

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**16S rRNA PROBLARI KULLANILARAK ETKİN KADMIYUM, CİVA VE  
ANTİMON DİRENÇLİ NEHİR İZOLATLARININ TAKİP EDİLMESİ**

**FADİME YILMAZ**

**HAZİRAN 2013**

**Biyoloji Anabilim Dalında** Fadime YILMAZ tarafından hazırlanan 16S rRNA PROBLARI KULLANILARAK ETKİN KADMİYUM, CİVA VE ANTİMON DİRENÇLİ NEHİR İZOLATLARININ TAKİP EDİLMESİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İLHAMİ TÜZÜN  
Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN  
Ortak Danışman

Prof. Dr. Aysun ERGENE  
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan	: Prof. Dr. Emir CANSUNAR	_____
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Aysun ERGENE	_____
Üye (Ortak Danışman)	: Doç. Dr. Bülent İÇGEN	_____
Üye	: Doç. Dr. Sema TAN	_____
Üye	: Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN	_____

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### 16S rRNA PROBLARI KULLANILARAK ETKİN KADMIYUM, CİVA VE ANTİMON DİRENÇLİ NEHİR İZOLATLARININ TAKİP EDİLMESİ

YILMAZ, Fadime

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2013, 219 sayfa

Bu çalışma kapsamında kadmiyum, civa ve antimon dirençli bakterilerin Kırıkkale-Kızılırmak suyundan izole edilmesi, tanımlanması, moleküler karakterizasyonu ve 2010-2012 yılları arasındaki mevsimsel populasyon yayılımları araştırılmıştır. Bu amaçla, sırasıyla kadmiyum, civa ve antimon için maksimum tolere edilebilen konsantrasyon değerleri 900, 220 ve 1400 mg/L olan üç dirençli suş izole edilmiştir. Bu suşlar biyokimyasal testler yağ asidi ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas koreensis* ve *Acinetobacter johnsonii* olarak tanımlanmıştır. Her üç suşun çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Yapılan DNA analiz çalışmaları sonucunda kadmiyum dirençlilik genlerinin *D. tsuruhatensis* suşunda kromozomal DNA üzerinde olmasına rağmen, *P. koreensis*'deki Hg direnç genleri ile *Acinetobacter johnsonii*'deki Sb direnç genlerinin ise sırasıyla 215 ve 117 kb moleküler ağırlığında olan plazmidler üzerinde kodlandığı belirlenmiştir. Total ve dış membran protein analizi çalışmaları yapılarak

Çalışılan metallerin dirençlilik mekanizmaları belirlenmeye çalışılmıştır. 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinden floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak etkin metal dirençliliği gösteren bu suşların mevsimsel populasyon yayılımları belirlenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda çalışmada elde edilen *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* nehir izolatlarının kadmiyum, civa ve antimon biyoremediasyonu için potansiyel suşlar olabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal dirençliliği, *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas koreensis*, *Acinetobacter johnsonii*, floresan *in situ* hibridizasyon, 16S rRNA sekans analizi, yağ asidi analizi, moleküler karakterizasyon

## ABSTRACT

### THE USE OF 16S rRNA PROBING FOR MONITORING THE RELATIVE DOMINANCE OF CADMIUM, MERCURY AND ANTIMONY RESISTANT RIVER ISOLATES

YILMAZ, Fadime

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology, PhD. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

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

June 2013, 219 pages

This study aimed to isolate, identify, characterize and investigate the seasonal population shifts of relatively dominant cadmium-, mercury and antimony-resistant bacteria from the river Kızılırmak-Kırıkkale. For this purpose, three isolates with maximum tolerable concentration values of 900, 220 and 1400 mg/L for cadmium, mercury and antimony, respectively, were chosen for further studies. These isolates were identified as *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas koreensis* and *Acinetobacter johnsonii* by using biochemical tests, fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA sequence analyses. Moreover, multiple metal and antibiotic resistance profiles of all the isolates were determined. DNA analyses results revealed that the genes responsible for cadmium resistance in *Delftia tsuruhatensis* were located on chromosomal DNA, while mercury- and antimony-resistant genes of *Pseudomonas koreensis* and *Acinetobacter johnsonii* were located on plasmid DNA with molecular

weights of 215 and 117 kb, respectively. In order to understand heavy metal resistance mechanisms of the isolates total and outer membrane protein profiles were also described. Finally, the seasonal population shifts of the isolates in between the years of 2010-2013 was also monitored by using *in situ* fluorescein hybridization method. Our results revealed that the river isolates *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas koreensis* and *Acinetobacter johnsonii* could be potential isolates in the bioremediation applications of cadmium, mercury and antimony contaminated areas.

**Key Words:** Heavy metal resistance, *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas koreensis*, *Acinetobacter johnsonii*, fluorescence *in situ* hybridization, 16S rRNA sequence analysis, fatty acid methyl ester analysis, molecular characterization

## TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmamın her aşamasında benden destek ve deneyimlerini esirgemeyen, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE ve ortak danışman hocam Sayın Doç. Dr. BÖlent İÇGEN'e teŐekkÖrlerimi bir borç bilirim. Ayrıca tez çalıŐmalarım esnasında, deneysel konularda tavsiyelerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Emir Cansunar ve Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teŐekkÖr ederim. Filogenetik analizlerde yardımını esirgemeyen Uzman Biyolog İlhan COŐAR'a, deneysel aŐamalarda yardımlarını esirgemeyen ÖzgÖn Şahin'e, Semih CERİT, Mehmet GÖVEN ve İrem AKIN'a ve son olarak maddi ve manevi her konuda beni destekleyen, sonsuz sevgi ve ilgisini esirgemeyen aileme ve bÖyÖk fedakarlıklarla bana destek olan Murat ARTUÇ'a teŐekkÖr ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xxii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kaynak Özetleri.....	3
1.2. Endüstriyel Kirlenme.....	3
1.1.2. Ağır Metalin Tanımı.....	4
1.1.3. Ağır Metallerin Kullanım Alanları.....	5
1.1.3.1. Kadmiyumun Kullanım Alanları.....	6
1.1.3.2. Civanın Kullanım Alanları.....	7
1.1.3.3. Antimonun Kullanım Alanları.....	7
1.1.4. Ağır Metallerin Çevreye Yayılımı.....	8
1.1.5. Ağır Metallerin Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	9
1.1.5.1. Kadmiyumun Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	12
1.1.5.2. Civanın Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	13
1.1.5.3. Antimonun Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	14
1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	15
1.1.7. Biyoremediasyon.....	16
1.1.8. Bakterilerde Ağır Metal Direnç Mekanizmaları.....	17
1.1.8.1. Kadmiyum Direnç Mekanizması.....	20
1.1.8.2. Civa Direnç Mekanizması.....	24
1.1.8.3. Antimonun Direnç Mekanizması.....	27



1.1.9. Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği.....	29
1.1.10. Ağır Metal Dirençli Bakterilerin Tanımlanmasında Moleküler Yaklaşımlar.....	31
1.1.10.1. 16S rRNA Sekans Analizi.....	32
1.1.10.2. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması.....	33
1.1.10.2.1. Nükleotid Dizisi Kullanan Metotlar (Sequence-Based).....	34
1.1.10.2.1.1. Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi (Maximum Parsimony).....	34
1.1.10.2.1.2. En Yüksek İhtimal Metodu (Maximum Likelihood).....	34
1.1.10.2.1.3. Bayes Metodu.....	35
1.1.10.2.2. Uzaklık (Distance) Metotları.....	35
1.1.10.2.2.1. UPGMA Metodu.....	35
1.1.10.2.2.2. Neighbour-Joining Metodu.....	35
1.1.10.3. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi.....	37
1.1.10.3.1. Yağ Asitlerinin Yapısı.....	37
1.1.10.3.2. Kültür ve büyüme koşulları.....	38
1.1.10.4. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH).....	41
1.1.10.4.1. Problar ve İşaretleme.....	43
1.1.10.4.2. Floresan Boyalar.....	44
1.1.10.4.3. Hedef Molekül rRNA.....	44
1.1.10.4.4. Fiksasyon.....	45
1.1.10.4.5. Örnek Hazırlanması ve Ön işlemleri.....	45
1.1.10.4.6. Hibridizasyon.....	46
1.1.11. Çalışmanın Amacı.....	49
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
2.1. Materyal.....	50
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri.....	50
2.1.2.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı.....	50
2.1.2.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı.....	50
2.1.2.3. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyerinin Hazırlanışı.....	50
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	51
2.1.3.1. Ağır Metal Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	51
2.1.3.1.1. 0.5 M Kadmiyum Nitrat Çözeltisi.....	51

2.1.3.1.2. 0.5 M Civa Nitrat Çözeltisi.....	51
2.1.3.1.3. 0.5 M Potasyum Antimon Tartarat Çözeltisi.....	51
2.1.3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	51
2.1.3.2.1. Tris/EDTA Çözeltisi.....	51
2.1.3.2.2. % 10'luk SDS Çözeltisi.....	51
2.1.3.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	52
2.1.3.2.4. NaCl Çözeltisi.....	52
2.1.3.2.5. CTAB/NaCl Çözeltisi.....	52
2.1.3.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Çözeltisi.....	52
2.1.3.2.7. %70'lik Etanol.....	52
2.1.3.2.8. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Çözeltisi.....	52
2.1.3.2.9. İzopropanol Alkol.....	53
2.1.3.2.10. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL).....	53
2.1.3.2.11. Tris-HCl Çözeltisi (1 M, 100 mL).....	53
2.1.3.3. Yağ Asitleri Metil Esterler (FAME) Analizinde Kullanılan Çözeltiler.....	53
2.1.3.3.1. Çözelti 1 (Hücre parçalayıcı).....	53
2.1.3.3.2. Çözelti 2 (Metilleştirme).....	53
2.1.3.3.3. Çözelti 3 (Saflaştırma).....	53
2.1.3.3.4. Çözelti 4 (Bazik Yıkama).....	54
2.1.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler.....	54
2.1.3.5. Kullanılan Antibiyotik Diskler.....	54
2.1.3.6. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	56
2.1.3.6.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	56
2.1.3.6.2. Solüsyon II (NaOH/SDS).....	56
2.1.3.6.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit).....	56
2.1.3.6.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	56
2.1.3.7. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	56
2.1.3.7.1. Potasyum Fosfat Tamponu.....	56
2.1.3.7.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL).....	57
2.1.3.7.3. Deterjan Solüsyonu.....	57
2.1.3.8. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	57
2.1.3.9. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	58

2.1.3.9.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi.....	58
2.1.3.9.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi.....	59
2.1.3.9.3. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	59
2.1.3.10. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyonda (FISH) Kullanılan Çözeltiler..	59
2.1.3.10.1. Paraformaldehit Çözeltisi.....	59
2.1.3.10.2. EDTA Çözeltisi.....	59
2.1.3.10.3. 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) Boya Çözeltisinin Hazırlanması.....	60
2.1.3.10.4. PBS (Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi.....	60
2.1.3.10.5. 1X Tris-EDTA Çözeltisi.....	60
2.1.3.10.6. 1X PBS.....	60
2.1.3.10.7. NaCl Çözeltisi.....	60
2.1.3.11. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyonda (FISH) Kullanılan Problar.....	61
2.2. Yöntem.....	61
2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması.....	61
2.2.2. Metal analizi.....	63
2.2.3. Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....	63
2.2.4. Maksimum Tolere Edilenbilen Metal Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	63
2.2.5. Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	64
2.2.6. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	64
2.2.7. Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyon.....	64
2.2.8. Total DNA Ekstraksiyonu.....	65
2.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Optimizasyonu.....	66
2.2.10. 16S rRNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analiz.....	67
2.2.11. Çoklu Metal Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	67
2.2.12. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	67
2.2.13. Plazmit DNA İzolasyonu.....	68
2.2.14. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	69
2.2.15. Total ve Dış Membran Protein Analizleri.....	69
2.2.15.1. Total Protein İzolasyonu.....	69
2.2.15.2. Dış Membran Protein İzolasyonu.....	69

2.2.15.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS PAGE).....	70
2.2.15.3.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması.....	70
2.2.15.3.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması.....	70
2.2.15.3.3. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması.....	71
2.2.15.3.4. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....	71
2.2.16. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Kullanılacak Örneklerin Toplanması ve Fiksasyonu.....	71
2.2.17. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) ve Optimizasyonu.....	72
2.2.18. Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Suşların Populasyon Yayılımlarının Belirlenmesi.....	73
2.2.19. İstatistiksel Analizler.....	73
<b>3. BULGULAR</b> .....	74
3.1. Bölüm 1.....	74
3.1.1. Kadmiyum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Tolere Edilebilen Kadmiyum Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	74
3.1.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Kadmiyum Analizi.....	75
3.1.3. Kadmiyum Dirençli Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	75
3.1.4. Kadmiyum Dirençli Suşun Üreme Eğrisinin Belirlenmesi.....	77
3.1.5. Kadmiyum Dirençli Suşun Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu.....	78
3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu.....	79
3.1.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Cd 11-3 Suşunun İdentifikasyonu..	80
3.1.7.1. Filogenetik Analiz ile Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment).....	80
3.1.8. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun Çoklu Metal Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi.....	83
3.1.9. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi.....	84

3.1.10. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun DNA Analizi.....	86
3.1.11. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun Bakterinin Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	87
3.1.12. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi.....	88
3.1.13. Kadmiyum Dirençli <i>Delftia tsuruhatensis</i> Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı.....	96
3.2. Bölüm 2.....	103
3.2.1. Civa Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Tolere Edilebilen Civa Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	103
3.2.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Civa Analizi.....	103
3.2.3. Civa Dirençli Suşların Biyokimyasal ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	104
3.2.4. Civa Dirençli Suşların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	106
3.2.5. Civa Dirençli Suşların Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu.....	107
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu.....	109
3.2.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Hg 10-2 ve Hg 11-4 Suşlarının İdentifikasyonu.....	112
3.2.7.1. Filogenetik Analize Dahil Edilen Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment).....	112
3.2.8. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşlarının Çoklu Metal Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi.....	117
3.2.9. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi.....	118
3.2.10. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşlarının DNA Analizi..	120
3.2.11. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşlarının Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	122
3.2.12. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşunun Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi.....	123
3.2.13. Civa Dirençli <i>Pseudomonas koreensis</i> Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı.....	132

3.3. Bölüm 3.....	139
3.3.1. Antimon Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Tolere Edilebilen Antimon Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	139
3.3.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Antimon Analizi.....	139
3.3.3. Antimon Dirençli Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	140
3.3.4. Antimon Dirençli Suşun Üreme Eğrisinin Belirlenmesi.....	142
3.3.5. Antimon Dirençli Suşun Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu.....	142
3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu.....	143
3.3.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Sb 01-01 Suşunun İdentifikasyonu	145
3.3.7.1. Filogenetik Analiz ile Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment).....	145
3.3.8. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun Çoklu Metal Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi.....	148
3.3.9. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi.....	149
3.3.10. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun DNA Analizi.....	151
3.3.11. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	152
3.3.12. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi.....	153
3.3.13. Antimon Dirençli <i>Acinetobacter johnsonii</i> Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı.....	161
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>168</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>182</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>201</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>219</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bazı Ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları.....	6
2.1. Kullanılan primerler ve özellikleri.....	55
2.2. Antibiyotik diskler ve kullanılan konsantrasyonları.....	57
2.3. SDS-PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı.....	57
2.4. SDS PAGE çalışma solüsyonlarının hazırlanışı.....	58
2.5. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	58
2.6. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	59
2.7. FISH için kullanılan 16S rRNA hedefli oligonükleotid problemler.....	61
2.8. Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları.....	62
3.1. Cd dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri.....	74
3.2. Cd 11-3 suşunun biyokimyasal ve morfolojik özellikleri.....	76
3.3. Cd 11-3 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları.....	78
3.4. Cd 11-3 için gerçekleştirilen nükleotid dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları.....	81
3.5. Cd 11-3 suşu için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	82
3.6. <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....	84
3.7. <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	85
3.8. Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları.....	88
3.9. Değişen formamid konsantrasyonlarında Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	90
3.10. Değişen NaCl konsantrasyonlarında Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	93

3.11. Hg dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri.....	103
3.12. Hg dirençli bakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özellikleri.....	105
3.13. Hg 10-2 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları.....	108
3.14. Hg 11-4 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları.....	109
3.15. Hg 10-2 suşu için gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları.....	113
3.16. Hg 11-4 suşu için gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları.....	113
3.17. Hg 10-2 suşu için 16S rRNA dizi verileri ile gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	114
3.18. Hg 11-4 suşu için 16S rRNA dizi verileri ile gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	115
3.19. <i>P. koreensis</i> suşlarının çoklu metal direnç profilleri.....	117
3.20. <i>P. koreensis</i> suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri.....	119
3.21. Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları.....	124
3.22. Değişen formamid konsantrasyonlarında Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	126
3.23. Değişen NaCl konsantrasyonlarında Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	129
3.24. Sb dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri.....	139
3.25. Sb 01-01 suşunun biyokimyasal ve morfolojik özellikleri.....	141
3.26. Sb 01-01 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları.....	143
3.27. Gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları.....	145
3.28. Sb 01-01 suşu için 16S rRNA dizi verileri gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	147
3.29. <i>A. johnsonii</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....	149
3.30. <i>A. johnsonii</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....	150



3.31. Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları.....	153
3.32. Değişen formamid konsantrasyonlarında Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	155
3.33. Değişen NaCl konsantrasyonlarında Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun % hibridizasyon oranları.....	158

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Kadmiyum kirliliği.....	13
1.2. Küresel civa jeokimyasal döngüsü.....	14
1.3. <i>S. aureus</i> 'ta Cd ve Zn direnci ve transportu.....	21
1.4. Magnezyum veya manganez alımı sistemleri.....	22
1.5. Bakterilerde Cd direnç mekanizmaları.....	23
1.6. Gram negatif bakterilerde Hg direnç operon ( <i>mer</i> ) modeli.....	26
1.7. <i>mer</i> operonlarında genlerin düzenlenişi.....	27
1.8. <i>E. coli</i> 'de arsenat direnci ve transportu.....	28
1.9. Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ve FAME Analizi.....	40
1.10. FISH metodu.....	47
1.11. Hg dirençli arkea ve bakteri popülasyonlarının FISH metoduyla analizi...	48
2.1. Örneklem bölgesi (Google Earth görüntüsü).....	62
3.1. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan kadmiyum analiz sonuçları.....	75
3.2. Cd 11-3 üreme eğrisi.....	77
3.3. Cd 11-3 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromatogramı.....	78
3.4. Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Cd 11-3 suşuna ait PZR ürünleri.....	79
3.5. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Cd 11-3 suşuna ait PZR ürünleri.....	80
3.6. Cd 11-3 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram	83
3.7. <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun plazmit profili.....	86
3.8. <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri.....	87
3.9. EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a <sub>1</sub> ), NONEUB negatif kontrol (b-b <sub>1</sub> ), <i>E. coli</i> DH5α (c-c <sub>1</sub> ) ile hibridizasyon.....	89

3.10. Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a <sub>1</sub> ), %15 (b-b <sub>1</sub> ), %20 (c-c <sub>1</sub> ), %25 (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	91
3.11. Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e <sub>1</sub> ), %35 (f-f <sub>1</sub> ), %40 (g-g <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	92
3.12. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a <sub>1</sub> ), 96 mM (b-b <sub>1</sub> ), 97 mM (c-c <sub>1</sub> ), 98 mM (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	94
3.13. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e <sub>1</sub> ), 100 mM (f-f <sub>1</sub> ), 101 mM (g-g <sub>1</sub> ), 102 mM (h-h <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	95
3.14. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i <sub>1</sub> ), 104 mM (j-j <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	96
3.15. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	97
3.16. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	98
3.17. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	99
3.18. 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun populasyon yayılımı.....	100
3.19. Cd dirençli <i>D. tsuruhatensis</i> suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı.....	101
3.20. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan civa analiz sonuçları.....	104
3.21. Hg 10-2 üreme eğrisi.....	106
3.22. Hg 11-4 üreme eğrisi.....	107
3.23. Hg 10-2 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromatogramı.....	108
3.24. Hg 11-4 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromatogramı.....	109
3.25. Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Hg 10-2 suşuna ait PZR ürünleri.....	110
3.26. Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Hg 11-4 suşlarına ait PZR ürünleri.....	110

3.27. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Hg 10-2 suşuna ait PZR ürünleri.....	111
3.28. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Hg 11-4 suşuna ait PZR ürünleri.....	111
3.30. Hg 10-2 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram.	116
3.31. Hg 11-4 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram.	116
3.32. <i>P. koreensis</i> Hg 10-2 suşunun plazmit profili.....	121
3.33. <i>P. koreensis</i> Hg 11-4 suşunun plazmit profili.....	121
3.34. <i>P. koreensis</i> Hg 10-2 suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri.....	122
3.35. <i>P. koreensis</i> Hg 11-4 suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri.....	123
3.36. EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a <sub>1</sub> ), NONEUB negatif kontrol (b-b <sub>1</sub> ), <i>E. coli</i> DH5α (c-c <sub>1</sub> ) ile hibridizasyon...	125
3.37. Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a <sub>1</sub> ), %15 (b-b <sub>1</sub> ), %20 (c-c <sub>1</sub> ), %25 (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	127
3.38. Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e <sub>1</sub> ), %35 (f-f <sub>1</sub> ), %40 (g-g <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	128
3.39. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a <sub>1</sub> ), 96 mM (b-b <sub>1</sub> ), 97 mM (c-c <sub>1</sub> ), 98 mM (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	130
3.40. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e <sub>1</sub> ), 100 mM (f-f <sub>1</sub> ), 101 mM (g-g <sub>1</sub> ), 102 mM (h-h <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	131
3.41. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i <sub>1</sub> ), 104 mM (j-j <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	132
3.42. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	133
3.43. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	134
3.44. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	135

3.45. 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun populasyon yayılımı.....	136
3.46. Hg dirençli <i>P. koreensis</i> suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı.....	137
3.47. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan antimon analiz sonuçları.....	140
3.48. Sb 01-01'ün üreme eğrisi.....	142
3.49. Sb 01-01 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromatogramı ...	143
3.50. Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Sb 01-01 suşuna ait PZR ürünleri.....	144
3.51. Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Sb 01-01 suşuna ait PZR ürünleri.....	144
3.52. Sb 01-01 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram	148
3.53. <i>A. johnsonii</i> suşunun plazmit profili.....	151
3.54. <i>A. johnsonii</i> suşunun total ve dış membran protein profilleri.....	152
3.55. EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a <sub>1</sub> ), NONEUB negatif kontrol (b-b <sub>1</sub> ), <i>E. coli</i> DH5α (c-c <sub>1</sub> ) ile hibridizasyon...	154
3.56. Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a <sub>1</sub> ), %15 (b-b <sub>1</sub> ), %20 (c-c <sub>1</sub> ), %25 (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	156
3.57. Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e <sub>1</sub> ), %35 (f-f <sub>1</sub> ), %40 (g-g <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	157
3.58. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a <sub>1</sub> ), 96 mM (b-b <sub>1</sub> ), 97 mM (c-c <sub>1</sub> ), 98 mM (d-d <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	159
3.59. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e <sub>1</sub> ), 100 mM (f-f <sub>1</sub> ), 101 mM (g-g <sub>1</sub> ), 102 mM (h-h <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	160
3.60. Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i <sub>1</sub> ), 104 mM (j-j <sub>1</sub> ) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu.....	161
3.61. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	162
3.62. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	163

3.63. Ocak (a-a <sub>1</sub> ), Nisan (b-b <sub>1</sub> ), Temmuz (c-c <sub>1</sub> ), Ekim (d-d <sub>1</sub> ) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi.....	164
3.64. 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun populasyon yayılımı.....	165
3.65. Sb dirençli <i>A. johnsonii</i> suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı.....	166

## SİMGELER DİZİNİ

Pb	Kurşun
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
As	Arsenik
$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Kadmiyum Nitrat
$Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	Civa Nitrat
$K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0.5 H_2O$	Potasyum Antimon Tartarat

## KISALTMALAR DİZİNİ

MTK	Maksimum Tolere Edilebilen Konsantrasyon
ICP-MS	İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
TSA	Triptik Soy Agar
FAME	Yağ Asitleri Metil Esterler
GC	Gaz Kromatografisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
FITC	Floresein-İzotiyosiyanat
APS	Amonyum Persülfat
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametil etilen diamin



## 1. GİRİŞ

Günümüzde endüstriyel atık suların hiçbir işlem uygulanmadan alıcı su ortamlarına bırakılması gelişen dünyanın en tehlikeli ve önemli sorunlarından birisidir. 21. yüzyılın ortalarında başlayan ve giderek hızlanan endüstrileşme sürecinde, özellikle metal, gıda, tekstil, kimya gibi sektörler öne çıkmaktadır. Bu endüstrileşme ile birlikte ortaya çıkan ağır metal kirliliği çevre, sağlık ve ekonomik açıdan çeşitli olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Ağır metallerin, belli konsantrasyon sınırını aştıklarında canlılar üzerinde, öldürücü etkilere sahip olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ağır metaller çevrede özellikle biyosferde geniş bir yayılım gösterirler. Bu sebeple zararlı formdaki konsantrasyonları önemli boyutlara ulaşır. Yüksek konsantrasyonda bulunan elementler, organizmalarda çözümleri halinde bulunurlar ve hücreler arasındaki elektronötralliği sağlarlar. Eser ağır metaller ise canlı yapısında eser oranda bulunurlar ama görevleri çok önemlidir. Bunlardan bazıları proteinlerin bazıları da enzimlerin yapısında bulunurlar. Organizmanın ihtiyacı olan besinler arasında olan metaller organik moleküllerle ve daha çok proteinlerle birlikte fonksiyon gösterirler. Hemoglobun, hemosiyanin ve enzimler oksijen taşıyan metaloproteinlerdir. Enzimlerin çoğu spesifik metallerin bulunmaması halinde katalitik aktivitelerini yapamazlar. Bazı ağır metaller, uygun konsantrasyonlarda enzim aktiviteleri için gerekli olmasına karşılık, doğal konsantrasyonlar asıldığında enzim aktivitelerini inhibe ederler. Gümüş (Ag), civa (Hg), bakır (Cu) ve kurşun (Pb) gibi metaller özellikle toksiktirler ve enzim aktivitelerini durdururlar [1]. Gümüş, alüminyum, altın, kadmiyum, kurşun ve civa gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır [2].

