83] Aquino, S.F., Stuckey, D.C., Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*. 38, 255-266, 2004.
- [84] Cervantes, C. and Gutierrez-Corona, F., Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 14, 121-138, 1994.
- [85] Nies, D.H., Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and*

Biotechnology. 51, 730-750, 1999.

- [86] Stafford, S.J., Humpreys, D.P. and Lund, P.A., Mutations in *dsbA* and *dsbB*, but not *dsbC*, lead to an enhanced sensitivity of *Escherichia coli* to Hg<sup>+2</sup> and Cd<sup>+2</sup>. FEMS Microbiology Letters. 174, 179-184, 1999.
- [87] Silver, S. and Phung, L.T., A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 32, 587-605, 2005.
- [88] Muyzer, G., DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology. 2, 317-322, 1999.
- [89] Muyzer, G. and Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 73, 127-141, 1998.
- [90] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. FEMS Microbiology Reviews. 59, 143-169, 1995.
- [91] Sanz J.L., Kochling T.K., Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. Process Biochemistry. 42, 119-133, 2007.
- [92] Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Florent C., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Steina, O.R., Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review, Ecological Engineering. 35, 987-1004, 2009.
- [93] Ludwig, W. and Schleifer, K.H., Bacterial Phylogeny Based on 16S and 23S rRNA Sequence Analysis, FEMS Microbiology Reviews. 15 (2-3): 155-173, 1994.

- [94] Çallı, B., Mertoğlu, B., Roest, K., İnanç, B., Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology*. 97, 641-647, 2006.
- [95] Demirel, S., Molecular techniques for determining microbial diversity in treatment systems. *Journal of Engineering and Natural Sciences*. 30, 179-192, 2012.
- [96] Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Pazarlıoğlu, N., *Biyoinformatik I, Yağ Asit Profillerine Göre Mikroorganizmaların Tanısı ve Karakterizasyonu*, İzmir, 2003.
- [97] Persing, H.D., Polymerase chain reaction: Trends to benches. *Journal of Clinical Microbiology*. 29, 1281-1285, 1991.
- [98] Prichard, R., Tait, A., The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitol*. 98, 169-194, 2001.
- [99] McPherson, M.J., Moller, S.G., *The Basics*. Cromwell Press, New York, 1-45, 2000.
- [100] Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 101-107. Ed: by G. Temizkan, N. Arda, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2004.
- [101] Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Research in Microbiology*. 155 (6): 409-421, 2004.
- [102] Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M., The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition. New York, 79-98,

1992.

- [103] Hadidi, A., Levy, L., Podleskis, E.V., Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology. Molecular Methods in Plant Pathology. 167-187. Ed: by R. P. Singh, U. S. Singh. CRS Press, Boca, Raton, 1995.
- [104] Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs. PCR Protocols a Guide to Methods and Applications. 3-12. Ed: by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press. New York, 1990.
- [105] Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J., Recent advances in polymerase chain reaction. Science. 252, 1643-1650, 1991.
- [106] [http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR\\_sketch\\_3.gif](http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_sketch_3.gif)  
(Erişim tarihi: 24.05.2013)
- [107] Siqueira, J.F., Roças, I.N., PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. Journal of Dentistry. 31 (5): 333-339, 2003.
- [108] Schochetman, G., Jones, K.W., Polymerase chain reaction. Infectious Diseases. 158, 1154-1157, 1988.
- [109] [http://biltek.tubitak.gov.tr/merak\\_etiklerini/index.php?kategori\\_id=2&oru\\_id=4949](http://biltek.tubitak.gov.tr/merak_etiklerini/index.php?kategori_id=2&oru_id=4949)  
(Erişim tarihi: 15.05.2013)
- [110] Leblond-Bourget, N., 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. International Journal of Systemic Bacteriology. 102-111, 1996.
- [111] Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., Molecular biology techniques in parasite ecology. International Journal of Parasitology. 32, 551-562, 2002.