Ağır metallerin çevreye yayınımda etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve

insanlar üzerinde etkin olurlar [2]. Sonuçta, metal kirliliğinin çoğu sularda birikir. Sulardaki birikim, çözünme şeklinde olabileceği gibi, çözünmeden suların dibinde çökme şeklinde de olabilir. Bu şekilde oluşan bir kirlenme endüstriyel ve zirai atıklardan meydana geldiği gibi herhangi bir yolla atmosfere verilen metal türü maddelerden de meydana gelebilir. Atmosfere verilen metal türü maddeler sonunda yeryüzüne dönerler ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenirler. Metal kirlenmesi, organik kirlenmeler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmazlar, bir metal bileşiği başka bir metal bileşiğine dönüşür. Dönüşme ne olursa olsun metal iyonu kaybolmaz [3].

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 katyonun değişmesi enzimin aktivitesini değiştirir [1, 3]. Bu nedenle endüstriyel atık sulardan ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Ağır metal gideriminde kullanılan biyoremediasyon, fizikokimyasal metodlar ile kıyaslandığında çok düşük maliyet ve yüksek verimlilik nedeniyle avantajlı bir prosestir [4]. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atık sulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdan uzaklaştırabilmesi ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarca ağır metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir. Ağır metallere dirençli mikroorganizmalar, bahsedilen bu direnç sistemlerinden birini veya birkaçını bir arada kullanarak ağır metalin toksik etkilerinden korumaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır [5].

Kırıkkale, Orta Anadolu Bölgesi'nde Kızılırmak'ın yakınında yeni kurulmuş hızla sanayi merkezi haline gelmekte olan bir ilimizdir. Kırıkkale'nin ana sanayisini kamu ve askeri silah ve mühimmat fabrikaları, petrol rafinerileri, dikişsiz çelik boru

fabrikası, mobil santral ve kimya tesisleri oluşturmaktadır. Çelik sektörünün hızlı büyümesi bu bölgedeki endüstriyel kirliliği arttırmaktadır. Aynı zamanda, petrol rafinerisi, kimya tesisleri, metal imalat fabrikaları gibi farklı endüstriyel kuruluşlar da Kızılırmak kıyısı boyunca yer almaktadır. Kızılırmak, çevresindeki sanayi kuruluşlarının ürettiği atıklardaki ağır metal kirliliğinden, şehrin yerel atıklarından ve tarımsal ağır metal kirliliğinden etkilenmektedir [6].

Geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle doğal ekosistemler ve mikrobiyal yaşamdan birçok mikroorganizma izole edilip çalışılmamıştır. Moleküler uygulamalar arasında olan rRNA hedefli oligonukleotid probalar ile floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), spesifik olarak mikroorganizmaların belirlenebilmesinde, tür ve cins düzeyinde filogenetik olarak tanımlanabilmesinde ve sayılarının tespit edebilmesinde kullanılan bir yöntemdir [7]. Bu tez çalışmasında amacımız, sanayi kuruluşlarına yakın olan bölgeleri kapsayan Kırıkkale İli sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'ın değişik bölgelerinden alınan su örneklerinden kadmiyum (Cd), civa (Hg) ve antimon (Sb) ağır metallerine karşı direnç gösteren suşların izolasyonu ve izole edilen suşların 16S rRNA dizi analizi ile moleküler karakterizasyonlarının yapılmasıdır. Çalışma kapsamında, biyoremediasyonda etkin olabilecek suşların populasyon dağılımları belirlenmiştir. Cd, Hg ve Sb metallerine karşı dirençli olan bakterilerin populasyonlarındaki değişiklikler mevsimsel olarak üç yıl süre ile endüstriyel atıkların yoğun olduğu bölgelerden su örnekleri alınarak FISH yöntemi ve görüntü analizi mikroskobu ile takip edilmiştir.

## **1.1. Kaynak Özetleri**

### **1.1.1. Endüstriyel Kirlenme**

Sanayi ve ticaretin gelişmesi ucuz üretim girdilerinin sağlanmasına bağlıdır. Sanayileşmenin çevre kirliliği üzerindeki asıl olumsuzluğu doğrudan kirliliktir. Türkiye gibi sanayileşme sürecini devam ettiren ülkelerde yine ucuz üretim amacı ile ucuz yakıt kullanılmakta, üretim gereği olarak ortaya çıkan artıklar doğrudan alıcı kaynaklara verilmekte, sonuçta hava, su ve toprak kirlenmektedir [8].

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de endüstriyel alandaki yatırımlar giderek artmakta; gelişen endüstriyel etkinliklere ve evlerden oluşan atıklara bağlı olarak doğanın dengesi bozulmakta ve böylece önemli çevresel sorunlar oluşarak insan yaşamını olumsuz etkilemektedir. Ekolojik dengenin bu şekilde bozulması çevre kirlenmesi olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel kirlenme, gerek karşılaşılan kirlenme sorunlarının çok ve çeşitli olması gerekse doğanın korunması ve bu amaçla alınacak önlemlerin dengesi yüzünden en karmaşık kirlenme şeklini oluşturmaktadır [9]. Endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ağır metaller ve onların bileşikleri hava, su ve toprak da dahil olmak üzere, çevresel kirlenmeye yol açmaktadır [10].

Ağır metallerin önemli bir kirlenici grubu oluşturdukları bilinmektedir. Bunların toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi canlı organizmada birikme eğilimi de göstermektedirler. Krom (Cr), civa (Hg), kurşun (Pb), demir (Fe), kadmiyum (Cd), mangan (Mn), kobalt (Co), nikel (Ni), bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi metaller tabiatta genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Endüstriyel atıklardaki ağır metaller inorganik veya organik bileşikler halinde bulunabilir. Bunların çözünürlüğü ve küçük partiküller şeklinde atmosfere karışma ihtimalleri daha fazladır [11]. Daha çok endüstriyel atıklardan ağır metaller, toprak, hava ve su için önemli kirleniciler arasındadır. Kirlenen bu sahalar bünyesinde barındırdığı canlı organizmalar için büyük tehlikeler oluşturmaktadır. Bu nedenle zamanımızın en önemli konusu, endüstrileşmenin ve hızlı nüfus artışının ortaya çıkardığı çevre kirliliğine uygulanabilir, ekonomik ve kesin bir çözüm getirmektir. Kirlenmiş çevreyi temizlemek oldukça pahalı ve kompleks tesisler gerektiren uzun bir çalışma ile mümkündür. Bu sebeple su, toprak ve havanın kirlenmesini önleyici tedbirlerin alınması daha da önem kazanmaktadır [11].

### **1.1.2. Ağır Metalin Tanımı**

Ağır metaller, yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$  ten daha yüksek olan metaller için kullanılan bir terimdir. Bu grubun içine Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Hg ve Zn olmak üzere 60'tan

fazla metal girmektedir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunurlar [12]. Co, Cu ve Zn gibi bazı ağır metaller, biyolojik sistemler için gerekli iz elementlerdir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler. Hg, Cd ve Pb diğer metaller, biyolojik olarak gerekli olmayan ve herhangi bir miktarda bile toksik olan metallerdir [13]. Metaller doğal olarak meydana gelir ve bazıları küresel ekosistemlerin gerçek parçalarıdır. Cu ve Zn gibi metaller yaşam için gereklidir. Bitkide çinko, metabolizma olaylarını düzenleyen enzim sistemi için gereklidir. Ancak Pb ve Hg gibi diğer metallerin faydalı bir biyokimyasal fonksiyon yerine getirdiği bilinmemektedir. Yüksek yoğunluklarda zehirli olmalarına rağmen, Cu ve Zn, fotosentetik elektron naklinde anahtar rol oynayan moleküllerin parçası ve çoğu enzim aktivitesi için gerekli mikro besin elementleridir [14].

### **1.1.3. Ağır Metallerin Kullanım Alanları**

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 [15]. Çeşitli endüstrilerde kullanılan ve atık sularında rastlanılan metaller Çizelge 1.1’ de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Bazı ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları [16, 17]

<b>Ağır Metal</b>	<b>Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları</b>
Çinko (Zn)	Metal alaşımı, batarya ve pil üretimi, kimya, ilaç, dişçilik, kaplama, gübre, madencilik, boya ve pigment, petrol rafineri
Antimon (Sb)	Metal alaşımı, kimya, ilaç, dişçilik, elektronik cihaz üretimi, madencilik, boya ve pigment
Kurşun (Pb)	Metal alaşımı, batarya ve pil üretimi, seramik ve cam üretimi, kimya, ilaç, dişçilik, kaplama, gübre, madencilik, boya ve pigment, petrol rafineri, makine, plastik üretimi, kağıt üretimi
Nikel (Ni)	Metal alaşımı, batarya ve pil üretimi, seramik ve cam üretimi, gübre, madencilik, boya ve pigment, petrol rafineri
Civa (Hg)	Batarya ve pil üretimi, tarım, kimya, ilaç, dişçilik, Elektronik cihaz üretimi, gübre, madencilik, kağıt üretimi
Kadmiyum (Cd)	Metal alaşımı, kimya, ilaç, dişçilik, gübre, madencilik, boya ve pigment, plastik üretimi
Arsenik (As)	Metal alaşımı, tarım, seramik ve cam üretimi, gübre, madencilik, petrol rafineri, tekstil, boya ve pigment, kimya, ilaç, dişçilik, dişçilik
Kalay (Sn)	Tarım, kimya, ilaç, dişçilik, kaplama, otomotiv
Bakır (Cu)	Metal alaşımı, kimya, ilaç, dişçilik, kaplama, madencilik, boya ve pigment, petrol rafineri, makine, kağıt üretimi, tekstil
Mangan (Mn)	Metal alaşımı, batarya ve pil üretimi, tarım, gübre, madencilik
Krom (Cr)	Metal alaşımı, kimya, ilaç, dişçilik, kaplama, gübre, madencilik, boya ve pigment, petrol rafineri, kağıt üretimi, tekstil
Kobalt (Co)	Metal alaşımı, seramik ve cam üretimi, boya ve pigment, petrol rafineri
Berilyum (Be)	Batarya ve pil üretimi, elektronik cihaz üretimi, madencilik
Lityum (Li)	Roket yakıtı, yapay kauçuk, eczacılık, cam üretimi, kimya, batarya ve pil üretimi
Molibden (Mo)	Kimya, ilaç, dişçilik, kaplama
Demir (Fe)	Makine, otomotiv, gemi gövdesi yapımı, ve binaların yapısal bileşeni

#### **1.1.3.1.1. Kadmiyumun Kullanım Alanları**

Çok düşük derişimlerde bile biyolojik sistemler için toksik etki gösteren bir ağır metal olup akümülatör yapımı, boya, plastik ve gübre sanayi gibi çeşitli endüstriyel

alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [18]. Kadmiyum hiçbir biyolojik işlevi olmayan toprak, kaya, su ve biyotada düşük konsantrasyonlarda doğal olarak bulunan bir ağır metaldir. Endüstriyel olarak kaynak yapımı esnasında kullanılan alaşım bileşimlerinde, elektrokimyasal kaplamalar, boyalar ve kadmiyumlu pillerin yapımında kullanılmaktadır. Kadmiyum önemli miktarda gümüş kaynaklarda ve spreyci boyalarda da kullanılmaktadır. Isıtma sistemleri, enerji santralleri, metal işleme sanayi, atık yakma, çimento fabrikaları ve gübre sanayi gibi farklı sanayi alanlarında kullanılması sonucu kadmiyumun farklı çevrelerde yaygın bir kirletici haline gelmiştir [19].

#### **1.1.3.1.2. Civanın Kullanım Alanları**

Civa doğada birçok formda bulunmaktadır. Bu formlar metalik civa, elemental civa, inorganik civa ve organik civa olarak da bilinmektedir. Civa, doğada eşsiz ve nadir bulunan bir metaldir. Elektriksel iletkenlik, yüksek yüzey gerilimi ve akışkan özelliği ile bilinmektedir. Bu özellikleri civayı endüstriyel alanlarda kullanılması için cazip hale getirmektedir. Civa nükleer enerji santrallerinde, laboratuvar uygulamalarında, boya sanayinde, diş ürünlerinde, termometrelerde ve nötron emicilerde kullanılmaktadır [20]. Ancak günümüzde kullanımı gerek metalik formunun ve gerekse bileşiklerinin flora ve fauna için çok zehirli olmasından dolayı azaltılmaktadır ve bazı endüstri kollarında kullanımı yasaklanmıştır [21].

#### **1.1.3.1.3. Antimonun Kullanım Alanları**

Antimon biyolojik fonksiyonu bilinmeyen toksisitesi olan bir elementtir. Antimon, insanlar tarafından çok eski zamanlardan beri kullanılan ve günümüzde stratejik önemi olan bir metaldir. Metalurjik olarak demir dışı metaller grubunda yer almaktadır. Kalay ve kurşun gibi metaller, antimon ilave edilerek büyük ölçüde sertleştirilebilirler. Isı ve elektrik geçirgenliğinin az oluşu, alaşımlarda kullanılarak sertleştirici ve korozyonu önlemesi gibi bazı özellikleri nedeniyle birçok sanayinin hammaddesi olarak kullanılmaktadır [22].

Daha çok kömürde ve fosil yakıtların yanması sonucu atmosferde antropojenik antimoni olarak bulunur. Antimon atık yakma, çeşitli alaşımlar, seramik, cam, plastik ve sentetik kumaşlar dahil olmak üzere onlarca endüstriyel ve ticari malzeme yapımında kullanılır. Atmosferik aerosoller, bitkiler, toprak ve sedimentlerde Sb kontaminasyonu, yoğun olduğu halde bu kirliliğin coğrafik yaygınlığı, yoğunluğu ve kronolojisi hakkında çok az kantitatif çalışma bulunmaktadır [23].

Türkiye’de antimon metali, antimonlu şarapnel mermileri, zırhlı yüzeye nüfuz etme yönünden en iyi cephanedir. Antimonun sağlamış olduğu sertlik kurşun-antimon alaşımlarının sürtünmesiz yataklarda daha uzun ömürlü olmasını sağlamaktadır, akü imalatında, bazı askeri malzemelerin yapımında, ulaşım ve makine imalat sektöründe ayrıca antimon oksit boya imalatında ve antimon penta sülfür lastik üretiminde kullanılmaktadır. Doğada 150 kadar Sb içeren mineral bilinmesine karşın, metal üretiminde ve hammadde olarak kullanımda başta antimonit ( $Sb_2S_3$ ), senarmontit ( $Sb_2O_3$ ), valentinit ( $Sb_2O_3$ ), servantit ( $Sb_2O_4$ ) ve kermesit ( $2Sb_2S_3 \cdot Sb_2O_3$ ) mineralleri önem taşımaktadır. En çok bulunan minerali antimonittir ( $Sb_2S_3$ ) [22].

#### **1.1.4. Ağır Metallerin Çevreye Yayılımı**

Ağır metaller biyolojik olarak parçalanamadığından çevre açısından sürekli yaygın kirletici maddelerdir. Bu metaller çeşitli endüstrilerde kullanılır ve atık olarak çevreye deşarj edilmektedir. Çevreye çeşitli formlarda metal girişi mikrobiyal toplulukların faaliyetlerini etkileyebilen çok sayıda modifikasyonlara neden olabilmektedir. Elektro-kaplama, plastik üretim, gübre üretim tesisleri, maden ve metal işletimleri sonrasında ortaya çıkan atıklar ağır metal kirliliğinin yaygın kaynaklarıdır [24]. Bazı ağır metaller temel eser elementler olmasına rağmen mikroorganizmalar, insanlar ve hayvanlar dahil olmak üzere her türlü canlı için yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmektedir. Ağır metaller genellikle, biyomoleküllerin temel fonksiyonel gruplarını bloke ederek, aktif kısımlarını değiştirerek ya da gerekli eser metal iyonları ile yer değiştirerek mikroorganizmalar üzerinde, inhibitör etki ortaya çıkarmaktadır. Ancak, düşük konsantrasyonlarda  $Co^{+2}$ ,



$\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  gibi ağır metal iyonları da metallo-proteinler ve enzimler için hayati kofaktörlerdir [25].

Ağır metaller yağış durumuna göre, doğrudan doğruya toprağa gelip, oradan bitkilere, hatta bazı koşullarda taban sularına ulaşır. Kısmen de yüzeysel akışla uzak çevreye yayılır [26]. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayılımın söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Ağır metallerin doğaya yayınımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlar ağır metal kullanan işletmeler, gübre sanayi, termik santraller, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, ulaşım araçları, demir-çelik, çimento, cam üreten işletmeler ise üretimleri sonucu ortaya çıkardıkları ürünün atıklarını, hava yoluyla bitkilere, hayvanlara ve insanlara ulaştırmaktadır. Sonuçta ağır metal yayınımları farklı sektörlerden biyosfere aşırı bir şekilde yayılmaktadır [27]. Ağır metaller genellikle okyanus yüzeyindeki sularda düşük yoğunluklarda bulunurlar ve oradan yükselip atmosfere taşınırlar. Yüksek seviyeleri sahil kıyılarında ve nehir sularının yüzeyinde meydana gelirler. Her bakımdan zehirleyici özelliğe sahip olan ağır metaller çeşitli kaynaklardan çevreye yayılmakta ve günümüzde çevre kirliliğinin önemli nedenlerinden birini oluşturmaktadır [27, 28].

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

Atık sular, konvansiyonel atık su işleme prosesleri ile biyolojik olarak parçalanamayan önemli konsantrasyonlarda ağır metal içermektedir. Atık sularda yüksek konsantrasyonlarda ağır metal bulunması direkt olarak kontamine olan su ve sucul hayatın üzerinde zararlı etkilere yol açmaktadır. Bu tür kirli suların kullanımı insan sağlığı için ciddi sorunlar getirebilmektedir [10]. Toksik madde içeren ağır metaller, özellikle Cu, Zn, Ni ve Pb toprak yüzeyine yüksek konsantrasyonlarda sulu çamur bırakırlar [29], bunlar gıda zinciri içerisine taşınabilir, yüksek toksik madde içermelerinden dolayı, insan ve hayvan sağlığı ve ürün üretimi üzerinde bir tehdit

unsuru olabilirler. Ağır metaller su ve tarımsal ekosistemlerden besin zincirine girebilir ve insan sağlığını doğrudan tehdit edebilirler. Fosil kökenli maddelerin enerji üretimi amacıyla yakılmaları ve biyosfere salınmaları sonucu, bu elementlerden kaynaklanan kirlilik sorunları da gün geçtikçe artış göstermektedir [27]. Ağır metaller, kendi oksidasyon durumlarına bağlı olarak yüksek tepki verebilir ve sonuç olarak çoğu organizmalara zarar verebilirler [27, 30].

Ağır metal kirliliği dünya üzerinde pek çok yerde biyosferi etkiler. Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn gibi topraklardaki bazı ağır metallerin fazla konsantrasyonları doğal su ve karasal ekosistemlerinin bozulmasına sebep olur [27, 31]. Bazı ağır metaller düşük dozlarda bitkiler için önemli mikro-elementlerdir; fakat yüksek dozlar bitki türlerinin çoğunun büyümesini engeller ve metabolik düzensizliğe sebep olabilir. Araştırmacılar bazı bitki türlerinin metal ağırlıklı topraklarda endemik olduğunu ve ağır metallerin ve diğer toksik bileşenlerin alışılmış miktarından daha fazlasını tolere edebileceğini bildirmişlerdir [27].

Mikroorganizmalar, buldukları ortamlarda çeşitli metaller ile karşılaştıklarından dolayı bunlarla etkileşim halinde olmaları şaşırtıcı değildir. Co, Cu, Ni, Zn, Cd ve oksianyonlar (antimonat, arsenat ve arsenit) dahil olmak üzere bazı metaller özellikle ilgi çekicidir. Bu metaller mikroorganizmaların yaşam süreçlerinde önemli rol oynamaktadırlar.  $Co^{+2}$ ,  $Cr^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi bazı metaller hayati önemi olan mikronutrientler olarak görev yapmaktadırlar ve redoks tepkimelerinde, çeşitli enzim bileşenleri olarak, elektrostatik etkileşimler yoluyla molekülleri stabilize edip ozmotik basıncın düzenlenmesinde kullanılırlar.  $Ag^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Au^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Sb^{+3}$ ,  $As^{+5}$  ve  $Hg^{+2}$  gibi birçok ağır metalin bilinen biyolojik rolü olmayıp ve mikroorganizmalar için oldukça zehirlidirler. Yüksek konsantrasyonlarda, ağır metal iyonları toksik etkilere neden olan spesifik kompleks bileşikleri oluşturur [32].

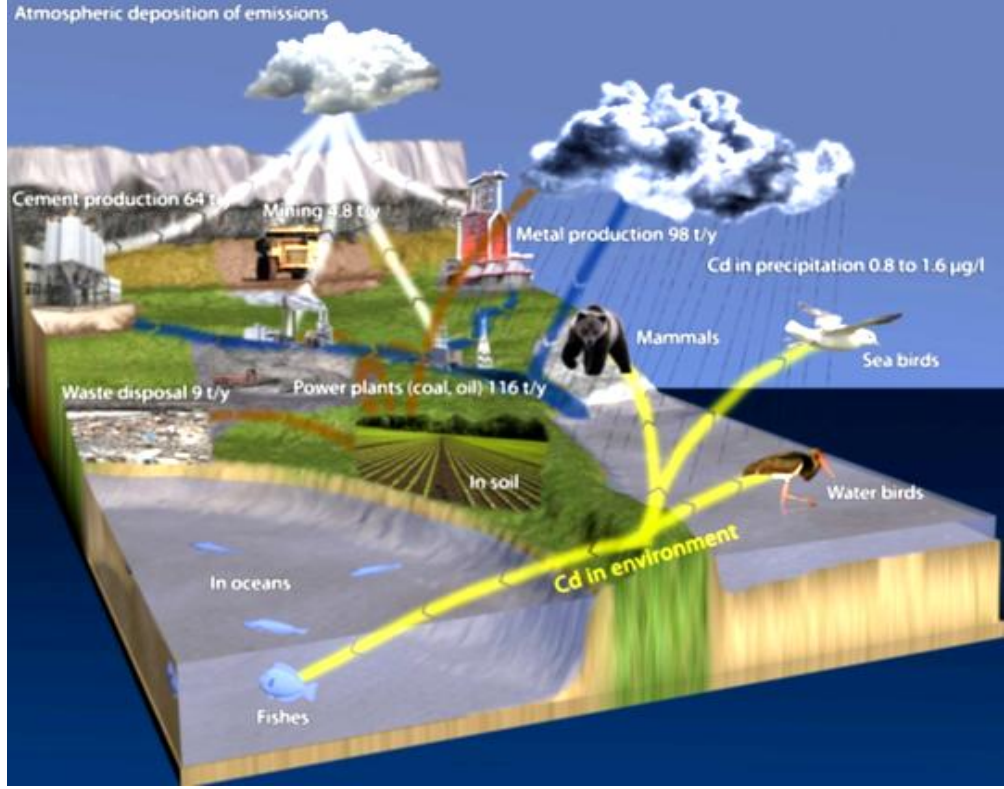
Zn, Ni ve özellikle Cu çok önemli eser elementler olup yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yaratmaktadırlar. Çoğu metal iyonları fizyolojik ya da toksik etki oluşturmak için, bakteri hücresi içerisine girmek zorundadır [33]. Pek çok iki değerli metal katyon ( $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ ) yapısal olarak birbirine çok

benzer. Ayrıca, bu kromat gibi oksianyonların yapısı sülfata benzemekte olup aynı durum arsenat ve fosfat için de geçerlidir. Mikroorganizmalar, sitoplazmik membrandan kemoozmotik gradient tarafından yönlendirilen hızlı ve spesifik olmayan alım sistemlerini kullanırlar [33]. Bu alım sistemleri mikrobiyal hücre içinde ağır metal iyonlarının birikimine yol açmaktadır. Mikrobiyal hücre içinde ağır metal iyonları yüksek konsantrasyonlarda çok toksik olduğu için, mikroorganizmalar metal-iyon denge faktörlerini veya metal direnç belirleyicilerini geliştirmek zorundadırlar [32]. Bu direnç belirleyiciler, ağır metal kontamine ortamlarda mikroorganizmaların yaşaması için detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. Bir diğer metal alım sistemi ATP-bağımlı sistem olup yüksek substrat özgülüğüne sahiptir, daha yavaştır ve genellikle enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanır [34]. Tanımlanmış spesifik olmayan alım sistemlerin aksine, ATP bağımlı alım sistemleri indüklenebilir. Hücre içinde, ağır metal iyonlarının toksisitesi, esansiyel metaller ile yer değiştirip bağlandıkları kısımlara bağlanarak veya ligand etkileşimleri ile oluşabilmektedir [32, 33]. Özellikle yüksek atom numaraları olan ağır metal katyonları örneğin  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  -SH gruplarına bağlanma eğilimindedirler [33]. Ağır metal iyonları -SH gruplarına bağlanmak suretiyle, hassas enzimlerin işlevini inhibe edebilmektedir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), ağır metal iyon toksisitesi ile mikrobiyal büyümeyi tamamen inhibe eden en düşük ağır metal konsantrasyonu olarak tanımlanır [35]. *Escherichia coli* gibi bazı bakteri türlerinin ağır metal iyonlarına karşı dirençleri test edilmiş ve yüksek MİK değerlerinde direnç gösterme yeteneğinde oldukları belirlenmiştir. Bu yüzden yüksek MİK sergileyen bakteri türlerinin, ağır metaller ile kontamine olmuş ortamlarda ve biyomadencilik gibi diğer endüstriyel proseslerde biyoremediasyon için uygulanabilir olması çok önemlidir. Biyomadencilik maden atıklarını kullanarak bakteri, bitkiler gibi canlı organizmaların hücrelerinde altın, gümüş, platin gibi değerli metalleri biriktirmesini ifade eder. Daha sonra, bu organizmalar toplanabilir ve metaller geri kazanılabilir [36]. Diğer ağır metal iyonları, fizyolojik iyonlar ile etkileşime girebilir ve ilgili fizyolojik katyonların fonksiyonu inhibe edebilirler [33]. Gram negatif bakterilerde, metal katyonları glutatyona bağlanabilmektedir. Bu durum, bisglutasyon (GS-SG), metal katyon, ve hidrojen peroksit oluşturmak için moleküler oksijen ile etkileşime giren bisglutasyon komplekslerinin, oluşumuyla sonuçlanır [37]. Bisglutasyonun azaltılıp geri glutatyona dönüşmesi için NADPH

gerekli olduğundan, ağır metal katyonları ciddi oksidatif strese neden olabilir. Buna ek olarak, yüksek konsantrasyonlarda eser elementler ve diğer ağır metal iyonları, enzim özgülüğünü değiştirerek hücresel fonksiyonları bozabilir, hücre zarlarına ve DNA'nın yapısına zarar verebilir [32].

#### **1.1.5.1.1. Kadmiyumun Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri**

Atık sularla kontamine olan çevrelerde bulunan  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  biyolojik olarak parçalanamazlar ve fazla miktarda toksik olmaları nedeniyle büyük sorun oluşturmaktadır. Bu üç metal ABD Çevre Koruma Ajansı'nın öncelikli kirleticiler listesinde yer almaktadır [4]. Düşük konsantrasyonları bile son derece zararlı etkilere sahiptir. Şekil 1.1.'de görüldüğü gibi kadmiyumun özellikle çevre kirliliği görülen denizlerde besin zincirinin önemli bir halkası olan balıklar tarafından alınarak biriktirildiği ve değişik seviyelerde zararlı toksik etkiler meydana getirdiği görülmüştür [38]. Kadmiyum kirliliğinin olduğu topraklarda yetişen bitkiler, bu bitkilerle beslenen hayvanlardan üretilen hayvansal gıdalar ve içme sularına karışan sanayi artıkları aracılığıyla insan bünyesine ulaşır. Solunum yoluyla vücuda alınan Cd, sürekli baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, uykusuzluk, astım, kemik erimesi gibi hastalıklara yol açmaktadır [39].



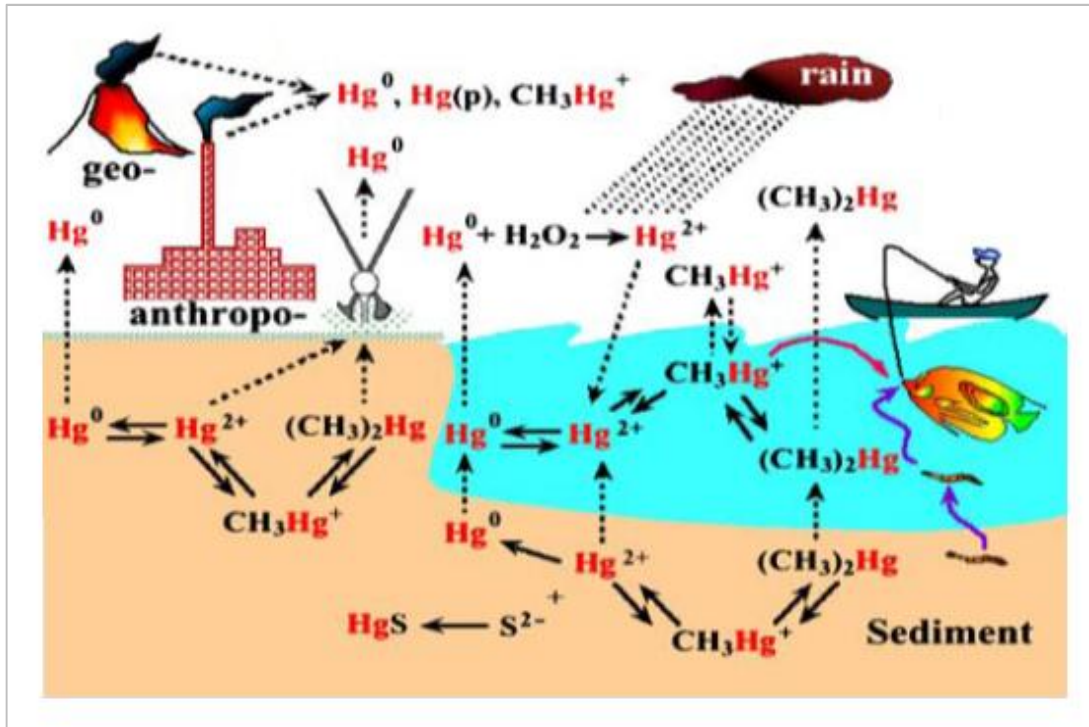
Şekil 1.1. Kadmiyum kirliliği [40]

#### 1.1.5.1.2. Civanın Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri

Civa, enzim ve proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanan toksik bir elementtir. Civa ve sülfidril grupların birleşimi bir organizma içinde hücre fonksiyonlarını durdurabilmektedir. Civa birçok canlı türü için zararlı olduğundan, çevreden civa kirliliğinin uzaklaştırılması gerekmektedir [41]. Bu kirlenmiş alanların içinde civanın fazlaca bulunması çevresindeki ekosistemler için sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaktadır. Civaya sürekli maruz kalma, insan sağlığı ve çevreye zararlı etkilere neden olabilmektedir. Diş amalgam dolgular, ev ürünleri, floresan ampul, kırık termometre ve endüstriyel atıklar gibi faktörler ile civa kirliliğine maruz kalmaktadır. Metil civa sağlık sorunlarına neden olmaktadır. En büyük nedeni civa kirliliğine maruz kalmış balıkların tüketimi ile olmaktadır. Metil civa ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ), civanın en toksik halidir. Çünkü hücre membranları için yüksek adsorpsiyon hızına sahiptir, yaygın olarak nörotoksin etkisi vardır. Civa küçük miktarlarda dahi bütün

organizmalar için toksiktir. Enzim ve proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak hücre fonksiyonlarını inaktive etmektedir [42].

İnorganik civa bileşikleri böbrek, karaciğer ve dalakta birikmekte olup tolerans eşik değerini aşmadığı sürece zararı yoktur ve vücuttan atılmaktadırlar. İnorganik civa bileşiklerine uzun süre maruz kalma toksik semptomların gelişmesine yol açmaktadır. İnorganik civa zehirlenme belirtileri yavaş yavaş gelişir. İlk fiziksel belirtileri; el ve ayak parmaklarında ve daha sonra dudak ve dilde uyuşma görülür. Kilo kaybı, gastrointestinal işlev bozuklukları, halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık kronik zehirlenmelerde gelişen durumlardır. İnorganik civaya yüksek konsantrasyonlarda uzun süreli maruz kalma ölümlü sonuçlanabilir [43].



Şekil 1.2. Küresel civa jeokimyasal döngüsü [44]

### 1.1.5.1.3. Antimonun Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri

Kurşun alaşımlarında, ilaç sanayinde, pil endüstrisinde ve elektronik sanayisinde yoğun kullanılan antimon, insan vücudu için gerekli bir metal değildir. Bulunabildiği

iki oksidasyon kademesine (+3, +5) ait bileşikler zehirlidir. Vücutta bıraktığı temel hasarlar; bağışıklık sisteminde çökme, sinir sisteminde, solunum ve sindirim sistemlerinde ve vücudun diğer sistemlerindeki negatif etkileri olarak tanımlanabilir. Antimon ve bileşiklerine ait çalışmalar hayvanlar üzerinde yoğunlaştırılmış ve her türlü etki hemen hemen tespit edilmiştir. Buna karşılık antimonun insan sağlığı üzerindeki etkilerini içeren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Vücuda hangi yolla girmiş olursa olsun özellikle ciğerler, mide ve bağırsak bölgesinde toplanan antimonun, akut veya kronik etkileri temel olarak mide kasılmaları, mide ağrıları, kusma, deride kızarıklık ve açılan yaralardır. Uzun süreli alınmaları durumunda ciğerlerde ve bronşitler üzerinde negatif etkileri görülmektedir. Ancak antimon bileşiklerine ait en çarpıcı etki kalp ritmini bozması ve sinir sistemi üzerinde düzeltilemez tahribatlara yol açmasıdır. Bunun yanında sürekli maruz kalındığında kilo kaybına, metabolizmanın hızlanmasına ve kan şekerinin düşmesine yola açar [12, 45].

Antimon; madenlerinin işletilmesi, antimon ve antimon bileşiklerinin üretilmesi ve bunun yanında antimon içerikli diğer alaşım ya da bileşiklerin üretimi, eritilmesi ve termik santrallerin baca tozu ile çevreye yayılır [45]. Canlılar için zehirli etkileri olan inorganik antimon bileşikleri;  $SbH_3$ ,  $SbF_3$ ,  $SbCl_3$ ,  $SbCl_5$ ,  $Sb_2O_3$ ,  $Sb_2O_5$ ,  $Sb_2S_3$ ,  $Sb_2S_5$  ve metalik antimondur (Sb). Canlı bünyesine solunum, yeme, içme ile ve deri teması ile geçer. Solunum ile temas sonucunda hayvanlarda ölüm, insanlarda ise solunum sistemi, sinir sistemi ve sindirim sisteminde negatif etkiler yaratmaktadır [12].

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

Genel olarak, kirleticilerin önemli miktarı sanayi, tarım uygulamaları ve diğer insan faaliyetleri de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan çevreye salınmaktadır. Bu kirleticilerin, kimyasal türüne, çevreye dağılımı ve konsantrasyona bağlı olarak ekosistem üzerinde uzun veya kısa vadeli etkileri vardır. Organik kirleticiler biyolojik olarak parçalanıp son ürün olarak karbondioksit ve su oluşabilir ve bu durum döngüsel olarak gerçekleşebilir [46]. Toksik organik ve inorganik maddelerin aksine, çevreye salınan metalik türler kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak parçalanamazlar. As, Sb, Cd, Hg, Cu, Cr, Ni, Co ve Zn gibi ağır metal kirleticileri

toksik olmayan formlara ayrışamaz. Ağır metal kirliliği dünya genelinde bir sorun olup atık su ve endüstriyel atıklardan ağır metallerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması konusu pek çok araştırmacının dikkatini çekmektedir. Presipitasyon, oksidasyon-reduksiyon, iyon değişimi, filtrasyon, membran ya da ters ozmoz ve buharlaştırma gibi geleneksel yöntemler metal kirliliğinin gideriminde kullanılmaktadır [47]. Ancak, tüm bu yöntemlerin yüksek maliyet, düşük verim ve yüksek enerji tüketimi gibi birçok dezavantajları vardır ve çevre dostu değildir [24, 48]. Geleneksel yöntemlerin diğer bir dezavantajı, kullanılan kimyasal yöntemin bir sonucu olarak toksik çamur üretilir, genellikle suyunu almak zordur ve aynı zamanda bertaraf edilmesinde çok dikkatli olunması gerekmektedir [48]. Metal iyon uzaklaştırma işlemleri yüksek reaktif gereksinimden dolayı da dezavantajlıdır. Kimyasal absorbanlar arasında, sadece iyon değişim daha az ekolojik problem yarattığından reçineleri remediasyon için bir seçenek olarak kabul edilmektedir. Ancak, kimyasal reçinelerin pahalı oluşu ve diğer dezavantajlar nedeniyle düşük maliyetli alternatif yöntemler önem kazanmıştır. Uygun maliyet ile zararlı atık ürünler oluşturmadan kontamine ortamları iyileştirmek, kabul edilebilir seviyelerde atık su deşarjı olan çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda alternatif giderim yöntemlerinde biyolojik materyallerin de performansı daha iyi ve düşük maliyetli olduğundan alg, mantar, maya ve bakteri gibi biyolojik materyallerin kullanımı önem kazanmıştır [49].

#### **1.1.7. Biyoremediasyon**

Atıklarda metalin uzaklaştırılması ve düşük maliyet, biyolojik giderimin avantajlarından bazılarıdır [50]. Birçok mikroorganizmanın ağır metal kirliliği açısından biyoremediasyon kapasiteleri yoğun bir şekilde incelenmektedir. Biyoremediasyon organik, inorganik kirleticiler ve ağır metaller ile kontamine olan bölgelerin biyolojik sistemler kullanılarak iyileştirilmesidir. Mikroorganizmalar biyoakümülyasyon, presipitasyon veya biyosorpsiyon yoluyla ağır metal uzaklaştırabilmektedir [50, 51]. Mikroorganizmalarda biyoakümülyasyon, ağır metal iyonlarının dışarıdan mikrobiyal hücre içine membran boyunca taşınıp belirli konsantrasyonlarda biriktirilmesidir. Biyosorpsiyonda ağır metal iyonları özellikle



pozitif yüklü metal iyonları, hücre yüzeylerinde negatif iyonik gruplara bağlanmaktadır. Biyoremediasyon, çözünürlükte, sorpsiyon özelliklerinde, taşıma özelliklerinde ve metal toksisitesinde değişikliklere yol açmaktadır [50]. Biyoremediasyonda, ağır metal kirleticilerinin çözünürlüğü, katı maddeden uzaklaştırılması ile sağlanır. Bazı mikrobiyal türler ile ağır metal iyonlarının enzimatik redüksiyonu gerçekleşir ve ağır metal iyonlarının indirgenmiş formu çözünmez ve çökelti halinde olabilmektedir [33].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda metal ile kontamine olmuş ortamlarda hayatta kalabilen arke ve bakteriyel populasyonların analizi için moleküler teknikler uygulanmaktadır. Yıllarca ağır metal içeren çamur ve kanalizasyon sularının giderilmeye çalışıldığı topraklardaki bakteri toplulukları sekanslama, klonlama ve FISH dahil rRNA uygulamaları kullanılarak analiz edilmektedir [7]. Bazı organizmaların detoksifikasyon mekanizmalarının metal biyoremediasyonunda yararlı olabildiği düşünülmekte ve izole edilen metal dirençli bakterilerin direnç mekanizmaları kıyaslanmaktadır. Son zamanlarda, ağır metal toleranslı tütün bitkisi patojeni *Ralstonia eutropha* hücre yüzeyindeki metallothionein proteinleri ile  $Cd^{+2}$  ile kontamine olmuş topraktan ağır metalin toksik etkisini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir [7].

#### **1.1.8. Bakterilerde Ağır Metal Direnç Mekanizmaları**

Bakteriler, çevrelerindeki tüm toksik metal iyonlarına karşı direnç gösterebilirler.  $Ag^{+}$ ,  $AsO^{-2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Sb^{+3}$ ,  $TeO_3^{-2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi toksik ağır metal iyonları için özel direnç sistemlerini kodlayan genlerin plazmitler üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Karbon bileşiklerinin aksine bazı inorganik iyonlar düşük seviyelerde besinsel açıdan gereklidir fakat yüksek seviyelerde ( $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  gibi) toksik olabilmektedirler.  $Hg^{+2}$  ve  $AsO^{-2}$  gibi diğer inorganik iyonlar ise her zaman zehirlidir ve bakterilerde metabolik fonksiyonları yoktur. Toksik metallerin çevre mikrobiyolojisini ve biyoremediasyonu için mikrobiyal süreçlerde kullanmak için, öncelikle temel biyokimyasal faaliyetlerini ve genetik belirleyicilerini anlamak gerekir. Metal iyon direnç sistemleri, *E. coli*'den *Streptomyces*'e kadar araştırılmış

birçoğunda plazmit üzerinde tespit edilmiştir. Başlangıçta direnç mekanizmaları ile ilgili genler, plazmitlerde bulunmuş daha sonra kromozomlarda da bu genlerin olduğu görülmüştür [52].

Bazı ağır metaller eser elementler olsa da, çoğu yüksek konsantrasyonlarda, hücre içinde kompleks bileşikler oluşturarak, mikroorganizmalar dahil olmak üzere canlılar için toksik olabilmektedirler. Mikroorganizmalar ağır metalleri tolere etmek için ya atım, kompleks oluşturma veya metal iyon redüksiyonu ya da anaerobik solunumda terminal elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Şimdiye kadar Cu, Zn, As, Cr, Cd ve Ni gibi metaller için tolerans mekanizmaları tespit edilmiş ve ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Hücre dışına metal iyonlarının atımında hem kromozomal hem de plazmit üzerinde kodlanan ilgili genlerin tespit edildiği birçok mekanizma çalışılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından ağır metal iyonlarının alımı ve sonra atımı genellikle bir redoks reaksiyonu gerektirdiğinden, metal dirençli bakteriler bu metal iyonlarının biyojeokimyasal döngüsünde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bir ağır metalin oksidasyon durumu metalin çözünürlük ve toksisitesi ile ilgilidir. Ayrıca, bir metal iyonunun oksidasyon hali, çözünürlüğü ile belirlenebilmekte ve birçok bilim adamı ağır metalleri okside veya redükte etmek amacıyla metal kontaminasyonuna maruz kalmış çevrelerin remediasyonu için mikroorganizmaları kullanmaktadır [53].

Yüksek konsantrasyonlarda, ağır metal iyonları hücrelerde toksik bileşikler oluşturabilirler [33]. Toksik etki oluşturmak için öncelikle ağır metal iyonlarının hücre içine girmesi gerekmektedir. Bazı ağır metaller enzimatik fonksiyonlar ve bakteri üremesi için gerekli olduğundan, hücre içine metal iyonlarının girişine izin veren alım mekanizmaları bulunmaktadır. İki genel alım sistemi vardır. Birincisi ATP gerektirmeyen hücre zarından bir kemoozmotik gradient ile geçişi sağlayan çabuk ve spesifik olmayan sistem, ikincisi ATP hidrolizinden enerji sağlayan daha yavaş ve daha substrata özgü bir sistemdir. İlk mekanizmanın enerji bakımından verimli olması daha fazla ağır metalin hücreye girmesine neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda bu metallerin bulunması daha sonra hücre içerisinde toksik etkilerinin olması muhtemeldir [53].

Mikroorganizmalar arasında, bakteri, maya ve protozoalar genellikle çevredeki ağır metallere maruz kalan ilk canlı grubu olduğundan toksik ağır metallerin varlığına adapte olabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Çeşitli adaptasyon mekanizmaları arasında metal Emilimi, mineralizasyon, hücre içine alım, akümülyasyon, ekstraselüler presipitasyon, enzimatik oksidasyon veya daha az toksik forma dönüştürmek için redüksiyon ve hücreden ağır metallerin atılımı bildirilmiştir. Ağır metal dirençli mikroorganizmalar, atıksu arıtma prosesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu dirençli mikroorganizmaların detoksifikasyon yetenekleri atık sulardaki ağır metallerin biyoremediasyonu için manipüle edilebilmektedir. Ağır metalle kontamine olan atıklar, bu mikroorganizmaların biyosorpsiyon, biyoakümülyasyon ve biopresipitasyon gibi mekanizmaları ile iyileştirilebilmektedir [10].

Bakteri hücreleri maruz kaldıkları toksik metalleri bloke etmek veya hücresel işlevlerinde değişiklikler yapmak için gerekli proteinlerin ve enzimlerin sentezinden sorumlu gen veya genleri taşımak zorundadırlar. Metal kirliliğine maruz kalmış ve belirgin toksisiteye rağmen, pek çok mikroorganizma direnç mekanizmaları sayesinde hayatta kalabilmektedir. Bu mekanizmalar enzimatik detoksifikasyon ile kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metal bağlayıcı peptid ve proteinlerin üretimi (metallothioneinler, phytochelatinler gibi) ile hücre içinde veya dışında tutulması, organik ve inorganik presipitasyon, aktif transport ile atım ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi şeklinde gerçekleşmektedir [54]. Hg, Cd ve Pb'nin insanlar dahil canlılar için toksik metaller oldukları bilinmektedir. Birkaç deniz bakterisi 25 ppm Hg konsantrasyonunda yaşayarak yüksek oranda dirençlilik göstermiştir. Bu çalışma boyunca yüksek civa konsantrasyonları denenerek bakterilerin Pb ve Cd detoksifiye edebilme yetenekleri de değerlendirilmiştir. Sonuçlar bakterilerin sadece Hg değil, Cd ve Pb'yi detoksifiye edebilme potansiyellerinin de olduğunu göstermiştir. Biyokimyasal ve 16S rRNA gen sekans analizleri ile izole edilen bu bakteriler *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* ve *Brevibacterium iodinium* olarak tanımlanmıştır [4]. Tek bir bakteri birçok metale karşı dirençli olabilmektedir. *P. putida* KT2440 genomu birçok metale direnç ve toleransı sağlayan

61 open reading frame içermektedir. Hg, Cd, Zn, Sn, Cu ve Pb gibi birçok metale karşı dirençliliği olan izole edilmiş bir bakteride bulunmuştur [4].