- [112] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 5463-5467, 1977.
- [113] Maxam, A., Gilbert, W., A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 560-564, 1977.
- [114] Klaenhammer, T.R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 39-86, 1993.
- [115] Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F., Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*. 20, 1-12, 2005.
- [116] Pfister, P., Risch, M., Brodersen, D.E., Bottger, E.C., Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47, 1496-1502, 2003.
- [117] Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, E.C., Westhof, E., The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Biochem*. 4, 1078-1088, 2003.
- [118] Garrity, G.M., Holt, J.G., *The Road Map to the Manual. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 119-166. Ed: by G.M. Garrity, Springer-Verlag, New York, 2001.
- [119] Saitou, N. and Imanishi, T., Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution*. 6, 514-525, 1989.
- [120] Freeman, S. and Herron, J.C., *Evrimsel Analiz*. 28 (29): 438-449. Palme Yayıncılık, Ankara, 1999.

- [121] Mount, D.W., Bioinformatics. Chapter 7. Phylogenetic prediction. 281-324. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [122] Felsenstein, J., Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*. 26, 123-31, 1987.
- [123] M. Davoodian, Polistiren ile Alifatik Esterlerin Ters Gaz Kromatografisi Yöntemi ile İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 1994.
- [124] Miller, I. and Berger, T., Bacteria identification by gas Chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note. Hewlett-Packard Comp. California. 228-238, 1985.
- [125] Stead, D.E., Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42, 281-295, 1992.
- [126] Paisley, R., MIS Whole Cell Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. MIDI, Inc. Newark, Delaware. 5, 1995.
- [127] Sherlock Microbial Identification System MIDI, Inc. Newark, DE. 2001.
- [128] Dunnick, J.K. and O'Leary, W.M., Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 101 (3): 892-900, 1970.
- [129] Hışıl, Y., Enstrümental Gıda Analizleri-2. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 4. Baskı, 2004.
- [130] Uygulamalı Gaz Kromatografisi, Dolunay Eğitim Merkezi Laboratuvar Cihazları Eğitimi Kimya Seminerleri, İstanbul, 2010.

- [131] Vreeland, R.H., Rosenzweig, W. H., Lowenstein, T., Satterfield, C., Ventosa, A., Fatty acid and DNA analyses of permian bacteria isolated from ancient salt crystals reveal differences with their modern relatives. *Extremophiles* 10, 71-78, 2006.
- [132] Duran, M., Haznedaroğlu, B.Z. and Zitomer, D.H., Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. *Water Research*. 40, 67-74, 2006.
- [133] Nischwitz, C., Gitaitis, R., Sanders, H., Langston, D., Mullinix, B., Torrance, R., Boyhan, G. and Zolobowska, L., Use of fatty acid methyl ester profiles to compare copper-tolerant and copper-sensitive strains of *Pantoea ananatis*. *Phytopathology*. 97 (10): 1298-1304, 2007.
- [134] Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M.M. and Sohrab, A.D., Molecular characterization and phylogenetic analyses of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. *Biotechnology*. 9, 1-8, 2010.
- [135] S. Önal, Yapay Sınır Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin Akım Tahmini. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009.
- [136] Cutting, S.M. and Horn, P.B., Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus*. 27-74. Ed: by C. Harwood, S. Cutting, John Wiley and Sons Inc., United Kingdom, 1990.
- [137] Ausubal, F., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J., Struhl, K., Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc. New York, 1992.
- [138] Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T.A., Henze, G. and Beyermann, B., Advantages of a new *Taq* DNA polymerase in multiplex and time-release PCR. *BioTechniques* 24, 154-158, 1998.

- [139] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning a Laboratory Manual. 545. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, 1982.
- [140] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Erişim tarihi: 19.05.2013)
- [141] Birnboim, H.C., Doly, J., Arapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research. 7, 1513-1523, 1979.
- [142] Salam, A., Abosereh, N.A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M., Resistance plasmids of indigenou *Pseudomonas* in Egypt. Journal of Applied Sciences Research. 3 (9): 873-878, 2007.
- [143] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating rhizobium isolates. Microbios. 86, 143-156, 1996.
- [144] Laemli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature. 227, 680-684, 1970.
- [145] Demiralp, H., Celik, S., Koksel H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing. European Food Research and Technology. 211, 322-325, 2000.
- [146] Mukhallad, A.M., Malcolm, P.S., The distribution of heavy-chain iso forms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. Biochemical Journal. 260, 421-426, 1989.
- [147] Benson, D.A. and Karsch-Mizrachi, I., GenBank. Nucleic Acids Research. 28, 15-18, 2000.
- [148] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum



Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731-2739, 2011.

- [149] S. Bilgi, Tabaklama Öncesi Bakteri ve Fungus Sayısının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 2007.
- [150] Brendlyn D. Faison, Carmen A. Cancel, Susan N. Lewis and Howard, I., Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 3649-3656, 1990.
- [151] Brown, S.D., Martin, M., Deshpande, S., Seal, S., Huang, K., Alm, E., Yang, Y., Wu, L., Yan, T., Liu, X., Arkin, A., Chourey, K., Zhou, J and Thompson, D.K., Cellular response of *shewanella oneidensis* to strontium stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (1): 890-900, 2006.
- [152] Avery, S.V., Smith, S.L., Ghazi, A.M. and Hoptroff, M.J., Stimulation of strontium accumulation in linoleate-enriched *saccharomyces cerevisiae* is a result of reduced Sr<sup>2+</sup> efflux. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (3): 1191-1197, 1999.
- [153] Ghazvini, P.T.M., Mashkani, S.G., Ghafourian, H., Biosorption of strontium from aqueous solution by new strain *Bacillus* sp. GTG-83. WM'07 Conf. 1, 2007.
- [154] Jackson, V.A., Paule, A.N., Odendaal, J.P., Khan, S., Khan, W., Identification of metal-tolerant organisms isolated from the Plankenburg River, Western Cape, South Africa. 38 (1): 29-38, 2012.
- [155] Bozanta, E., Ökmen, G., Biyosorpsiyon ve mikroorganizmalar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4 (2): 69-77, 2011.
- [156] Altalhi, A.D., Plasmids profiles, antibiotic and heavy metal resistance

incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine. African Journal of Biotechnology. 8 (21): 5873-5882, 2009.

- [157] Lo, W., Leung, C.K., Yu, P.J.F., Leung, W.C., Wong, M.F., Chua, H., Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. Water Science and Technology. 41 (12): 233, 2000.
- [158] Zaied, K.A., Abd El-Mageed, H.N., Fayzalla, E.A., Sharief, A.E., Zehry, A.A., Induction of bacterial and yeast recombinants and their decontaminated factory effluents. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3 (1): 28-48, 2009.
- [159] Sathimurthy, K., Purushothaman, A. and Ramaiyan, V., Heavy metal and drug resistant bacteria in the vellar estuary, southeast coast of India. Mahasagar. 25 (2): 119-122, 1992.
- [160] De Souza, M.J., Nair, S., Loka-bharathi P.A. and Chandramohan, D., Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. Ecotoxicology. 2006.
- [161] Dikbaş, N., Kotan, R., Dadaşoğlu, F., İçme sularından izole edilen bakterilerin tanısı ve yağ asidi metil esterleri ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Gıda. 34 (4): 225-230, 2009.
- [162] G. Acar, Crocus Cinsine Ait Saf Ekstraktların Antimikrobiyal ve Antioksidant Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2006.
- [163] Y. Aktan, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.