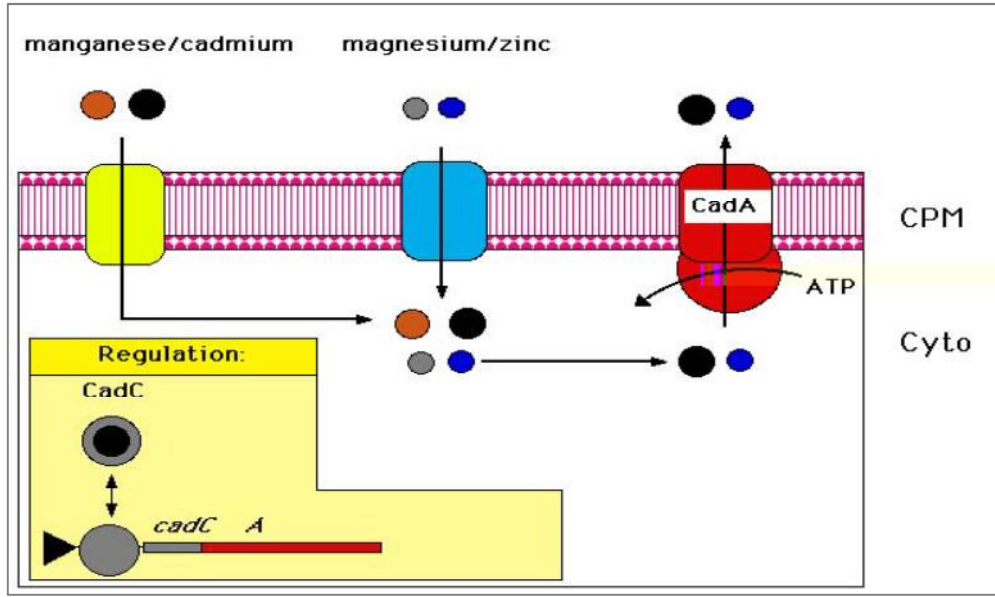
#### 1.1.8.1.1. Kadmiyum Direnç Mekanizması

Kimyasal çöktürme, iyon değişimi ve adsorpsiyon gibi konvansiyonel atıksu işleme prosesleri verimsiz ya da pahalı olabileceğinden, kadmiyumun giderilmesinde biyolojik prosesler son yıllarda öne çıkmıştır. Son on yılda bakteri, mantar ve alg gibi farklı biyokütle türleri belirlenip yaygın olarak çalışılmaktadır. Yaygın bir maya olan *Rhodotorula* sp., potansiyel olarak ağır metallere karşı direnç göstermektedir ve ağır metal toksisitesinin giderimi için biyoremediasyonda kullanılması uygun olup sistematik olarak araştırılmamıştır. *R. rubra*'nın Cd ve Pb akümüle edebildiğini bildirmişlerdir. *Rhodotorula*'nın iyon değişimi ve ekstrasellüler presipitasyon ile  $Pb^{+2}$  giderim mekanizması olduğunu göstermiştir [55].

Toprak bakterilerinde Cd dirençliliği, çeşitli genetik sistemler ile gerçekleşmektedir ve iyi bilinen direnç sistemlerinden biri olan Cd atım sistemi, Cd direnç genini kodlayan *cadA* operonu tarafından kodlanmaktadır. *cadA* gen homologlarının *Staphylococcus aureus*, *Bacillus firmus*, *Listeria monocytogenes* ve *Lactococcus lactis* gibi gram pozitif bakterilerde ve gram negatif bakteri olan *Stenotrophomonas maltophilia*'da yaygın olduğu bildirilmiştir [56].

Kadmiyum remediasyonunda, potansiyel organizmalar belirtilmiştir. Bioadsorpsiyon, biyoakümülyasyon ve biyotransformasyon için belirlenen potansiyel organizmalar, kontamine çevrelerden ağır metal gideriminde önem taşımaktadır. Sharma ve Fulekar (2009) tarafından tanımlanmış olan *Buttiauxella izardii* DSM 9397'nin Cd remediasyonunda, biyoakümülyasyon mekanizması ile daha etkili bir suş olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, bu suşun biyokimyasal analizler, sekanslama filogenetik ağaç ve BLAST, Clustal W ve FASTA gibi biyoinformatik tekniklere dayanılarak identifikasyonu yapılmıştır [57].

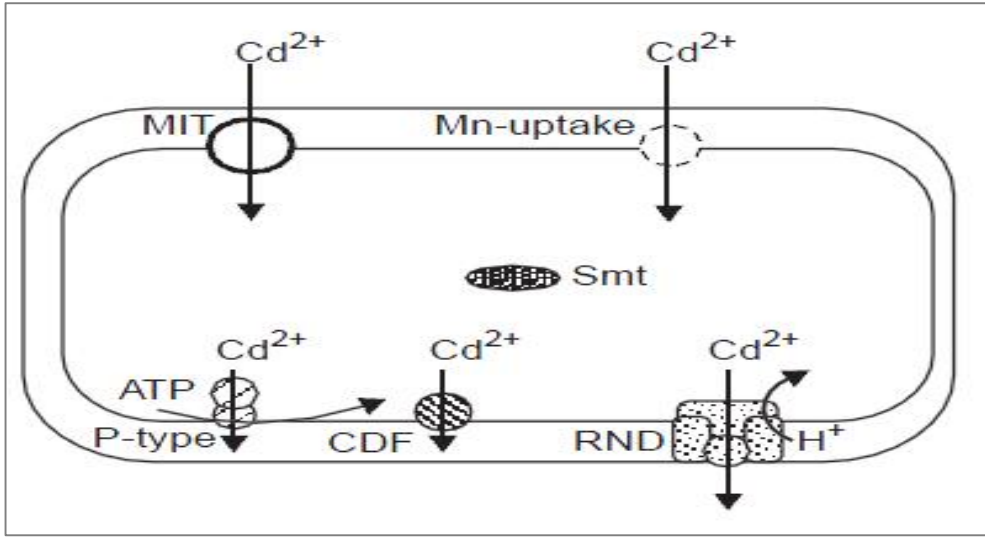
Kadmiyuma karşı bakteriyel direnç ilk kez *S. aureus*'ta tanımlanmıştır. *cadA* ve *cadB* olarak adlandırılan iki direnç belirleyici, pI258 üzerinde bulunmuştur. Daha sonra benzer dirençlilik *E. coli*'de bulunmuştur. *cadA* direnç belirleyici *cadA* ve *cadC* genlerini içermektedir. *cadA* ATP bağımlı membran akış pompası ve *cadC*, operon için baskılayıcı bir proteindir. *cadA*, Cd dirençliliğini sağlamak için ATP hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanarak Cd iyonlarını hücre membranından geçirmektedir [58].



Şekil 1.3. *S. aureus*'ta Cd ve Zn direnci ve transportu [34]

Gram pozitif bakterilerde,  $Cd^{+2}$ 'nin birikimi P1258 plazmiti ve ilgili plazmitler üzerinde yer alan *cadA* direnç sisteminin ekspresyonuna (Şekil 1.3.) neden olur. *cadA* aktif iyon atımını sağlayan bir direnç sistemidir. *cadA* direnç determinanı indüklenebilirdir ve *cadC* gen ürününün, bu sistemde trans-etkili DNA bağlayıcı bir düzenleyici protein olduğu bilinmektedir. Katyon atımı bir P-tipi ATPaz olan *cadA* proteini tarafından katalize edilir [34]. ATP, *cadA* katalizli kadmiyum iyonunun taşınması için bir enerji kaynağı olarak işlev görür. *cadA*, P-tipi ATPaz (CPx-ATPaz) olup *Staphylococcus* ve *Bacillus* gibi gram pozitif bakterilerde genellikle bulunmaktadır. ATPaz proteini, dirençli hücreler  $Cd^{+2}$ 'ye maruz kaldıklarında sentezlenmektedir. Bu protein enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanarak intraselüler

$Cd^{+2}$ 'yi hücreden uzaklaştırmaktadır [34, 56].  $Cd^{+2}$ 'nin enzimatik detoksifikasyonu ile toksik formlar oluştuğundan, mikroorganizmalar kadmiyumun hücre dışına aktif transport ile atılması şeklinde bir direnç mekanizması geliştirmişlerdir [2]. Şekil 1.4'te görüldüğü gibi gram negatif bakterilerde,  $Cd^{+2}$  bir çinko taşıyıcısı Czc ve nikel taşıyıcısı Ncc gibi RND sistemleri tarafından detoksifiye olmaktadır [59]. *Ralstonia* sp. CH34, ve *S. cerevisiae*'da  $Cd^{+2}$  magnezyum alım sistem ya da sistemleri tarafından akümüle edilmektedir. Diğer bakterilerde,  $Cd^{+2}$ , bazı  $Mn^{+2}$  alım sistem ile hücreye girmektedir [33].

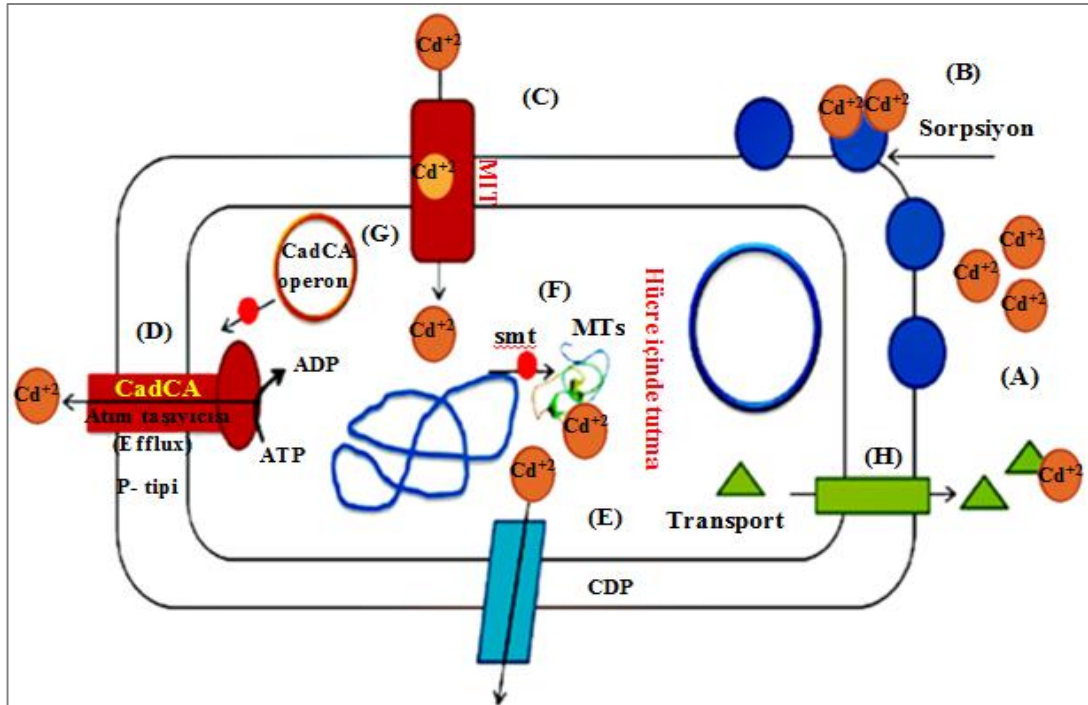


**Şekil 1.4.** Magnezyum veya manganez alımı sistemleri;  $Cd^{+2}$  alımından sorumludur ve gram negatif bakterilerde RND odaklı ulaşım şeklini alır ve muhtemelen de CDF taşıyıcılar tarafından hücre dışına atılmaktadır [33]

*Synechococcus* denizlerde yaşayan bir siyanobakterdir. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır. Siyanobakterilerde, *smtA* tarafından kodlanan,  $Cd^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ 'ye bağlanan metalotionin benzeri proteini (*smt*) karakterize edilmiştir [33]. Bu gen yüksek düzeydeki  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin represörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Metalotioninler, tiyol içeren sisteince zengin ağır metal bağlayıcı proteinler olup hücre içinde potansiyel olarak serbest toksik metal iyonlarının birikimini önlemektedirler. Ağır metal iyon bağlama, sistein içeren tiyol

grupları ile iyonların etkileşimi ile gerçekleşmektedir. Metallothionein genleri hem *smtA* (metallothionein proteinini kodlama) ve *smtB* (represör, düzenleyici proteinini kodlama) genlerini içeren, *smt* operonu tarafından düzenlenmektedir. *smt* metallothionein lokusunun amplifikasyonu ile Cd direncinin arttığı ve *smt* delesyonu ile direncin azaldığı belirlenmiştir [33].

Şekil 1.5.'te bakterilerde Cd direnç mekanizması: (A) çevreden gelen  $Cd^{+2}$  iyonları; (B) Bakteri hücre duvarında  $Cd^{+2}$  iyonlarının tutulması (protein, karbonhidrat); (C) metal iyon transport sistemi (MIT) ile hücre içine  $Cd^{+2}$ 'nin girişi; (D) P-tipi ATPaz olan *cadCA* protein ile  $Cd^{+2}$ 'nin atım (Efflux) yoluyla transportu; (E) katyon-difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) ile katalize edilen yavaş atım; (F) bakteriyel kromozom tarafından kodlanan *smt* metallothionein proteinleri Cd bağlayarak hücre içinde tutma (G) *S. aureus* plazmit üzerinde *cadCA* operonu *cadCA* proteinini kodlar (D). (G)  $Cd^{+2}$  iyonlarının hücre içine girmesini engellemek için  $Cd^{+2}$  iyonları ile kompleks oluşturan bileşiklerin hücre dışına salınması şeklinde kısaca anlatılmıştır [40].



Şekil 1.5. Bakterilerde Cd direnç mekanizmaları [40]

### 1.1.8.1.2. Civa Direnç Mekanizması

Civanın biyolojik bir rolü yoktur ve yaşamın tüm formları için çok zehirli bir metaldir. Toksik metal direnç sistemlerinin anlaşılmasında civa ve organomercurial direnç mekanizmaları başta gelmektedir. Hg direnci, gram negatif ve pozitif bakterilerden çevre, klinik ve endüstriyel izolatlarında yaygın olarak bulunur. Civa direnç genleri sıklıkla plazmit üzerinde ya da transpozonlar üzerinde kodlanmaktadır. Hg direncinin transpozon Tn21'de, önce Japonya'da bulunan birkaç antibiyotik direncini taşıyan 94 kb boyutundaki R100 plazmiti üzerinde yaklaşık 8 kb'lik kısmında kodlandığı tespit edilmiştir [60, 44]. Kromozomal Hg direnci *Bacillus* izolatlarında yaygındır [44]. Hg<sup>+2</sup> direnç mekanizması spesifiktir ve diğer toksik metal iyonlarında farklıdır. Abiyotik ve diğer mikrobiyal faktörler ile birlikte mer direnç mekanizması, küresel Hg döngüsüne önemli şekilde katkıda bulunur. Ağırlıklı olarak anaerobik sülfat indirgeyen bakteriler tarafından doğal ortamda metil kobalamin tarafından metil civaya (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) dönüştürülür. Bu yüzden küresel civa döngüsü öncelikle mikrobiyal yöntemlerle çalışır (Şekil 1.2.) [44].

Civa, *E. coli*'de test edilen en toksik elementlerden biridir. Tiyol grupları için civa afinitesi kadmiyum afinitesinden daha güçlüdür. Enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanarak bu sayede canlı hücre fonksiyonlarını inaktive eder [61].

Küresel jeolojik ve antropojenik aktiviteler ile yayılan zehirli civa bileşikleri bir yanıt olarak, mikroorganizmalar geliştirmiş oldukları direnç belirleyicileri ile hücre içi taşınmada rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. Yoğun çalışılan direnç sistemine en iyi örnek, enzimatik redüksiyon bakteride metalik civa Hg<sup>+2</sup>'nin Hg<sup>0</sup> metalik civaya detoksifikasyonunu sağlayan *mer* operonunun, içinde kümelenmiş genlere dayanmaktadır [44, 62].

Hg direnç belirleyicileri, farklı ortamlardan izole edilen gram negatif ve gram pozitif bakterilerin birçoğunda tespit edilmiştir. *mer* operonu plazmit ve kromozomlar üzerinde lokalize olmuştur [60]. İki ana mer belirleyicisi tanımlanmıştır; dar spektrumlu *mer* belirleyicileri, yalnızca inorganik civa tuzlarına karşı direnç kazandırır, geniş spektrumlu *mer* belirleyicileri ise inorganik civa tuzlarının yanı



sıra metil civa ve fenil civa gibi organomerkuriallere karşı da direnç kazandırırılar [43]. Bazı bakteriler  $Hg^{+2}$  dirençliliği sağlayan ve *mer* operonu tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon, sadece  $Hg^{2+}$ 'yi detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir. *mer* operonu, organik civa liyaz ve civa redüktaz olmak üzere iki enzim kodlamaktadır. Organik civa liyaz enzimi C-Hg bağıını kırarken, civa redüktaz  $Hg^{+2}$ 'yi  $Hg^0$  (metalik civa) indirgemektedir. *mer* operonu tarafından kodlanan transport proteinleri aracılığı ile metalik civa, hücre membranından geçirilerek dışarı verilmektedir [44, 60, 61]. *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*,  $Hg^{+2}$ 'ye karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir [62].

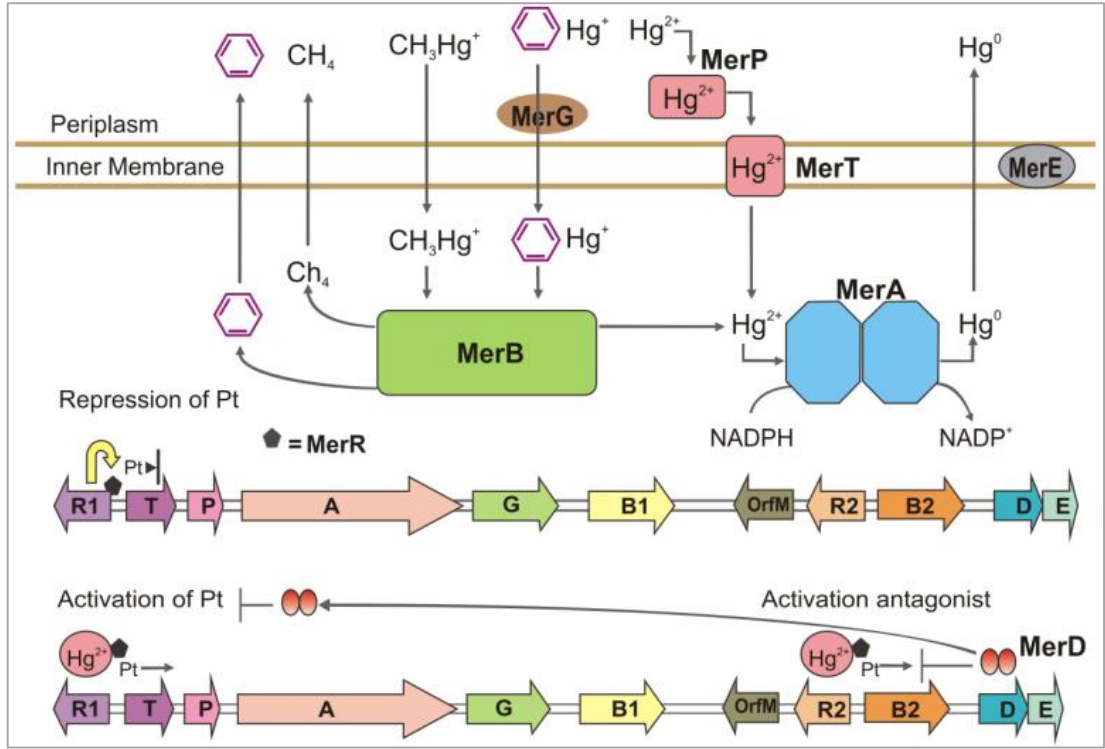
*mer* operonunun işlevleri;  $Hg^{+2}$ 'nin hücre içerisine transportu, iyonik civanın nispeten daha az toksik olan elemental civaya ( $Hg^0$ ) enzimatik NADPH bağımlı dönüşümü ve fonksiyonel genlerin regülasyonu şeklindedir. *mer* operonunda *merT*, *merP* (transport), *merA* (civa redüksiyonu), *merB* (organik kalıntıdan civanın ayrılması), *merR* ve *merD* (regülasyon), *merC* ve *merF* (membran proteinleri, transport işlevini yerine getirir) ve *merG* (fenil civaya direnç) genleri yer almaktadır (Şekil 1.6.). *mer* operonunda, *mer* genleri farklı roller oynar. Bu genlerin fonksiyonları;

*merR*:  $Hg^{+2}$  yokluğunda kendi yapısal genin transkripsiyonunda represör-baskılayıcı olarak görev alan metalloregulator DNA bağlayıcı proteindir. Bunun yanısıra  $Hg^{+2}$  varlığında yapısal genin transkripsiyonunda pozitif efektör olarak görev yapar.

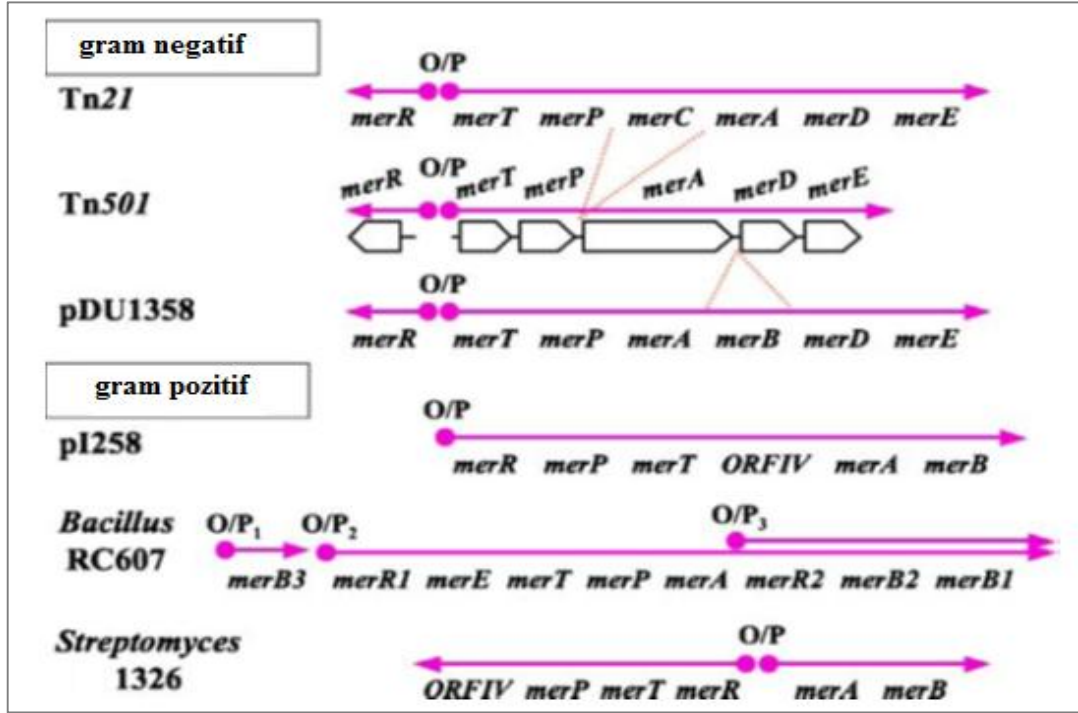
*merB*: Organociva liyaz, NADPH'yi enerji kaynağı olarak kullanarak mekanizması ile organomerkurial bileşiklerin hidrokarbon ve  $Hg^{+2}$ 'ye protonolitik parçalanmasını katalize eder.

*merA*: Civa iyon redüktaz, FAD ve redoks aktif disülfid içeren bir enzim olup glutasyon redüktaz ile homoloji gösterir. Bu enzim  $Hg^{+2}$  bileşiklerini daha az toksik olan metalik civayı elemental civaya redükte eder [44, 63].

Diğer bakteriyel periplazmik bağlayıcı protein-bağımlı taşıma sistemleri ile karşılaştırmaya dayanarak dış zar boyunca  $Hg^{+2}$ 'nin difüze olduğu öne sürülmüştür.  $Hg^{+2}$  iyonları bir dizi taşıyıcı proteinlerle hücre dışına taşınır. Periplazmadaki *merP* proteini üzerinde  $Hg^{+2}$ 'ye bağlanan bir çift sistein bulunmaktadır.  $Hg^{+2}$  sonra sitoplazmik membran proteini olan *merT* üzerindeki bir çift sisteine aktarılır ve son olarak *merA* (civa redüktaz) aktif yerinde bir sistein çiftine transfer edilir. NADPH-bağımlı reaksiyon ile  $Hg^{+2}$   $Hg^0$ 'a indirgenir. Toksik olmayan  $Hg^0$  buharlaşarak hücreden uzaklaşır [64].



**Şekil 1.6.** Gram negatif bakterilerde Hg direnç operon (*mer*) modeli (Organik ve inorganik civa detoksifikasyonu ve *mer* genlerinin regülasyonunda bakteriyel mekanizmalar [65])

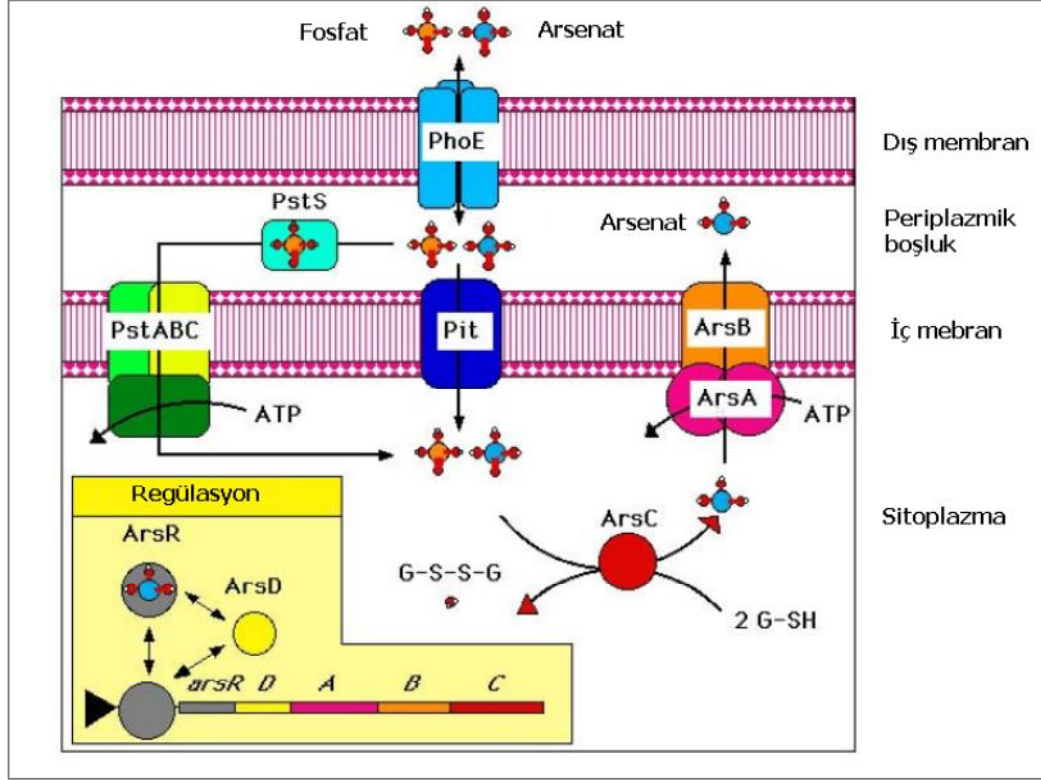


Şekil 1.7. *mer* operonlarında genlerin düzenlenişi [66]

### 1.1.8.1.3. Antimon Direnç Mekanizması

Arsenit ( $As^{+3}$ ), antimonit ( $Sb^{+3}$ ) ve arsenat ( $As^{+5}$ ) direnci hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde görülmektedir. Arsenik direnci plazmit üzerinde kodlanan (*ars*) operonlar ile bağlantılıdır. Plazmit ile kodlanmış arsenik dirençliliği birçok antibiyotiğe direnç ortaya çıkmadan önce bakteri türleri arasında yaygındır [69]. Redüksiyon ile ağır metal iyonlarının detoksifikasyonu  $As^{+5}$ 'in  $As^{+3}$ 'e dönüştürülmesinde kapsamlı olarak çalışılmıştır. Hücre enzimatik detoksifikasyon ile metali redükte eder ve redükte olan ürünler atım sistemi ile uzaklaştırılır [33]. Direnç mekanizmaları kromozomal veya plazmit aracılı olabilmektedir. Arsenik oksianyonları bakteri hücrelerine diğer bileşiklerin taşıyıcıları ile girmektedir. *E. coli*'de, arsenat alımı her zaman fosfat taşıyıcı Pit (inorganik fosfat alımı) ve Pst pompalar aracılığı ile olmaktadır (Şekil 1.8.) [33, 68]. Fosfat yoğunluğunda daha az spesifik olan Pit kanal sistemi, hücrenin fosfat ihtiyacını karşılarken, arsenat birikimine yol açar. Fosfat açlığında, çok spesifik Pst-sistemi fosfat alımı için indüklenir ve iç zarı, Pst fosfat-bağlayıcı proteini ve PstABC ATPaz kompleksini

kullanır. Ancak Pit sistemi, arsenat alımı için baskın sistem gibi görünmektedir. Benzer şekilde, bir ökaryot olan, *S. erevisiae*'da, arsenat alımında çeşitli fosfat taşıyıcılar görev almaktadır [68].



**Şekil 1.8.** *E. coli*'de arsenat direnci ve transportu. OM, dış membran; Peri, periplazmik aralık; CPM, stoplazmik membran; Cyto, sitoplazmik aralık; G-SH, redüklenmiş glutatyon; G-S-S-G, oksitlenmiş glutatyon [34]

*E. coli* R773 plazmitinde yer alan *ars* operonu ile arsenik ve antimon toksik oksianyonlarına karşı direnç gösterilmektedir [67, 69]. Her iki oksianyon Pit veya Pst sistem tarafından sitoplazmada taşınır [34]. *E. coli* konjugal R773 plazmiti *ars* operonu *arsRDABC* olmak üzere beş gen içermektedir. *arsR* ve *arsD* genleri regülator proteinleri, *arsA* ve *arsB* genleri bir ATP odaklı arsenit pompasının alt birimlerini kodlamaktadır. *arsA* geninin yokluğunda, tek başına *arsB* gen ürünü, ikincil uniporter olarak işlev görüp, büyük olasılıkla kısmi arsenit direnci sağlamaktadır. Arsenik direnci, *arsC* gen ürünü ile arsenite indirgenir ve arsenit taşıma sistemi ile hücreden uzaklaştırılır [67]. Arsenat ele alındığında, önce arsenite

indirgenir. *E. coli* ve *S. aureus*'ta arsenat, *arsC* geni tarafından kodlanan *arsC* enzimi tarafından arsenite indirgenir ve arsenite özgü *arsB* proteini yoluyla hücre dışına atılır [34, 67]. Glutasyon ve tiyoredoksin sırasıyla *E. coli* ve *S. aureus*'ta potansiyel redüksiyon kaynağı olarak görev yapmaktadırlar. *arsR* represör proteini ve *arsD* koregülatör proteini *arsRDABC* operonunu düzenler (Şekil 1.8.) [34].

Arsenik ve antimon oksianyonlarının kimyasal özellikleri benzer olduğundan, aynı yol ile taşınmaktadır. Arsenik gibi antimon direncinde de hücre içine alınan bu metaller detoksifiye edilip hücre dışına atılırlar [70, 71]. Antimonit bu indüklenbilir direnç sistemlerinde indükleyici olarak da işlev görmektedir.  $Sb^{+3}$ 'ün inorganik formlarının *E. coli* hücrelerine gliseroporin GlpF kanalı ile alımı kolaylaştırılır [68] ve  $Sb^{+3}$ 'ün transportu *arsB* taşıyıcı protein ile katalize edilir. NADH oksidasyonu ile sağlanan enerji ile hücre dışına doğru membran veziküllerinde  $Sb^{+3}$  akümüle edilir. *arsB* proteini ile  $Sb^{+3}$ 'ün taşınması, pH gradienti ya da membran potansiyeli ile gerçekleşir [72].

### 1.1.9. Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği

Ağır metallerin endüstriyel ve maden atıklarıyla farklı formlarda çevreye girmesi mikroorganizmaların aktivitelerinde önemli değişimlere neden olmaktadır. Son yıllarda antibiyotik ve ağır metallere karşı dirençli bakteriler ve bunların dirençlilik yolları farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Ekolojik çalışmalar antibiyotik ve ağır metal dirençliliğinin global öneme sahip olduğunu göstermektedir [73].

Antibiyotiklerin uygunsuz ve gelişigüzel kullanımı ile gerek toplum kökenli gerekse hastane kökenli dirençli mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda ciddi tedavi sorunları yaşanmaktadır. Bir antibiyotiğe dirençli olan etken kısa sürede birden çok ilaca karşı da direnç kazanmakta ve bu çoğul dirençli mikroorganizmalar hızla ortama yayılmaktadır [74]. Hastane, endüstriyel ve zirai atıkların verildiği suların dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında büyük rol oynadığı bilinmektedir. Antibiyotiklere ve ağır metallere dirençli bakterilerin özellikle sucul ortamlarda gen transfer yöntemleriyle hassas bakterilere antibiyotik ve ağır metal dirençliliği

kazandırmaktadır. Plazmitler, antibiyotik ve ağır metal dirençlilik genlerini taşımaktadır [73]. Ağır metal toleransına önemli bir katkıda antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Antibiyotik ve ağır metal direnci çoğu bakteride genellikle bir operonda kümelenmiş, birlikte transkripte olabilen, işlevsel olarak bağlantılı birçok genlerle yapılmaktadır. Plazmitler üzerinde farklı direnç genlerinin kümeleşmiş olması, bakteriler arasında çoğul direncin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Direnç plazmitleri; konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyonla duyarlı olan alıcı bakterilere horizontal olarak aktarıldığında, onlarda da bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direncin oluşumuna yol açmaktadırlar. Bakterilerde aynı plazmit üzerinde birlikte bulunması ve böylece daha fazla ortamda birlikte transfer olmaları muhtemel olduğundan bakterilerin metal toleransı ve antibiyotik dirençliliği arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [53, 74].

Karakterize edilmiş Hg dirençlilik genlerinin çoğu plazmit kökenlidir. Bununla birlikte, homolog kromozomal genlerin çoğunluğu bazı gram pozitif bakterilerde bulunmuştur. *mer* direnç genlerinin birçoğu transpozonlar üzerinde de tespit edilmiştir [44, 60]. Transpozonlar; bir bakteri içinde kromozomla veya plazmitle bağlanmış olarak, kromozom veya plazmit üzerinde aynı anda karşılıklı olarak yer değiştirebilen, çeşitli antibiyotik ve ilaca dirençte önemli görevleri olan özel genler taşıyan, DNA karakterlerinde çift iplikli lineer genetik elementlerdir [60, 75].

Çoklu metal direnci konusunda Gilotra ve Srivastava (1997), yaptıkları bir çalışmada, topraktan izole ettikleri *Pseudomonas pickettii* US321 suşunun, ampisilin, eritromisin gibi antibiyotiklerle, 2 mM Cd, 25 mM Zn ve 2 mM Cu ağır metallerine direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada US321 suşunun pUS321 adlı yüksek moleküler ağırlıklı bir plazmit bulundurduğu rapor edilmiştir [76].

Abosereh ve arkadaşları (2007), *Pseudomonas* suşlarında çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini belirlemişlerdir. Gümüş dirençliliği olan suşların Cu, Ni, Fe, Hg, Zn, Cd ve Pb metallerine de ortak direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca gümüş dirençli *Pseudomonas* suşlarının kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine de ortak direnç gösterdikleri saptanmıştır [77].

Yapılan bir diğer çalışmada Rajbanshi ve arkadaşları (2008), krom metaline direnç gösteren *Klebsiella pneumoniae* suşunun antibiyotik dirençliliğini incelemişlerdir. Bu suşun gentamisin, kotrimoksazol antibiyotiklerine duyarlı olduğu tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiklerine karşı da dirençli olduğu görülmüştür [10].

Abosereh ve arkadaşları (2007), *Pseudomonas* suşlarında Ag dirençlilik profillerini incelemiş ve bu dirençliliğin düşük ve yüksek molekül ağırlıklı plazmitler ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *Pseudomonas* suşlarında Zn, Fe, Hg, Co, Ni gibi metaller ile antibiyotiklere dirençliliğin de plazmitler ile ilişkili olduğunu saptamışlardır [77].

#### **1.1.10. Ağır Metal Dirençli Bakterilerin Tanımlanmasında Moleküler Yaklaşımlar**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda metal ile kontamine olmuş ortamlarda hayatta kalabilen arkeal ve bakteriyel populasyonların analizi için moleküler teknikler uygulanmaktadır. Yıllarca ağır metal içeren çamur ve kanalizasyon sularının giderilmeye çalışıldığı topraklardaki bakteri toplulukları sekanslama, klonlama ve FISH dahil rRNA uygulamaları kullanılarak analiz edilmektedir [7]. Farklı habitatlardan izole edilen ağır metallere karşı dirençli olan bakterilerle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak, Kızılırmak'ta ağır metal dirençli bakteri populasyonu ya da ağır metal dirençliliği hakkında mevcut bilgi bulunmamaktadır. Geleneksel mikrobiyolojik metodlar, tam olarak mikrobiyal çeşitliliği çalışmak için uygun değildir. Bakterilerin identifikasyonu ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması birçok avantaj sağlar. Tekrarlanabilir ve duyarlığının yanısıra hızlı sonuç verir. Diğer taraftan, moleküler teknikler araştırıcının mikroorganizmaları kültüre almadan mikrobiyal komünitenin işlev ve yapısını daha doğru bir şekilde incelemesine imkan verir [78].

Farklı çevrelerde mikrobiyal çeşitliliğin identifikasyonunda kullanılan moleküler tekniklerin hızlı ve etkili olduğu görülmektedir. Genetik eşitlilik, organizmaların

biyolojik çeşitliliğinde kesin bilgi sağlayan DNA veya RNA'larının bazı benzersiz kısımları ile organizmalar tanımlanabilmektedir [79]. Diğer taraftan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve 16S rRNA analizi gibi nükleik asit teknolojisindeki son gelişmeler, bakterilerin genotip analizleri için yeni metodların kullanılmasına yol açmıştır. 16S rRNA karşılaştırmalı analizleri, son derece korunmuş dizilerin değişken dizi bölgeleri ile iç içe olduğunu göstermektedir. Değişken bölgelerin analizleri, değişken filogenetik ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesine izin vermektedir [80]. Mikroorganizmaların tanımlanmasında korunmuş ya da değişken olan bölgeler PZR ile DNA amplifikasyonuna yönelik primer için hedef olarak kullanılabilir. Geleneksel mikrobiyolojik metodlar, tam olarak mikrobiyal çeşitliliği çalışmak için uygun değildir. Bakterilerin identifikasyonu ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması birçok avantaj sağlar [78].

Klasik testlere ve API sistemine ilave olarak çeşitli moleküler yöntemler türler arasındaki farklılığı belirlemek için geliştirilmiştir. Kromozomal DNA baz bileşimi (%mol G+C) ve DNA-DNA sıvı hibridizasyon yöntemleri tanımlama için kullanılmaktadır. Özel DNA problemleri ve PZR, plazmit ve toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi, 16S rRNA dizi analizi, Southern blotlama gibi moleküler yöntemler tanımlamanın kesin ve hızlı bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır [81].

#### **1.1.10.1. 16S rRNA Sekans Analizi**

Bakterilerin tanımlanması için 1980 yılından itibaren yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Woese ve arkadaşları bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için genetik kodun değişmeyen bölgelerini kıyaslamışlardır. Bakterilerdeki bu gen bölgeleri 16S rRNA geni (ribozomun küçük alt birimine özgü RNA) ve 23S ve 5S rRNA (büyük alt birimler) genleri ve bu genler arasında yer alan bölgelerdir [81, 82]. 5S rRNA molekülünün 16S rRNA'ya göre (120 baz çifti) oldukça küçük olması ve sınırlı bilgi taşıma kapasitesinden dolayı tercih edilmemektedir. 23S rRNA molekülü, 16S rRNA molekülüne göre daha fazla filogenetik açıdan bilgi içermesine karşın (3300 baz çifti), 23S rRNA'ya yönelik çalışmalara literatürde daha az rastlanılmaktadır. Bakterilerin sınıflandırılmasında



yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır ve hem değişebilen hem de korunmuş bölgelerden oluşur [83]. 16S rRNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir moleküler araçtır [82, 83]. Bu dizilerin BLAST programında karşılaştırılarak homolojileri belirlenmektedir [84]. Ayrıca 16S rRNA dizileri kültürü yapılamayan prokaryot tür çeşitliliğinin ortaya konulması ve kültür bağımlı olmayan mikrobiyal komünitelerin belirlenmesi için rRNA hedefli problemlerin dizaynında son derece avantajlıdır. Bu amaçla binlerce organizmanın rRNA dizileri belirlenmiştir ve bu bilgiler RDP-II ve BLAST gibi özel veri tabanlarında saklanmaktadır [85].

#### **1.1.10.2. Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması**

Filogenetik analiz, mevcut olan karakterlerin değişik kriterlerin değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasıyla soy ağaçlarının oluşturulmasıdır [86]. 16S rRNA dizileri, organizmanın taksonomik grubunu belirlemede kullanılmaktadır. Bu sekanslara göre soy ağaçları oluşturularak bakteriyel türlerin evrimsel ilişkileri görsel olarak belirlemektedir. Bu analizle, organizmanın evrimsel olarak akraba olan diğer gruplar belirlenebilir ve türlerin ortak atadalarından ayrışma hızları tahmin edilebilir [87]. Ayrıca genler arası etkileşim, ilaç tasarımları, aşı çalışmalarında patojen suşların çeşitliliği, genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojisi, yeni genlerin görevlerinin tespiti mikrobiyal ekoloji çalışmalarında da kullanılmaktadır. Filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar, türleşme sırasını kaydeder, hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir. Filogenetik bir ağaçta, dallar; türlerin atasal populasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğüm, bir populasyonun (taksonun) iki veya daha fazla türev populasyona ayrıldığı noktalara denir [86, 88]. Ağaçlardaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin (basamakların) sayısını belirler [89].

Günümüzde filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler iki ana başlık altında incelenir ve filogenetik analiz metotlarında kullanılan bu modeller bazı varsayımlara dayalıdır [86, 90].

Nükleotid dizisi kullanan metotlar (sequence-based)

- Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi (Maximum Parsimony)
- En Yüksek İhtimal Metodu (Maximum Likelihood)
- Bayes Metodu

Uzaklık kullanan metotlar (distance-based)

- Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages)
- Komşu Birleştirme (Neighbour Joining) Metodu

#### **1.1.10.2.1. Nükleotid Dizisi Kullanan Metotlar (Sequence-Based)**

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

Maksimum parsimoniye göre olması gereken en muhtemel ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [86, 91]. Yani en az farklı olan birimler, birbirine çok yakın ve en çok benzeyen birimlerdir. Bu nedenle; Parsimoni (MP), Minimum Evrimsel Metod (parsimoni, tutumluluk) olarak tanımlanabilir. Yaptığı işlemler nedeniyle zaman ve çok fazla hesaplama isteyen bir algoritmadır. Maksimum parsimoni metodu kullanmak için en çok tercih edilen ücretsiz yazılım PHYLIP'tir. Bu alanda oldukça kabul gören bir program da ücretli yazılım olan PAUP'tur [90].

##### **1.1.10.2.1.2. En Yüksek İhtimal Metodu (Maximum Likelihood)**

Dizi verilerinde gözlenen varyasyonu açıklayan en iyi ağacı bulmak için olasılık hesaplamalarını kullanır. Örnek sayısı ve/veya dizinin uzunluğuna göre zaman alabilir. Farklı soylarda (lineage) mutasyonları içeren ağaçları değerlendirebilir. Hesaplamalarda baz dizisi kompozisyonunda varyasyona izin veren evrimsel

modeller kullanılabilir. Mega yazılımı kullanılabilir, otomatik ve el ile nükleotid dizi hizalaması, filogenetik ağaçlardan sonuç çıkarmak, web tabanlı veri bankalarında araştırma yapmak, moleküler evrim ve evrimsel hipotezleri test etmek için kullanılan ücretsiz bir programdır [86, 90].

#### **1.1.10.2.1.3. Bayes Metodu**

Amaç tek bir “doğru” filogeniyi bulmayı değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki (posterior) olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. Bunun için bazı evrimsel parametrelerin olasılıklarını ve önceki olasılık dağılımlarını kullanır. Oldukça fazla sayıda muhtemel ağacın analizi için Monte Carlo algoritmasına dayanan metotlar kullanılır. Bu metod için MRBAYES yazılımı kullanılabilir [86, 90].

#### **1.1.10.2.2. Uzaklık (Distance) Metotları**

Bir grup içindeki her bir ikili karşılaştırma ile elde edilen fark sayısını kullanarak ilgili grubun ağacını hesaplar. En az fark içeren ikililer “komşu” (neighbours) olarak isimlendirilir. Amaç komşuları doğru yerleştirip ve eldeki veriyi yansıtan dal uzunluklarına sahip ağaç elde etmektir. MEGA yazılımı kullanılabilir [86, 90].

##### **1.1.10.2.2.1. UPGMA Metodu**

Ağacın dallar boyunca değişiklik hızının sabit olduğunu varsayar. Bu nedenle hesaplamaları yaparken ağacın kökünü (root-ortak ata) de hesaplar [90].

##### **1.1.10.2.2.2. Neighbour-Joining Metodu**

Ağacın dalları boyunca değişiklik hızının farklı olabileceğini kabul eder. Bu nedenle ağacın kökünü hesaplamaz. Bu metod 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 farklılıktır. Çok verimlidir. Bu yöntemde bir tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez. MEGA yazılımı kullanılabilir [86, 90].

De Jaysankar ve arkadaşları (2008) toksik olan civa, kurşun ve kadmiyum metallere karşı direnç gösteren mikroorganizmaları çalışmışlardır. Birkaç deniz bakterisinin 25 ppm (mg/L) Hg konsantrasyonunda yaşayarak yüksek oranda dirençlilik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma boyunca yüksek civa konsantrasyonları denenmiş ve bakterilerin Pb ve Cd detoksifiye edebilme yetenekleri de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, mikroorganizmaların sadece Hg değil, Cd ve Pb'yi detoksifiye edebilme potansiyellerinin de olduğunu göstermiştir. Biyokimyasal ve 16S rRNA gen sekans analizleri ile izole edilen bakteriler *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Brevibacterium iodinium* olarak identifiye edilmiştir [4]. Sharma ve Fulekar tarafından yapılan bir çalışmada ise ağır metaller ile kontamine olan bölgelerin biyodegradasyonu için ağır metal biyoakümüasyonu yapma yeteneğine sahip mikroorganizmaların identifikasyonu ve mikrobiyal karakterizasyonları çalışılmıştır. Metal kontaminasyonu maruz kalmış bu bölgede yaşayan ve üreyen mikrobiyal topluluk tanımlanmıştır. Mikrobiyal topluluğun sekans analizi yapılmış ve BLAST, ClustalW ve PHYLIP gibi Bioinformatiks araçlar kullanılarak sekanslar karşılaştırılmıştır. En yüksek Fe konsantrasyonunda 500 mg/L'de sadece bir mikroorganizmanın yaşadığı ve üredığı belirlenmiştir. 16S rRNA sekans ve filogenetik ağaç ile karakterize edilen mikroorganizma *Klebsiella pneumoniae* olup bu mikroorganizmanın ağır metal ile kontamine olan bölgelerin remediasyonunda kullanılabildiğı belirtilmiştir [57].