- [164] N. Orman, Lityum ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [165] C. Koçhan, Nikel ve Kobaltı Tolere Eden Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [166] S. Akbulut, Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [167] G. Serim, Alüminyum ve Baryum Dirençli Çevre İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [168] Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Roots of Bacterial Sistematics. In Handbook of New Bacterial Sistematics. 5, 3-56. Ed: by M. Goodfellow and A. G. O'Donell. Academic Press, London, 1993.
- [169] G.P. Manfio, Toward Minimal Standardts for the Description of *Streptomyces* species. Ph.D. Thesis. Universty of Newcastle upon Tyne, England, 1995.
- [170] Salem, I.B., Sghaier, H., Trifi, H., Héni, S., Khwaldia, K., Saidi M. and Landoulsi, A., Isolation and characterization of a novel *Micrococcus* strain for bioremediation of strontium in radioactive residues. African Journal of Microbiology Research. 6 (4): 851-858, 2012.
- [171] D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J. And Lewis, K., Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. Chemistry and Biology. 17, 254-264, 2010.

- [172] Wieser, M., Denner, E.B.M., Kampfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A.M., Patel, B.K.C., Seviour, R.J., Radax, C. and Busse, H.J., Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 629-637, 2002.
- [173] Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A., Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48 (12): 987-992, 2010.
- [174] Sivasamy, R., Angayarkanni, J. And Palaniswamy, M., A novel filarial topoisomerase II inhibitor produced by native isolate *Micrococcus luteus* B1252. *African Journal of Biotechnology*. 10 (71): 16069-16077, 2011.
- [175] Mrık, M., Aysan, Y., Şahin, F., Whole cell fatty acid composition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* strains, isolated from pepper. *Journal of Turkish Phytopathology*. 34 (1-3): 17-25, 2005.
- [176] Helinski, D.R., An Introduction to plasmids: A selective view of their history. 1-21. Ed: by B.E. Funnell and G. Philips. *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, DC, 2004.
- [177] Pasquali, F., Kehrenberg, C., Manfreda, G. and Schwarz, S., Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55, 562-565, 2005.
- [178] Liebl, W., Kloos, W.E., Ludwig, W., Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. *Microbiology*. 148 (8): 2479-2487, 2002.
- [179] Santo C.E.P., Morais, P.V. and Grass, G., Isolation and characterization of

- bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (5): 1341-1348, 2010.
- [180] Thavasi, R., Aparnadevi, K., Jayalakshmi, S. and Balasubramanian, T., Plasmid mediated antibiotic resistance in marine bacteria. *Journal of Environmental Biology*. 28 (3): 617-621, 2007.
- [181] Oladipo, I.C., Adeoye, I.O., Adeyemo, A.A., Antimicrobial activity some transition metal picolinate. *American Journal of Food and Nutrition*. 3 (2): 53-57, 2013.
- [182] Wagenknecht, M., Julian R.D., Thürmer, A., Daniel, R., Maria, E., Farias, F.M., Structural peculiarities of the linear megaplasmid, pLMA1, from *Micrococcus luteus* interfere with pyrosequencing reads assembly. *Section Microbial and Enzyme Technology*. 2009.
- [183] N. Kılıç, Proteomik Yaklaşımla Atık Su Kaynaklı Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnç Yollarının Araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [184] Goswami, R., Ghosh, D., Saha, D.R., Padhy, P.K., Mazumder, S., Effect of acute and chronic arsenic exposure on growth, structure and virulence of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish. *Microbial Pathogenesis*. 50, 63-69, 2011.
- [185] Kung, V.T. and Wang, J.C., Purification and characterization of an w protein from *Micrococcus luteus*. *Journal of Biological Chemistry*. 252 (15): 5398-5402, 1977.
- [186] Auda, S.H., Knütter, I., Bretschneider, B., Brandsch, M., Mrestani, Y., Grobe, C. and Neubert, R.H.H., Effect of different metal ions on the biological properties of Cefadroxil. *Pharmaceuticals*. 2, 184-193, 2009.