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

Bütün hücre yağ asidinin Gaz Kromatografi (GC) analizi ile bakteri sınıflandırılmasında kullanılabilirliğini ilk defa Abel ve arkadaşları 1963'te kanıtlamışlardır. Araştırmacılar, bakteri sınıflandırılmasında lipid analizinin hızlı ve basit bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. 1991'de Welch, hücre yağ asidlerinin tür düzeyinde ayrımının, GC FAME profilinin mikrobiyal identifikasyonda önemli bir gücü olduğu sonucuna dayanarak yağ asidi analizinin uygulama alanlarını içeren bir derleme yayınlamıştır [92, 93]. 1991'de Microbial ID inc. Şirketi (MIDI, Newark, Delaware, ABD) geliştirilerek hizmete sunulan bilgisayar kontrollü bir gaz kromatografi sistemi yardımı ile kültüre alınabilen her türlü mikroorganizmanın tanısında kullanılabilen Mikrobiyal Tanı Sistemi (MIS) piyasaya sunmuştur [92]. Sherlock Microbial Identification System günümüzde bakteriyel FAME profilinde referans sistem olarak kabul görmektedir. Bakteriyel FAME analizinin popüler olmasıyla sonraki yıllarda çok sayıda ve çeşitli bakteri grubu incelenmiş ve yağ asidi profillerinin numerik analizi yapılmıştır. Araştırmacılar cins seviyesinde tanımlama üzerine yoğunlaşmışsa da FAME verileri göstermiştir ki tür seviyesinde de bilgi verebilmektedir. FAME profili taksonomi dışında bakteriyel komünite tayini, mikrobiyal kaynak takibi ve bakteriyel spor tayini amacıyla kullanılmaktadır [92, 93].

#### **1.1.10.3.1. Yağ Asitlerinin Yapısı**

Yağ asidi profili, karbon uzunluğu 9 ile 20 atom arasında değişen bileşikler üzerine yoğunlaşmış olup hücre membranında ki yağ asitlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan glikolipidleri fosfolipidleri ve lipopolisakkaritleri (LPS) içermektedir. Mikrobiyal hücrelerde yağ asitlerinin birincil kaynağı hücre membranıdır. LPS katmanları gram negatiflerde ilave bir kaynak oluşturmaktadır. Bakterilerde yağ asidinin sentezi yüksek ölçüde korunmuş enzimlerden oluşan tip iki yağ asidi sentetaz sistemi tarafından gerçekleştirilir. Ana bileşenler, yağ asitlerini esterleyen molekül koenzim A ve açıl taşıyıcı proteindir. Birçok bakteri 10 ile 19 karbonlu yağ asidi sentezler ve bunlardan birçoğu da 16 ile 18 karbon uzunluğundadır. Genellikle hücre yağ asidi

profili 5 ile 15 çeşit yağ asidi içerir. Bazı gram pozitif bakterilerde dallı-zincirli yağ asitleri hakimken, gram negatif bakterileri kısa hidroksi asit zincirlerinden oluşan lipopolisakkaritler karakterize etmektedir [92, 94]. Plazmit ve mutasgenesis çalışmalarına dayanarak yağ asidi kompozisyonunun genetik olarak yüksek düzeyde korunduğunu söyleyebiliriz. Bakterilerde 300'den fazla yağ asidi ve buna bağlı bileşikler bulunmuştur. Teorik olarak 2300 farklı kombinasyonun yarattığı çeşitlilik FAME analizini kullanışsız kılarken bakteri gruplarında rastgele olmayan dağılım, yüksek miktarda oluşu bakteriyel taksonlar da tanımlamayı güçlü kılmaktadır [92]. Welch (1991) yaptığı çalışmada FAME analizinin cins ayırımına olanak sağladığını ve karakteristik FAME profillerinin tür düzeyinde bulunabileceğini belirtmiştir. Cins düzeyindeki FAME profillerinin kalitatif farklılık (peak varlığı), tür düzeyindeki FAME profillerinin ise kantitatif farklılık (peak oranı) göstermesi bu durumun altını çizmektedir [95]. Başlangıçta yağ asitleri doğal kaynaklarına göre adlandırılrsa da (örneğin sarkinik asidin kaynağı *Sarcina* türleridir) şimdilerde adlandırmada terminoloji kullanılmaktadır. Yağ asidi isimlendirilirken yapısındaki karbon atomu sayısı, fonksiyonel gruplar ve çift bağların yeri temel alınır. Sistemik adlandırma basitçe şöyledir; karbon sayısının soluna "C" sağına da çift bağ sayısı yazılır. "ω" sembolü karbon zincirinde çift bağın bulunduğu yeri gösterirken "c" ve "t" harfleri cis veya trans konfigürasyonunu temsil etmektedir. Zincirin karboksil ucu (COOH) α sonu olarak adlandırılır. Zincirin dallandığı yer, sikopropan yapısı ve hidroksi yağ asitleri numaralandırılırken zincirin karboksil ucundan başlanmaktadır. Alternatif olarak α ucundan da başlanabilir. İso ve ante iso dallı yağ asitleri 2 ve 3 karbon atomlarında (ω ucuna göre) metil dallanması olan yağ asitleridir. Bu yağ asitleri adlandırılırken isimlerinin önlerine iso veya anteiso önekleri alırlar [92, 95].

#### **1.1.10.3.2. Kültür ve Büyüme Koşulları**

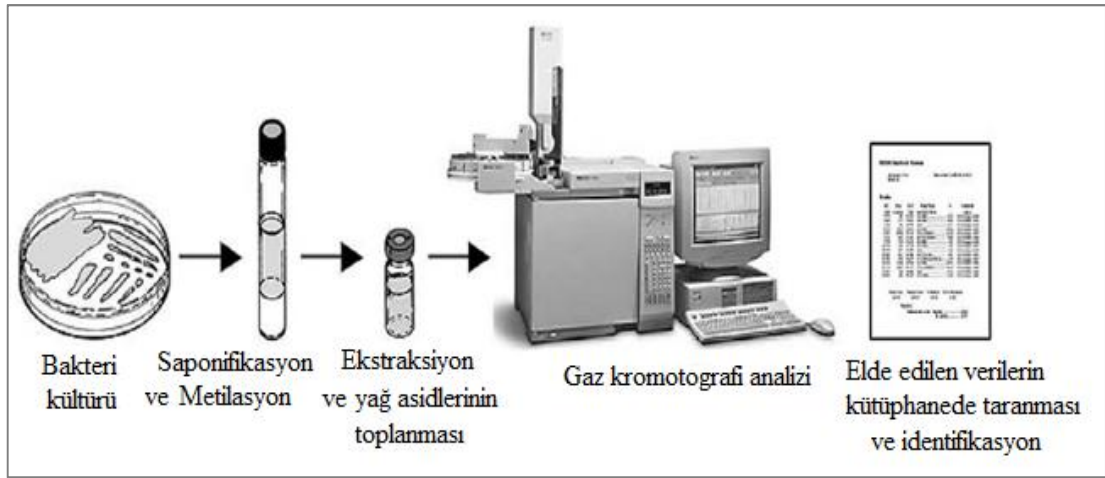
Farklı makalelerde farklı koşulların FAME profilini etkilediği belirtilmiştir. Kültür ve büyüme koşullarının önemi Abel ve arkadaşları tarafından vurgulanmıştır. Kaneda, yağ asitlerinin fizyolojik ve çevresel koşullara bağlı olarak nispi oranlarda değişiklik gösterebildiğini belirtmiştir. Ayrıca büyüme fazının safhasına göre de değişebileceğini göstermiştir. Değişik sıcaklıkların ve besiyerlerinin bakteriyel yağ

asidi kompozisyonu üzerine etkisini bir kaç araştırmacı çalışmıştır [92, 96]. Farklı sıcaklıklar yağ asidi oranını değiştirmektedir. Genel olarak yağ asidi profili, triptik soy agar (TSA) besiyerine, inkübasyon zamanına, inkübasyon atmosferine, sıcaklığa ve kromatografik ekipmana göre kantitatif değişiklik (peak alanı) gösterebilir. Dahası ve önemlisi bu faktörler yağ asidi profilinde kalitatif etkiler (peak varlığı) de yaratabilir. Farklı suşların yağ asidi profilleri incelenirken göz önüne alınmalıdır ki besiyeri ve büyüme koşulları aynı olmalıdır. Bu makalelerden yola çıkarak FAME temelli tanımla için kültür ve büyüme koşullarına bir standart getirilmelidir. Bu çalışmada Sherlock MIS protokolünü takip edilmiştir [92, 93]. Bu metot bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır (Şekil 1.9.) [97]. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini üretir ve bunlar GC ile analiz edilir. 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. GC’de kullanılan sabit faz katı ise gaz kromatografisi, sabit faz sıvı ise gaz-sıvı kromatografisi söz konusudur. GC’de 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 [98].

Gaz kromatografik işlem basamaklarını şöyle sıralayabiliriz:

- Ekstraksiyon: Sıvı veya katı örnek analiz edilecek bileşikleri çözebilen bir çözücü ile ekstrakte edilir. Bu işlem bir blenderda veya bir ayırma hunisinde gerçekleştirilir.
- 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.

- Konsantrasyon: Temizlenmiş ekstrakttaki çözücünün buharlaştırılarak örneğin konsantre edilmesi gerekir. Bunun için vakumlu döner buharlaştırıcıdan yararlanır.
- 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 [99].



**Şekil 1.9.** Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sistemi ve FAME Analizi [97]

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 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 [100]. MIDI şirketi, Sherlock MIS kütüphanelerinin mikroorganizmaların en genel koşulları seçilerek yapılandırıldığı



üzerine dursada, bakteriyel suşlar spesifik koşullar ve kültür gerektirir. Bu da bakteriyel tanımlamanın kapsamını sınırlandırmaktadır.

#### **1.1.10.4. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH)**

*In situ* hibridizasyon (ISH), bağımsız iki grup tarafından geliştirilmiştir. *Xenopus* oositleri, sitolojik olarak hazırlanan radyoaktif işaretli DNA ve 28S RNA ile hibritlenmiş ve mikrootoradyografi ile tespit edilmiştir. En sonunda ISH, Giovannoni ve arkadaşları tarafından radyoaktif işaretli rRNA oligonükleotid probları kullanılarak mikrobiyolojiye sunulmuştur. Floresan işaretlerin geliştirilmesiyle radyoaktif işaretlerin yerini non-izotopik boyalar almıştır [91]. ISH, nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan özgün bir yöntemdir. FISH yönteminin hibridizasyon yöntemlerinden (Southern veya Northern blot) farkı, nükleik asitlerin kendi hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur [92]. Bu teknik nükleik asit sekansını, hücre morfolojisini değiştirmeden veya bileşik bütünlüğünü bozmadan incelemeyi mümkün kılmıştır [91]. 1989 yılında ilk kez De Long ilk defa tek mikrobiyal hücrelerin tespitinde floresan işaretli oligonükleotidleri kullanmıştır. O zamandan bu yana ISH, kromozomal evrim, tümörlerin kromozom analizi, lösemi ve sitogenik çalışmalar için modifiye edilmiştir. Radyoaktif problarla karşılaştırıldığında floresan problar güvenilirler, daha iyi çözüm sunar ve tespit için ilave basamak gerektirmezler. Dahası floresan problar farklı dalga boylarında emisyonu sahip boyalar ile boyanabilir olduğundan tek hibridizasyonda farklı hedef sekansların incelenebilmesini sağlamaktadır [91].

Son yıllarda nükleik asitleri işaretlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Biotin, dioksijenin, dinitrofenil veya florokromlarla enzimatik olarak işaretleme genellikle tercih edilmektedir. Rekombinant DNA preparasyonları ile saf prob elde edilebilmektedir. Prob seçimine bağlı olarak, belirli genom ve kromozomlar, tekrarlayan DNA dizileri, tek kopyalı diziler, mRNA ve viral diziler gibi farklı hedefler saptanabilmektedir [101]. FISH yönteminde, hedef nükleik asit

moleküllerinin saptanması için işaretli proba bağlanan florokrom konjuge antikorlar ya da proba kovalent bağlı farklı renkte emisyon veren florokrom molekülleri kullanılır. Bu teknik, özellikle kromozomal anomalilerin tanımlanması için ve gen haritalaması için uygundur. FISH, inceleme ve boyama için araştırmacının istediği DNA dizilerine komplementer olan prob olarak adlandırılan tek iplikli DNA'nın kısa dizilerinin hazırlanmasını kapsar. Bu problemler hibridize olur ya da komplementer DNA'ya bağlanır ve floresan işaretlendiğinden DNA'nın bu dizilerinin yerinin görülmesini sağlamaktadırlar. Prob sinyali bir floresan mikroskopunda incelenir ve klinik örnekteki DNA sinyalinin varlığı ya da yokluğu ile değerlendirilir [102].

Son on yılda FISH'in sağladığı hız ve hassasiyet filogenetik, ekolojik, çevresel çalışmalarda ve teşhiste FISH'i güçlü bir araç haline getirmiştir [91]. Bakterilerin çevresel dağılımını incelemek için moleküler yöntemlerin kullanılması, mikrobiyal komünitelerin yapısı hakkında doğrudan bilgi sağlamaktadır. Bütün hücrelerin 16S rRNA hedefli oligonükleotid problemler ile FISH, çevresel uygulamalarda mikroorganizmaların filogenetik, morfolojik identifikasyonu ve sayısal olarak değerlendirilmesi bakımından güçlü bir tekniktir [103]. Geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle doğal ekosistemler ve mikrobiyal yaşamdan birçok mikroorganizma izole edilip çalışılmamıştır. Moleküler uygulamalar arasında olan rRNA hedefli oligonükleotid problemler ile FISH, mikroorganizmaları kültüre almadan karakterize edilmelerini sağlayan güçlü ve yaygın kullanılan tekniklerdir [104]. FISH spesifik olarak mikroorganizmaları belirleyebilir, tür ve cins düzeyinde filogenetik olarak tanımlayabilir ve sayılarını tespit edebilir. Ayrıca, FISH mikrobiyal komünitelerin buldukları alanda analiz edilmelerini sağlar ve kültüre alınmayan mikroorganizmaların fizyolojisini çalışmak için diğer tekniklerle birlikte kullanılmaktadır. FISH çalışmalarının başarısı mikrobiyal toplulukların yapılarının belirlenmesinde genellikle tespit edilebilen mikrobiyal hücrelerin küçük bir parçası olarak ölçülmektedir [105].

FISH tekniği mikroorganizmaları doğal ortamlarında incelemek için ilgili organizmanın rRNA'sı ile dizayn edilen oligonükleotid problemlerin spesifik bağlanması esasına dayanan bir tekniktir. Oligonükleotid problemlerin dizayn edilmesi için hedef hücrenin rRNA sekansının bir kısmına ait bilgiye ihtiyaç vardır. En yaygın hedef

sekanslar bakteriyel ribozomun 16S alt birimindeki sekanslardır ancak ribozomun diğer alt birim sekansları da kullanılmaktadır [106]. Genellikle 18 ile 30 nükleotid bazdan oluşan, proplar hücrelere girerek spesifik olarak ribozomlardaki komplementer hedef sekanslar ile hibridize olmaktadır. Ribozomda hedef sekanslar olmadığında proplar hibridize olamayıp, yıkama aşamasında bağlanamayan proplar uzaklaştırılmaktadır. Propların 5' ucu florosein ya da sulfoindosiyenin (Cy3, Cy5) gibi fluorokrom boyalar ile işaretlenmekte ve işaretlenen oligonükleotid proplar hücresel rRNA'ya bağlanarak hedef hücreler epifloresan mikroskobu, konfokal lazer taramalı mikroskobu veya akış sitometrisi ile tespit edilip sayılabilmektedir [106, 107]. Seçilen mikrobiyal hedeflere, farklı fluorokromlar ile işaretlenen proplar bağlanarak aynı anda birçok hedef organizma görüntülenebilmektedir. FISH için kullanılan uygun proplar taksonomik düzeyde geliştirilmiştir. EUB338 probları (I, II, and III) bakterileri hedefler, Arkeler ARCH915 ve Eukaryotlar EUK516 probu ile hibridize olmaktadır. Alt taksonomik düzeylerde çalışmak için literatürde yer alan çalışmalarda tanımlanan daha spesifik proplar kullanılmaktadır ya da Ribozomal Veritabanı Projesi II (the Ribosomal Database Project II) gibi büyük kamu erişim veritabanlarında yayınlanmış rRNA verileri kullanılarak prob dizayn edilebilmektedir. 16S rRNA hedefli oligonükleotid propların dizayn edilmesi, değerlendirilmesi ve çevresel örneklerde kullanımı için detaylı protokoller bulunmaktadır [107]. Alternatif olarak çeşitli taksonomik düzeylerde FISH proplarının seçiminde literatürden yararlanarak bir kamu erişim veritabanı kataloğu probbase hazırlanmıştır [108]. Sürekli olarak yeni 16S rRNA dizileri ve oligonükleotid proplar identifiye edilerek ve kamu erişim veritabanlarına eklenmektedir. Ancak bu konsensus dizilerinin düzenli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir [107].

#### **1.1.10.4.1. Proplar ve İşaretleme**

FISH için prob seçerken, özgüllük, hassasiyet ve dokuya kolay nüfuz edebilmesi göz önüne alınmalıdır. Tipik bir oligonükleotid prob 15-30 bp uzunluğundadır. Kısa proplar hedeflerine daha kolay erişirler fakat birkaç tane işaret taşıyabilirler. Farklı işaretleme yolları mevcuttur. Direkt floresan işaretleme en çok kullanılan metod olup

hızlı, ucuz ve kolaydır. Çünkü hibridizasyondan sonra tespit için başka adım gerektirmez. Tek veya daha fazla floresan boya molekülleri, oligonükleotidlere doğrudan, kimyasal yollarla sentez sırasında probun 5' ucuna aminolinker ile veya enzimatik yollarla terminal transferaz kullanılarak 3' ucuna bağlanabilmektedir. 18-karbon spacer aracılığı ile oligonükleotidin floresein-izotiyosiyanat (FITC) ile bağlanması direkt konjuge problara göre sinyal yoğunluğunu arttırabilir. Ayrıca floresan sinyalin kaybolmasını engellemek için uygun spacer ile 3' ucuna bir, 5' ucuna dört floresan molekülü ekleyerek iki ucunda işaretlenmesinin floresan sinyalini arttırdığı belirlenmiştir. Floresan işaretli oligonükleotidler artık ticari olarak temin edilebilmekte ve aylarca -20°C'de karanlıkta saklanabilmektedirler [91, 108].

#### **1.1.10.4.2. Floresan Boyalar**

Farklı uyarma ve emisyonuna sahip florokromlar eş zamanlı olarak bir veya daha fazla mikroorganizmanın tespitine olanak sağlar. Birleşik florokromlar, probalar arasında spektral örtüşmeyi engelleyebilmek için keskin emisyon pikleri vermelidir. En parlak fotostabil boya, düşük yoğunluktaki hedefler için kullanılmalıdır. Mikrobiyolojide FISH için sıkça kullanılan boyalar; floresein türevleri ((Fluorescein-Isotiocyanate (FITC), 5-(-6-) carboxyfluorescein-*N*-hydroxysuccimide (FluoX)), rodamin türevleri (Tetramethyl-Rhodamine-Isotiocyanate (TRITC), Texas Red) ve son zamanlarda Cy3, Cy5 gibi siyanin boyalarıdır. Bu boyalarla sonuçların klasik boyalara kıyasla daha üstün olduğu gösterilmiştir. Çünkü büyük ölçüde parlak boyanma sağlarlar ve daha stabildirler. 4',6-diamidino-2, fenilidol dihidroklorid (DAPI) gibi DNA'ya büyük benzeşmeyle bağlanan aromatik didiamidinler ile mavi floresan boyama (counterstaining) yapılabilir [109].

#### **1.1.10.4.3. Hedef Molekül rRNA**

FISH için mikrobiyolojide sıkça kullanılan hedef molekül; genetik stabilitesi, korunmuş bölgeleri, değişken bölgeleri ve çok sayıda kopyasıyla birlikte 16S rRNA'dır. Bakteriler ve arkealar arasındaki her bir taksonomik seviye için

oligonükleotid problemler, rRNA bölgesine göre tasarlanmıştır. Ticari veya kamuya açık veri tabanlarına 16S rRNA sekans verilerinin girişi özellikle kültüre edilemeyen organizmalarla ve karışık bakteriyal populasyonlarla çalışırken büyük kolaylık sağlamaktadır. FISH için, 16S rRNA'nın metabolik olarak aktif olan hücrelerde ve her replikasyonda fazla sayıda kopyasının olması bakteriyal hücrelerin tek işaretli oligonükleotidlerle görüntülenmesi için yeterli olmaktadır. Hedef bölgenin seçilimi ve problemlerin dizaynı büyük bir titizlikle yapılmalıdır. Rasyonel prob geliştirmek için ARB gibi uygun yazılımlar mevcuttur. 16S rRNA sekans analizinin pratikliği ve sınırları ve rRNA prob dizaynı daha önce incelenmiştir. 23S rRNA ve 18S rRNA gibi diğer hedefler ve son zamanlarda mRNA da başarıyla FISH'de kullanılmaktadır [91, 110].

#### **1.1.10.4.4. Fiksasyon**

Bakterilerin hibridizasyonu için öncelikle bakteriler fikse edilmelidir. Böylelikle floresan boya ile işaretli problemlerin hücre içine nüfuz etmesi için hücre membranı geçirgen hale gelmelidir ve RNA'lar endojen RNAaz'lardan korunmalıdır. Fiksasyonda etanol ve metanol gibi tetikleyici ajanlar, aldehidler gibi çapraz bağlı ajanlar veya bu ikisinin karışımı kullanılabilir. Fiksasyon şartları hedef organizmaya veya dokuya göre değişiklik göstermektedir. Etkin bir fiksasyon, iyi bir FISH sonucu için çok önemlidir fakat optimizasyonu zordur. Uygun fiksasyon, problemin hücreye girmesi, hedef RNA'nın maksimum düzeyde tutulması, hücre bütünlüğü ve morfolojisinin korunumuyla sonuçlanmalıdır. Genelde %3-4 (v/v) formaldehit veya paraformaldehit solüsyonları birçok gram negatif bakteri için yeterlidir. Gram pozitif bakteriler için; etanol (%50), etanol/formalin (9:1 v/v) veya ısı uygulama önerilir ve geçirgenlik için ilave ön uygulama gerekebilir [111].

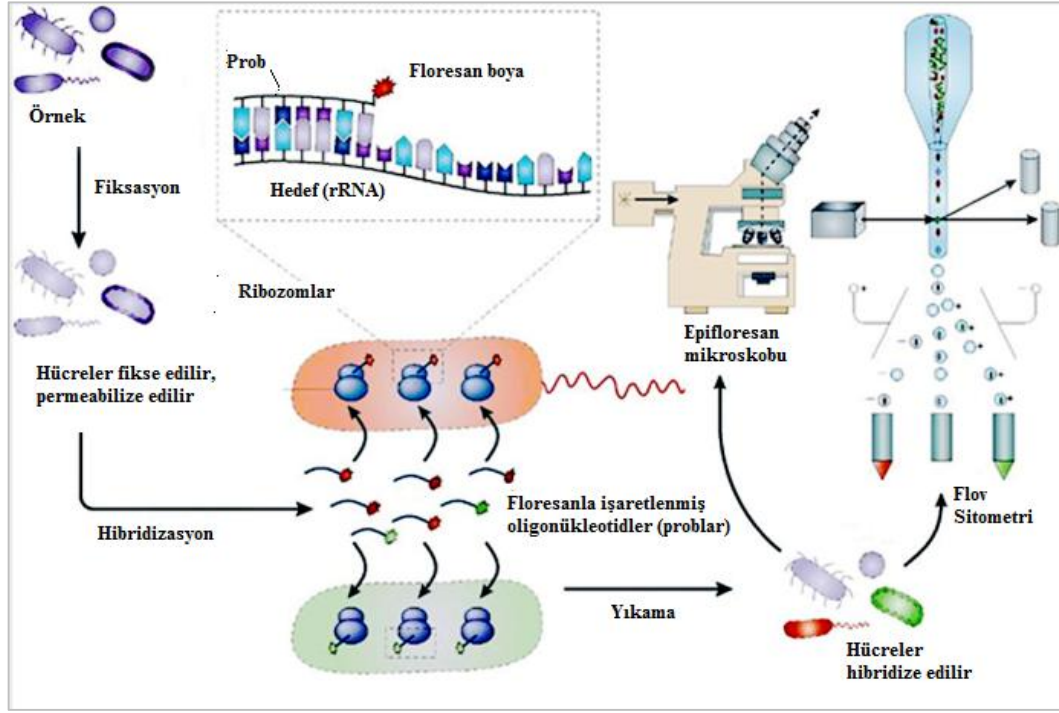
#### **1.1.10.4.5. Örnek Hazırlanması ve Ön İşlemleri**

Örneklerin lamlara iyi tutunması için öncelikle bir kaplama maddesi ile birinci yüzeylerin muamele edilmesi tavsiye edilir. Jelatin ve poli-L-lizin içeren kimyasallar

başarıyla kullanılmaktadır. Bazı durumlarda örneğin gram pozitif hücrelerde peptidoglikan tabakayı açmak için lizozim ile enzimatik muamele gerekli olabilir. *Mycobacterium* kompleksi, *Nocardia* veya *Microthrix parvicella* gibi *Actinomycetales*'lerin mikolik asit içerikleri için, 1M HCl ile hafif asit hidrolizi gibi permeabilizasyon teknikleri veya mutanolizin veya 1,4 ditiyo-L-threitol ile muamele edilmesi değerlendirilmiştir. Zengin G+C içerikli örneklerin uygun fiksasyonu ve önişlemleri suşa göre değiştiği için kompleks çevresel örneklerin analizi hala zordur [91].

#### **1.1.10.4.6. Hibridizasyon**

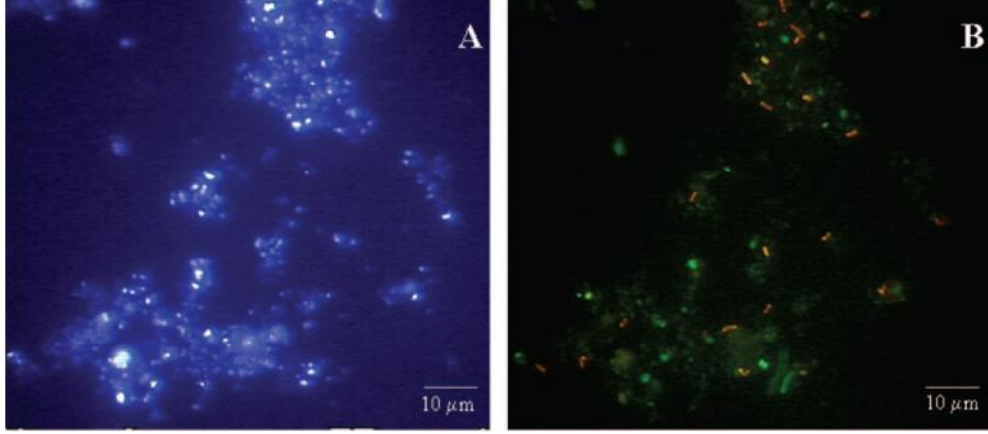
Probun hedef sekansa doğru bir şekilde bağlanabilmesi için hibridizasyon sıkı şartlar altında yapılmalıdır. FISH prosedürünün bu çok önemli basamağı için; hedef RNA'nın komplementeri olan floresan işaretli prob içeren örnek, öncesinde ısıtılmış hibridizasyon tamponu ile muamele edilir. Hibridizasyon ve bir sonraki yıkama aşamasında yıkama solüsyonunda optimizasyonu sağlamak için farklı sıcaklık, farklı NaCl ve formamid konsantrasyonları çalışılmaktadır. Bu koşullar probtan proba değişmekte olup optimum koşullar probun hedef bölgeye bağlanmasını ve spesifik olmayan bağlanmaları minimuma indirmeyi sağlamaktadır [91, 106]. Formamid, hidrojen bağlarını zayıflatarak erime sıcaklığını düşürür, bu da düşük sıcaklıklarda çalışmayı mümkün kılmaktadır. Hibridizasyon genellikle 37-50°C sıcaklıklarda karanlık ve nemli bir ortamda olmaktadır. Hibridizasyon süresi 30 dakika ile birkaç saat arasında değişebilmektedir. Sonrasında bağlanamayan problemlerin giderilmesi için lamlar distile suyla yavaşça yıkanır, kurutulur ve görüntülenir (Şekil 1.10.) [112].



Şekil 1.10. FISH metodu [112]

Gillan ve arkadaşları (2004) Norveç'in güneyinde yüksek seviyede Zn, Cu, Cd ve Pb kontaminasyonuna maruz kalmış marin sedimentinin mikrobiyal komünitesini 16S rRNA sekanslama ve FISH tekniği ile karakterize etmişlerdir. Bu çalışmada öbakteriler (eubacteria) için EUB338, arkebakteriler (archaeobacteria) için ARC915, Proteobakteriler için GAM42a, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* için CF319a, Actinobakteriler HGC69a, *Planctomyces* için PLA886 ve *Desulfosarcina-Desulfococcus* grubu için DSS658 ve negatif kontrol olarak NON338 oligonükleotid problemleri kullanılmıştır [113].

Şekil 1.11'de görüldüğü gibi, Simbahan ve arkadaşları (2005) ağır metal ile kontamine olmuş su örneklerinde Hg dirençli arkea ve bakteri popülasyonlarını, FISH metoduyla analiz etmişlerdir [114].



**Şekil 1.11.** Hg dirençli arkea ve bakteri popülasyonlarının FISH metoduyla analizi; A) DAPI ile boyanmış total hücre popülasyonu, B) arkeal prob ARCH915-fluorescein ile işaretlenmiş olan arkeal hücreler (yeşil renkli) ve bakteriyel EUB388-Cy3 ile işaretli bakteri hücreleri (kırmızı renkli) [114]

Nicomrat ve arkadaşları (2006) tarafından, maden drenaj sularının karıştığı sediment örneklerinde bulunan mikrobiyal popülasyonlar 16S rRNA ile karakterize edilmiş ve FISH tekniği ile sayıları belirlenmiştir. Fe ve S oksitleyen *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferrooxidans* ve *Acidiphilium* spp. gibi asidofilik bakteriler ve *Ferroplasma acidarmanus* ve *Sulfolobus* spp. gibi asidofilik arkeaların FISH analizi için 16S rDNA oligonukleotid proplar dizayn edilmiştir. Alınan yüzey sediment örneğinde total mikrobiyal komünitenin %0,01'inde arkeler tespit edilmiştir. Bakteriyel popülasyonun %37'sini *Acidithiobacillus ferrooxidans* oluşturduğu belirtilmiştir. *Acidiphilium* cinsine ait heterotroflar, bakteriyel popülasyonda %20 oranında bulunmuştur. *Leptospirillum ferrooxidans*'ın miktarı ise belirlenme düzeyinin altında olduğundan tespit edilememiştir [115].



### 1.1.11. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Cd, Hg ve Sb ağır metallerini tolere eden suşların izole edilmesi, tanımlanması ve moleküler karakterizasyonlarının yapılmasıdır. Bu amaçla Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Cd, Hg ve Sb metallerini tolere eden suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için maksimum tolere edilebilen konsantrasyon (MTK) değerleri belirlenmiş ve en yüksek MTK değerine sahip olan suşlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen Cd, Hg ve Sb dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların direnç mekanizmalarını belirlemek amacıyla total protein, dış membran proteini ve plazmit profilleri çıkartılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyon çalışmaları yapılarak antibiyotik-metal dirençliliğinin plazmit veya kromozomal DNA ile bağlantısı kurulmaya çalışılmıştır. Cd, Hg ve Sb dirençli her bir suşun, 16S rRNA sekans analizleri yapılarak bakteriler tanımlanmış ve soy ağaçları oluşturulmuştur. FISH yöntemi kullanılarak suşların 2010-2012 yılları arasında mevsimsel populasyon yayılımları belirlenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Çalışmanın deneysel sürecinde aşağıda verilmiş olan materyaller kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.2.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanışı

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

##### 2.1.2.2. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanışı

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

##### 2.1.2.3. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyerinin Hazırlanışı

İzole edilen bakterilerin yağ asidi analizinde kullanılmıştır. TSA besiyeri; triptone (15 g), soy pepton (5 g), sodyum klorid (5 g) ve agardan (15 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanımdan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

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

#### **2.1.3.1. Ağır Metal Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı**

##### **2.1.3.1.1. 0.5 M Kadmiyum Nitrat Çözeltisi ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )**

3.856 g  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür ve hazırlanan çözelti 0.2 µ'luk filtre ile steril edilmiştir.

##### **2.1.3.1.2. 0.5 M Civa Nitrat Çözeltisi ( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )**

4.283 g  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür ve hazırlanan çözelti 0.2 µ'luk filtre ile steril edilmiştir.

##### **2.1.3.1.3. 0.5 M Potasyum Antimon Tartarat Çözeltisi ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ )**

4.174 g  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  tartılarak 25 mL distile suda çözülmüştür ve hazırlanan çözelti 0.2 µ'luk filtre ile steril edilmiştir.

#### **2.1.3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

##### **2.1.3.2.1. Tris/EDTA Çözeltisi (250 mL)**

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

##### **2.1.3.2.2. % 10'luk SDS Çözeltisi (100 mL)**

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

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

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

#### **2.1.3.2.4. NaCl Çözeltisi (5 M, 100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.5. CTAB/NaCl Çözeltisi (100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Çözeltisi (100 mL)**

96 mL kloroform, 4 mL izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

#### **2.1.3.2.7. %70'lik Etanol (100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.8. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Çözeltisi (100 mL)**

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

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

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.3.2.10. Tris-HCl Çözeltisi (50 mM, 100 mL)**

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

#### **2.1.3.2.11. Tris-HCl Çözeltisi (1 M, 100 mL)**

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

#### **2.1.3.3. Yağ Asitleri Metil Esterler (FAME) Analizinde Kullanılan Çözeltiler**

##### **2.1.3.3.1. Çözelti 1 (Hücre parçalayıcı)**

150 mL metanol ve 150 mL distile çözelti şişesine ilave edilmiş ve daha sonra 45 g sodyum hidroksit eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır.

##### **2.1.3.3.2. Çözelti 2 (Metilleştirme)**

6N 325 mL HCl ve 275 mL metanol karıştırılarak hazırlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır.

##### **2.1.3.3.3. Çözelti 3 (Saflaştırma)**

200 mL hekzan (HPLC Grade) ve 200 mL metil tert- butil eter (MTBE, HPLC grade) karıştırılarak hazırlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### 2.1.3.3.4. Çözelti 4 (Bazik Yıkama)

10.8 g sodyum hidroksit (ACS grade) ve 900 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### 2.1.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler

İzolatların 16S rRNA gen dizisini PZR yöntemi ile çoğaltarak dizi analizini yapmak amacı ile kullanılan primerler ve özellikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	Tm (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyal, düz	48	Britschgi ve Giovannoni [116]
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43	Edgcomb ve ark., [117]

#### 2.1.3.5. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik disklerinin tamamı merck ve sigma marka olup isimleri ve içerdikleri antimikrobiyal madde miktarı Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Antibiyotik diskler ve kullanılan konsantrasyonları

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>
<b><u>β-laktamlar</u></b>	
Ampisilin, AMP	10
Amoksisilin-Klavulanik asit, AMC/CA	20/10
Imipenem, (IPM)	10
Oksasilin, OXA	1
Penisilin, PEN	10
Tikarsilin, TIC	75
Tikarsilin - Klavulanik asit, TIM	75/10
<b><u>Aminoglikozidler</u></b>	
Amikasin, AMK	30
Gentamisin, GEN	10
Netilmisin, NET	30
Tobramisin, TOB	10
<b><u>Kuinolonlar</u></b>	
Siprofloksasin, CIP	5
Pefloksasin, PEF	5
<b><u>Sephalosporinler</u></b>	
Aztreonam, ATM	30
Sefepim, FEP	5
Seftazidim, CAZ	30
Sulbaktam /Sefoperazon, CFP	75/30
<b><u>Sülfonamidler</u></b>	
Trimetoprim- Sülfametoksazol, SXT	25
<b><u>Polipeptidler</u></b>	
Basitrasin, BAC	10
<b><u>Poliketidler</u></b>	
Tetrasiklin, TET	30
<b><u>Makrolidler</u></b>	
Eritromisin, ERY	15
<b><u>Rifamisinler</u></b>	
Rifampin, RIF	5
<b><u>Glikopeptidler</u></b>	
Vankomisin, VAN	30
<b><u>Amfenikoller</u></b>	
Kloramfenikol (C)	30

### **2.1.3.6. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

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

0.990 g glukoz, 0.394 g Tris, 0.372 g EDTA tartılarak 100 mL distile suyla (pH 8) tamamlanmıştır.

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

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

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

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

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

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

### **2.1.3.7. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

#### **2.1.3.7.1. Potasyum Fosfat Tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1000 mL)**

6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8.7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak 1000'er mL distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 7.0'ye ayarlanmıştır.



### 2.1.3.7.2. Tris Çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 100 mL)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülerek pH 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

### 2.1.3.7.3. Deterjan Solüsyonu (11,1 mM Tris-HCl, Triton X-100, 100 mL)

1.75 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülmüştür. 1.67 mL Triton X-100 eklenerek HCl ile pH 7.6'ya ayarlanıp son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

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

SDS-PAGE için kullanılan bütün stok solüsyonlar ve çözeltiler +4°C'de saklanmıştır.

#### Çizelge 2.3. SDS-PAGE stok solüsyonlarının hazırlanışı

Stok Solüsyonlar	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24.2 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 8.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Tris-HCl, 1 M	12.1 g Tris tartılarak, 50 mL saf suda çözülmüştür. pH 6.8'e ayarlanıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
SDS (%10)	10 g SDS tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Gliserol (%50)	50 mL %100'lük gliserol alınıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılarak, 10 mL saf su içinde çözülmüştür.

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

**Çizelge 2.4.** SDS PAGE Çalışma solüsyonlarının hazırlanışı

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0.8 bisakrilamid (100 mL)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülmüştür. Buzdolabında saklanmıştır.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, saf su 21 mL eklenerek hazırlanmıştır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS, 46 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.
Amonyum persulfat %10'luk (5 mL)	0.5 g amonyum persulfat tartılarak saf su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır.
Elektroforez Tamponu (1 L)	3 g Tris (25 M), 14.4 g glisin (192 mM), 1 g SDS (%0.1) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
Örnek Tamponu (5x) (10 mL)	0.6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 mL %50 gliserol, 2 mL %10 SDS; 0.5 mL 2-merkaptotanol, 1 mL %1 bromfenol mavisi ve 0.9 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.

#### 2.1.3.9.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12)

**Çizelge 2.5.** Ayırıcı jelin hazırlanması

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

### 2.1.3.9.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4)

Çizelge 2.6. Dengeleyici jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	1.33 mL
Solüsyon B (Stok)	2.0 mL
Saf su	4.67 mL
Amonyum persulfat	27 µL
TEMED	27 µL

### 2.1.3.9.3. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

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

### 2.1.3.10. Floresan *in situ* Hibridizasyonda (FISH) Kullanılan Çözeltiler

#### 2.1.3.10.1. Paraformaldehit Çözeltisi (%4, 100 mL)

4 g paraformaldehit tartılıp 100 mL fosfat tamponunda 60°C'de çözümlenerek hazırlanmıştır. Su örneklerinin ve bakteri kültürlerinin fiksasyonunda kullanılmıştır.

#### 2.1.3.10.2. EDTA Çözeltisi (0.5 M, 100 mL)

18.6 g EDTA 70 mL saf su içerisinde çözdürülüp pH 8'e ayarlanır. Son hacmi 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edilmiştir.

#### **2.1.3.10.3. 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) Boya Çözeltisinin Hazırlanması**

DAPI boyasının 200 ng/ $\mu$ L olacak şekilde PBS ile hazırlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde -20°C'de saklanmıştır.

#### **2.1.3.10.4. PBS (Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi, 1000 mL)**

0.13 M NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren PBS tamponu pH 7.2 olacak şekilde 1000 mL hazırlanmıştır. Su örneklerinin ve bakteri kültürlerinin fiksasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.3.10.5. 1X Tris-EDTA Çözeltisi (250 mL)**

Probların 50 ng/ $\mu$ L olacak şekilde sulandırılmasında kullanılmıştır. 5 mL 0.5 M Tris-HCl ve 5  $\mu$ L 0.5 M EDTA çözeltilerinden alarak 250 mL saf suya tamamlanır. Otoklav ile steril edilerek saklanmıştır.

#### **2.1.3.10.6. 1X PBS (Potasyum Fosfat Tampon Çözeltisi, 1000 mL)**

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 800 mL distile su içerisinde çözülerek ve pH 7.4'e ayarlanmıştır. Saf su kullanılarak hacmi 1000 mL'ye tamamlanır. Otoklav ile steril edilerek saklanmıştır.

#### **2.1.3.10.7. NaCl Çözeltisi (5 M, 100 mL)**

29.2 g NaCl 100 mL saf suda çözülüp 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

### 2.1.3.11. Floresan *in situ* Hibridizasyonda (FISH) Kullanılan Problar

Çizelge 2.7. FISH için kullanılan 16S rRNA hedefli oligonükleotid problemler

Prob	Hedef organizma	Sekans (5'-3')	Referans
EUB338	Bakteri	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann ve ark., [118]
EUB338 II	Planctomycetales	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Daims ve ark., [119]
EUB338 III	Verrucomicrobials	GTCGCCACCCGTAGGTGT	Daims ve ark., [119]
NONEUB	Negatif kontrol	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Wallner ve ark., [120]
CteA	<i>Delftia</i> <i>tsuruhatensis</i>	CATGACCCGRGGATATTAGC	Bathe ve Hausner [121]
Pchl454	<i>Pseudomonas</i> <i>koreensis</i>	ATACTCACGTATTAGGTAAGTAC	Schmidt ve ark., [122]
ACA652	<i>Acinetobacter</i> <i>johnsonii</i>	ATCCTCTCCCATACTCTA	Wagner ve ark., [123]

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması

Kızılırmak Nehri, 1150 km'den uzun su yatağı, 75.000 km<sup>2</sup> drenaj alanı ve yıllık ortalama 184.2 m<sup>3</sup>/s debisi ile Türkiye'nin en uzun nehri olup Kızılırmak Deltası'nı geçerek Karadeniz'e ulaşmaktadır. Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır. Çizelge 2.8. ve Şekil 2.1'de görüldüğü gibi Kızılırmak ve çevresinde belirlenen 12 farklı istasyondan mevsimsel periyotlarla su örnekleri toplamaya başlanmıştır.

**Çizelge 2.8.** Su örneklerinin alındığı istasyonlar ve koordinatları

Bölge No	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı Girişi	39°22'16.39''K, 33°26'49.26''D, 890 m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39°23'43.98''K, 33°25'38.24''D, 833 m
3	Erdemli Mah.-Sarımusalı Mevkii	39°26'03.30''K, 33°24'08.43''D, 781 m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39°28'39.46''K, 33°24'26.73''D, 740 m
5	Eğribük-Akkoşan Y. Mevkii	39°31'09.87''K, 33°24'39.32''D, 738 m
6	Bucakyazı-Sazbucağı Mevkii	39°34'34.39''K, 33°26'11.61''D, 763 m
7	Sulubük-Kıybağı Mevkii	39°37'02.34''K, 33°26'38.26''D, 773 m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39°39'53.04''K, 33°28'55.46''D, 852 m
9	Kapulukaya Su Tutma Bendi	39°43'59.01''K, 33°28'25.63''D, 737 m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39°48'38.97''K, 33°29'14.57''D, 684 m
11	Mezbahane-MKE Tesisleri Mevkii	39°50'28.41''K, 33°28'02.13''D, 686 m
12	Irmak Mevkii-Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39°57'22.98''K, 33°25'04,35''D, 679 m



**Şekil 2.1.** Örnekleme bölgesi (Google Earth görüntüsü)

### **2.2.2. Metal analizi**

Cd, Hg ve Sb dirençli mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla 2010-2011 döneminde mevsimsel periyotlarla Kırıkkale il sınırları içerisinde belirlenmiş 12 istasyondan alınan su örneklerinden Cd, Hg ve Sb analizi İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS, Perkin Elmer, USA) ile Konya Selçuk Üniversitesi ICP-MS Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu analizler yapılırken Perkin Elmer tarafından sağlanan cihaz kullanım prosedürüne göre yapılmıştır.

### **2.2.3. Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Bakterilerin İzolasyonu**

Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin seçimi için belirli konsantrasyonda kadmiyum nitrat ( $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ), civa nitrat ( $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ ) ve potasyum antimon tartarat ( $(K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0.5H_2O)$  (100 mg/L) içeren nutrient agar ortamları hazırlanmış ve alınan su örneklerinden belirli dilüsyonlarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiş ve Cd dirençli bakteriler 7, 8 ve 11. bölgelerden, Hg dirençli sadece 2 farklı bölgeden 10 ve 11 bölgelerden ve Sb dirençli bakteriler ise 1, 2, 4, 10 ve 11.bölgelerden izole edilmiştir. Seçici ortamdan izole edilen farklı koloniler saflaştırma için 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Katı agarda büyütülen saf suşların koloni morfolojisi Pelczar ve Reid'e (1958) göre yapılmıştır [124].

### **2.2.4. Maksimum Tolere Edilebilen Metal Konsantrasyon (MTK) Değerlerinin Belirlenmesi**

Cd, Hg ve Sb dirençli izolatların MTK değerleri, petrilerde koloni görülme-yene kadar nutrient agar plağında her saat 10 µg/mL artan konsantrasyonda kendi ağır metali eklenerek saptanmıştır. Başlangıç konsantrasyonu, literatür bilgilerine göre belirlenmiştir. Son konsantrasyonda büyüyen kültür, çizgi metoduyla petriye ekilerek daha yüksek konsantrasyona aktarılmıştır.

### **2.2.5. Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi**

En yüksek MTK Cd (900 mg/L), Hg (220 mg/L) ve Sb (1400 mg/L) konsantrasyonlarında üreyebilen suşlar seçilmiştir. Cd dirençli Cd 11-3, Hg dirençli Hg 10-2 ve Hg 11-4 ve Sb dirençli Sb 01-01 olarak kodlanan suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (API 20NE) incelenmiştir.

### **2.2.6. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

İzole edilen suşların 1 gecelik taze kültür örnekleri alınmıştır ve 100 mL'lik nutrient broth besiyerine ekimler yapılmıştır. Cd 11-3, Hg 10-2, Hg 11-4 ve Sb 01-01 için, kontrol amaçlı 100 mL'lik Cd, Hg ve Sb içermeyen besiyerlerine ve 900 mg/L Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 220 mg/L Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O ve 1400 mg/L K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. 0,5H<sub>2</sub>O metallerini içeren 100 mL'lik besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Bu kültürler çalkalamalı etüvde 30°C'de inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede dalga boyu 600 nm'ye ayarlanarak her 6 saatte bir ölçümleri alınmıştır. Elde edilen optik density (OD) değerleri ile üreme eğrileri çıkarılmıştır.  $g = (\log N - \log N_0) / \log_2$  eşitliğinden metal içeren ve içermeyen ortamlarda saatteki bölünme sayıları hesaplanmıştır.

### **2.2.7. Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyon**

Bu analiz ile Cd, Hg ve Sb dirençli bakteriler yine moleküler düzeyde tanımlanmıştır. İzolatların yağ asidi analizleri için gerekli olan tüm kimyasallar ve uygulama prosedürleri Mikrobial Identification System (MIS) (Microbial ID Inc. Newark De) kullanma kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Prosedür uygun olarak hazırlanmış ve gerekli saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuş örnekler Mikrobial Identification System (MIS) (Microbial ID Inc. Newark De) cihazına yerleştirilerek Gaz kromatografi cihazında CLIN 50 kütüphanesi kullanılarak analiz edilmiştir [93]. Analize alınacak örneklerden triptik soy agara ekilerek 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra gelişen hücrelerden steril cam tüplere öze ile 40 mg tartılmıştır. İlk basamakta saponifikasyonla hücresel lipitlerin parçalanıp, yağ



asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Bunun için 40 mg örnek bulunan tüplerin üzerine 1. çözeltiliden 1 mL ilave edip 5-10 sn vortekslenmiştir. 100°C'lik su banyosunda 5 dk tutulduktan sonra tekrar vortekslenip ve daha sonra tekrar 100°C'lik su banyosunda 25 dk tutulmuştur. İkinci basamakta yağ asitlerin metilasyonu sağlanarak yağ asidi metil esterler elde edilmiştir. Bunun için, 100°C'lik su banyosundan çıkarılan tüplere 2. çözeltiliden 2 mL ilave edilip ve 5-10 s vortekslenip 80°C'lik su banyosunda 10 dk tutulmuştur. Üçüncü basamak olan saflaştırma basamağında soğutulan tüplerin üzerine 3. çözeltiliden 1.25 mL ilave edilip ve 10 dk karıştırılmıştır. Bu basamak sonunda tüplerde altta asidik, üstte organik sıvı faz olmak üzere iki faz gözlenmiştir. Tüplerdeki asidik faz pastör pipeti ile uzaklaştırılıp, yağ asidi metil esterleri, asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplanacak ve organik faz muhafaza edilmiştir. Son basamakta ise tüplerin üzerine 4. çözeltiliden 3 mL ilave edilip ve 5 dk karıştırılmıştır. Böylece serbest yağ asidi metil esterlerinin saf olarak elde edilmesi sağlanıp tüplerde gözlenen üst faz pastör pipeti ile 2 mL'lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Örneklerin FAME analizi, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

#### **2.2.8. Total DNA Ekstraksiyonu**

İzole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn (1990) protokolüne göre yapılmıştır [125]. 25 mL nutrient broth sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıp 150 rpm'de 30°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik bakteri kültürleri 1.5 mL'lik epondorf tüplere koyularak 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 567 µL TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözündürülecek ve üzerlerine 30 µL SDS ve 3 µL proteinaz K çözeltileri eklenerek vortekslenmiştir. 37°C'de 1 saat bekletilen hücrelere 100 µL NaCl ekleyerek tekrar vortekslenmiştir. 80 µL CTAB/NaCl çözeltilisi ekledikten sonra tüpler vortekslenip ve 65°C'de 10 dk tutulmuştur. Tüplerin üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklenerek tekrar vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenen tüplerin üst fazları, temiz santrifüj tüplerine alıp

ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol karışımından ekleyerek vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra üst fazlar dikkatlice temiz tüplere alınarak ve 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir. Ardından DNA çökünceye kadar tüpler vortekslenip 15.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Tüplere 50 µL %70 etanol eklenerek DNA'lar yıkanacak ve tüpler hemen ters çevrilip alkol uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağzı açık durumda oda sıcaklığında bir süre (10-15 dk) veya 60°C'de birkaç dk bekletilerek alkolün tamamen uçurulması sağlanmıştır. Pelletlerin üzerine 50-100 µL TE tamponu ekleyip tüplere parmakla yavaşça vurularak DNA'lar çözdürülmüştür. DNA saflığı Qubit Fluorometre cihazı (Invitrogen) ile ölçülmüştür.

### **2.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Optimizasyonu**

16S rRNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rRNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primer çifti, 27 F primer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1492 R primer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' kullanılmıştır. Primerlerin Tm özellikleri ve literatür verileri baz alınarak bir PCR programı belirlenmiş ve bu program kullanılarak PCR reaksiyonun genomik DNA, MgCl<sub>2</sub> miktarı ve farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimizasyon yapılmıştır. Optimum PCR reaksiyon içeriği ve programları aşağıdaki gibidir. 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, 61.5 µL saf su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polimeraz karıştırılıp pipetaj yapılmıştır. Tüplerin thermal cycler da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekildedir. 5 dk 95°C de ön ısıtma, 95°C'de 30 sn 30 döngü denatürasyon, 30 sn 55°C'de primerlerin bağlanması, 2 dk 72°C'de uzama ve 10 dk 72°C'de zincir sentezinin gerçekleştirilmesi şeklindedir. Suşların 16S rRNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 100 bp Plus DNA Ladder marker olarak kullanılmıştır. PZR ürünleri jelde görüntüledikten sonra sekans analizi yapılabilece kadar -20°C'de saklanmıştır [78].

## **2.2.10. 16S rRNA Sekans Analizi ile Bakterilerin İdentifikasyonu ve Filogenetik Analiz**

İzole edilen bakterilerin PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgelerine yönelik PZR ürünlerinin sekans analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Elde edilen nükleotid sekansları, National Center of Biotechnology Information'ın internet sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda NCBI GenBank veritabanında yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Filogenetik analiz, PZR ile ağır metal dirençli suşlardan elde edilen 16S rRNA sekansları ile gen bankalarından seçilen ilk 10 tür kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin filogenetik ağaçların oluşturulmasında öncelikle 16S rRNA sekansları, Mega 5.1 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) istatistik analiz programında Clustal W seçeneği kullanılarak türlere ait baz dizileri hizalanmıştır [126]. Komşu-bağlantı (neighbour-joining) metodu ile soy ağaçları çizilmiştir ve oluşturulan soy ağaçları ile izolatların birbirleriyle yakınlık dereceleri ortaya konulmuştur.

## **2.2.11. Çoklu Metal Direnç Profillerinin Belirlenmesi**

Cd, Hg ve Sb dirençli herbir izolatın, bu çalışma için seçilen diğer  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  ağır metal bileşiklerine karşı dirençlilikleri de tespit edilmiştir. Böylece izolatların bu metallere karşı çoklu direnç profilleri belirlenmiştir.

## **2.2.12. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi**

Cd, Hg ve Sb dirençli izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon metoduna göre belirlenmiştir [76]. İnkübasyondan sonra organizmalar,

standart antibiyotik disk çizelgesinde verilen inhibisyon zon çapına göre antibiyotik dirençli (R) veya duyarlı (S) olarak sınıflandırılmıştır.

### 2.2.13. Plazmit DNA İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizis metodu kullanılarak saptanmıştır [127]. Plazmit izolasyonu yapılacak bakteriler, 5 mL'lik nutrient broth besiyerine ekilerek 30°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerden 1.5 mL alınarak ependorf tüplere aktarılıp 4°C'de 10.000 rpm'de 30 s santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve üstteki sıvı kısım atılmıştır. Ependorf tüplerindeki hücrelerin üzerine 100 µL alkali lizis I solüsyonundan eklenmiştir. Tüplerdeki karışımlar homojen oluncaya kadar vorteks edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki karışımlara 200 µL alkali lizis II solüsyonu eklenmiştir ve sonra tüpler birkaç kez alt-üst edilmiştir (bu aşamada vorteks kullanılmamıştır). Bu işlemden sonra tüpler buz içinde birkaç dk bekletilmiştir. Tüpler buz içinden çıkarılıp üzerlerine 150 µL alkali lizis III solüsyonu eklenip, birkaç kez alt-üst edilmiştir. Bu işlemden sonra tüpler buz içinde 5 dk bekletilmiştir. Tüpler 4°C'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, üstteki sıvı kısım toplanarak yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlemden sonra ependorf tüplere 2 hacim (1:2) oda sıcaklığına sahip etanol eklenmiş, vorteksledikten sonra, 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Presipite olan nükleik asit molekülleri, 4°C'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülüp, üst kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında bırakılarak etanol uçurulmuştur. Tüplere 1 mL %70'lik etanol eklenip, birkaç kez alt-üst edildikten sonra, 4°C'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır ve tüpler oda sıcaklığında bekletilerek kalan etanol uçurulmuştur. Tüplerdeki nükleik asit moleküllerinin üzerine 50 µL TE tamponu (Tris-EDTA) eklenmiştir. İzole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin metal dirençlilik genlerinin lokasyonunu belirlemek amacıyla plazmit profilleri çıkarılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (215 kb) marker olarak kullanılmıştır. İzole edilen plazmitlerin molekül ağırlıkları ve lokalizasyonları belirlenmiştir. Cd, Hg ve Sb dirençli suşların metal dirençliliğinin plazmit ile ilişkisini doğrulamak için plazmit eliminasyonu yapılmıştır. Farklı eliminasyon

sıcaklıklarında üretilen suşlardan plazmit izolasyonu yapılmıştır. Hem metal hem de metal içermeyen ortamlarda üremeleri test edilen bu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri tekrar incelenmiştir.

#### **2.2.14. Agaroz Jel Elektrofrez**

Marker olarak kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 ile her bir suşa ait izole edilen plazmitler ve kromozomal DNA'lar %0.7'lik agaroz jele yüklenerek (w/v) 80 V'ta 6 saat boyunca elektrofrezde (Bio-rad, Mini-Sub Cell G-T) yürütülmüştür. Jel, etidyum bromürle boyanarak UV altında görüntülenmiş ve marker ile oluşturulan standart egriden her bir plazmitin molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

#### **2.2.15. Total ve Dış Membran Protein Analizleri**

##### **2.2.15.1. Total Protein İzolasyonu**

İzole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin total protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [128]. 100 mL'lik  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$  ve  $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0,5H_2O$  içeren ve içermeyen nutrient broth besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyeri, santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 5 mL distile su eklenerek 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır, üst kısım atılmıştır. Pellet üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dk 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım temiz tüplere alınmıştır. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tampon ilave edilmiştir. Elektrofrez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dk bekletilip -20°C'de saklanmıştır.

##### **2.2.15.2. Dış Membran Protein İzolasyonu**

İzole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin dış membran izolasyonu Achtman ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [129]. 100 mL'lik metal

içeren ve içermeyen nutrient broth besiyerlerine ekimler yapılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır ve sıvı kısım atılmıştır. 10 mL, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 4°C, 3000 rpm'de, 20 dk santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Üst kısım yeni tüplere alınarak 4°C'de, 20.000 rpm'de 60 dk santrifüj yapılmıştır. Üst kısım uzaklaştırılıp pelletlerin üzerine 150 µL distile su eklenerek örnekler -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örneklere 200 µL Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20 dk bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de 2000 rpm, 90 dk santrifüj yapılmış ve sıvı kısım atılmıştır. Pelletler üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dk bekletilmiştir. Laemmli'ye göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (Bio-rad, Mini Protean Tetra System) yapılmıştır [130].

### **2.2.15.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

#### **2.2.15.3.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

16.7 mL %30'lük akrilamid/bis akrilamid, 19.8 mL distile su, 12.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 µL %10'lük APS (amonyum persülfat), 500 µL %10'lük SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin) ilave edilerek, 1 mm aralığına sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı bütanol ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

#### **2.2.15.3.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması**

3.4 mL %30'lük akrilamid/bis akrilamid, 13.6 mL distile su, 2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 200 µL %10'lük APS ve 200 mL %10'lük SDS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 µL TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki bütanol distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli

üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve 80 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 1 saat yürütülmüştür.

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

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller tespitleme çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisinde ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk aralıklarla yıkanarak [131], fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

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

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [132].

#### **2.2.16. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Kullanılacak Örneklerin Toplanması ve Fiksasyonu**

Su örnekleri %4 paraformaldehit ile 0.13 M NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren PBS tamponunda (pH 7.2) +4°C'de 24 saat süreyle fikse edilip, 1:1:

oranında etanol (%100) ve PBS ile süspansiyon edilmiştir. Örnekler etiketlenerek FISH için -20°C’de saklanmıştır [104].

### 2.2.17. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) ve Optimizasyon

Taksonomik düzeyde FISH problemlerinin seçiminde literatürden yararlanarak bir kamu erişim veritabanı katoloğu probbase kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak EUB338 (Bact338), EUB338 II (SBACT P 338), EUB338 III (SBACT V 338) problemleri, negatif kontrol olarak NONEUB (NON338) (Non-bact338), *Delftia tsuruhatensis* için CteA, *Pseudomonas koreensis* için Pchl454 ve *Acinetobacter johnsonii* için ACA652 (ACA23A) problemleri FITC ile işaretlenmiştir. Çalışmada tasarlanan problemler, mevsimsel olarak alınan su örnekleri ile *in situ* hibridizasyona tabi tutulmuştur [133, 134, 135]. Bütün hibridizasyonlar Amann protokolü esas alınarak yapılmıştır [53]. Fiske edilmiş bakteri süspansiyonlarından 1-3 µL lamların üzerine yayılarak 45°C’de 30 dk kurutulmuştur. Ardından lamlar sırayla %50, 80 ve 96’lık etanol serisinden sırayla geçirilip (3’er dk süreyle) lamlar tekrar oda sıcaklığında kurutulmuştur. 0,9 M NaCl, 20 mM, Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM EDTA, %0,001 SDS ve farklı konsantrasyonlarda formamid içeren 9 µL hibridizasyon tamponu ile 1 µL prob solüsyonu (50 ng/µL) ve 1 µL DAPI (200 ng/µl) lamların üzerine yayılmıştır. Lamlar 48°C’de 15 dk süreyle ısıtılmış 50 ml yıkama tamponuyla (0,9 M NaCl, 20 mM, Tris-HCl (pH 7.2), %0,001 SDS içeren) yıkayıp bidistile su ile yıkama tamponu uzaklaştırılmıştır. Bütün deneyler iki kez tekrar edilmiştir. Mikroskopik analiz Leica Floresan mikroskopu ile yapılmıştır. Görüntüler CCD dijital kamera ile 100× büyütme kullanılarak elde edilmiştir. FITC ve DAPI boya sinyallerini analiz etmek için sırasıyla filtre setleri I3 ve A (Leica) kullanılmıştır. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen’den temin edilen (DSMZ, Germany) *Comamonas testosteroni* 50244, *Pseudomonas koreensis* DSM 16610 ve *Acinetobacter johnsonii* 6963 referans suş olarak kullanılmıştır. *In situ* uygulamada hedef olan hücreler ile hibridizasyonu gerçekleştirmek için, FITC işaretli problemler için optimum koşullar belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonu hibridizasyon tamponunda kullanılan formamid konsantrasyonuna göre ayarlanmıştır.



### **2.2.18. Kadmiyum, Civa ve Antimon Dirençli Suşların Populasyon Yayılımlarının Belirlenmesi**

Belirlenen optimum koşullar fikse edilen üç yıllık su örneklerine uygulanmış ve Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin hem DAPI hem de FITC filtreleri seçilerek Leica Floresan mikroskopu ile mikroskopik analiz yapılmıştır. Görüntüler CCD dijital kamera ile 100× büyütme kullanılarak elde edilmiştir. FITC ve DAPI boya sinyallerini analiz etmek için sırasıyla filtre setleri I3 ve A (Leica) kullanılmıştır. Üç replika gerçekleştirilen FISH uygulamalarında populasyon yoğunlukları Leica QWin Plus programı kullanılarak belirlenmiştir. DAPI ve FITC görüntülerinin piksel alanları,

$$\text{Biyokütle (\%)} = \text{FITC piksel alanı/DAPI piksel alanı}$$

eşitliğinden Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin yüzde oranları hesaplanmıştır [136].

### **2.2.19. İstatistiksel Analizler**

Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin üç yıllık mevsimsel populasyon yoğunluk grafikleri, belirlenen biyokütle yüzde oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak çizilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için Origin Pro 8.5 programı (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) kullanılmıştır. Değişkenlere ilişkin veriler, ortalama±standart hata ile verilmiştir. İki den fazla bağımsız değişken arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olup olmadığını tespit etmek amacıyla tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) testi yapılmıştır. Varyans analizi sonucu fark önemli çıktığında hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek amacıyla çoklu karşılaştırma Tukey Testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk Testi ile araştırılmıştır. Analizler bulgular bölümünde yorumlanmıştır. Bulgular, %95 güvenlik aralığı ve (p<0.05 significance level) anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. p<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bölüm 1

##### 3.1.1. Kadmiyum Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Tolere Edilebilen Kadmiyum Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Cd dirençli bakterilerin seçimi için belirli konsantrasyonda Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (100 mg/L) içeren nutrient agar ortamları hazırlanmış ve alınan su örneklerinden belirli dilüsyonlarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiş ve sadece Çizelge 3.1.'de belirtildiği gibi 7, 8 ve 11. bölgelerden toplam 15 suş izole edilmiştir. Sadece Cd 11-3 olarak kodlanan izolat 900 mg/L Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> konsantrasyonunda üreyebilmiştir. Bu konsantrasyon izolatan üreyebildiği en yüksek Cd konsantrasyonu olup bu izolat için MTK değeri olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, bu suş kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu suşun stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

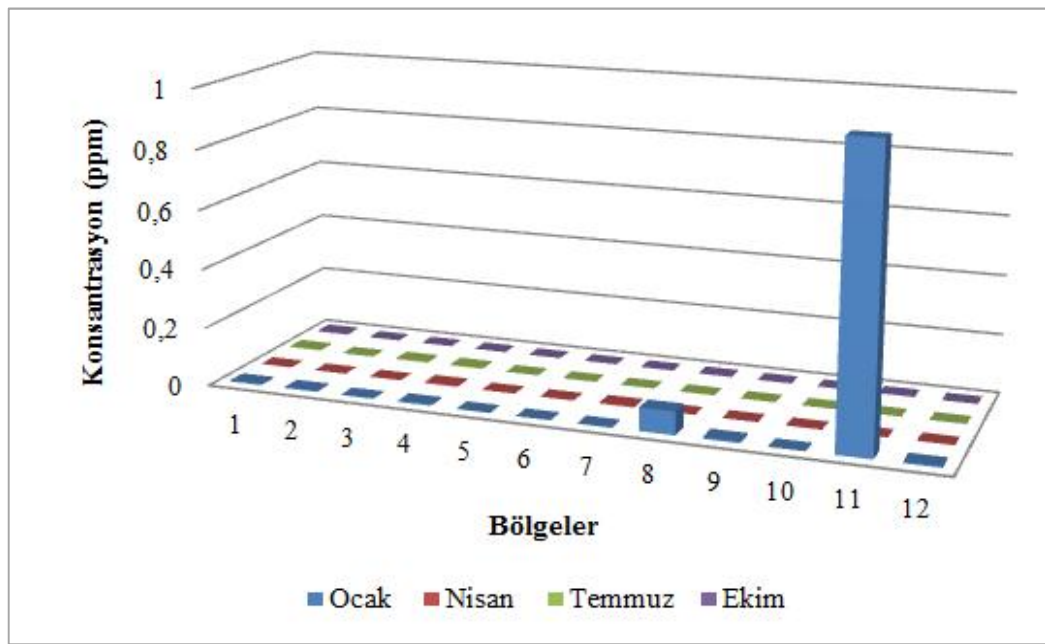
**Çizelge 3.1.** Cd dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri

Bölge-İzolat	Cd (mg/L)											
	100	200	300	400	500	600	650	700	750	800	850	900
07-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
07-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
07-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
07-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
08-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
08-2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
08-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
11-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+); üreme var, (-); üreme yok

### 3.1.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Kadmiyum Analizi

Şekil 3.1.'de belirtildiği gibi 2010-2011 dönemlerinde mevsimsel periyotlarla Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinde ICP-MS ile yapılan analiz sonuçlarına göre Cd miktarı Ocak ayında 8 ve 11. bölgelerde sırasıyla 0.078 ve 0.977 ppm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Konya Selçuk Üniversitesi ICP-MS laboratuvarında ICP-MS cihazı ile cihaz kullanım kılavuzunda belirtilen standart ve kalibrasyon eğrileri kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.1. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan kadmiyum analiz sonuçları

### 3.1.3. Kadmiyum Dirençli Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

En yüksek Cd (900 mg/L) konsantrasyonunda üreyebilen Cd 11-3 olarak kodlanan suşun biyokimyasal özellikleri (API 20NE) Çizelge 3.2'de verilmiştir. Cd 11-3 suşunun floresan renkli, gram (-) basil olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucu katalaz, üreaz, oksidaz, arjinin dihidrolaz, hemoliz, glukonat, mannitol, fruktoz, sodyum malonat, laktik asit, nitrat redüksiyonu ve polimiksin B testleri

pozitif olarak belirlenirken kazein, jelatin, indol, nişasta, laktoz, glukoz, inositol, L-arabinoz, maltoz, glikojen, ksiloz, sukroz, L-ramnoz, lizin dekarboksilaz, betagalaktosidaz, ornithin dekarboksilaz, N-asetilglukozamin, trozin, eskülin ve H<sub>2</sub>S testleri negatif olarak tespit edilmiştir.

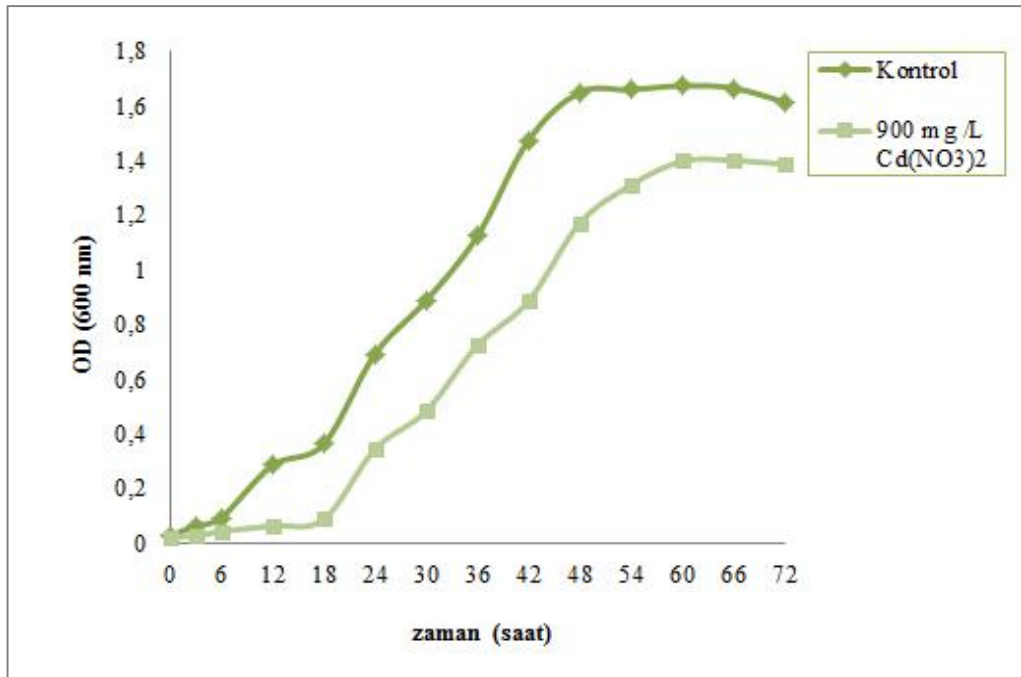
**Çizelge 3.2.** Cd 11-3 suşunun biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

Biyokimyasal özellikler	Cd 11-3 suşu
Koloni rengi	Floresan
Gram boyama	-
Hücre morfolojisi	Basil
Katalaz	+
Oksidaz	+
Kazein	-
Jelatin	-
İndol	-
Nişasta	-
Sitrat	+/-
Üreaz	+
Hemoliz	+
Laktoz	-
D-Glukoz	-
İnositol	-
L-Arabinoz	-
Glukonat	+
D-Mannitol	+
Fruktoz	+
Maltoz	-
Sodyum malonat	+
Glikojen	-
Ksiloz	-
Sukroz	-
L-ramnoz asimilasyonu	-
Lizin dekarboksilaz	-
Laktik asit	+
Arjinin dihidrolaz	+
Beta-galaktosidaz	-
Ornithin dekarboksilaz	-
N-asetilglukozamin	-
Tirozin	-
Nitrat redüksiyonu	+
Eskulin	-
Polimiksin B	+
H <sub>2</sub> S	-
<b>Tanımlanan tür</b>	<i>Comomonas testosteroni</i>

(+); pozitif, (-); negatif

### 3.1.4. Kadmiyum Dirençli Suşun Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

İzole edilen Cd dirençli Cd 11-3 suşunun üreme eğrisi Şekil 3.2.'de verilmiştir. Cd içermeyen kontrol ortamında üretilen Cd 11-3 suşunun Cd içeren ortamda üretilen Cd 11-3 suşuna göre daha erken log fazına geçtiği görülmektedir. Cd içeren ortamda Cd 11-3'ün log fazına 18. saatten sonra geçtiği ve durağan faza ise 58. saatte geçtiği tespit edilmiştir. Kontrol ortamında durağan faza geçişin, Cd içeren ortama göre daha kısa sürdüğü görülmektedir. Bu suşun Cd içeren ve Cd içermeyen ortamlarda saatteki bölünme sayıları hesaplanmıştır. Buna göre Cd 11-3 için Cd içermeyen ortamda 15.2 dakikada bir ve Cd içeren ortamda ise 15.5 dakikada bir bölünme olduğu belirlenmiştir. Üreme eğrisine dayanarak Cd 11-3 suşunun üremesi üzerine Cd'nin etkisinin sınırlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Cd 11-3 üreme eğrisi; ◆ Cd içermeyen, ■ Cd içeren ortam

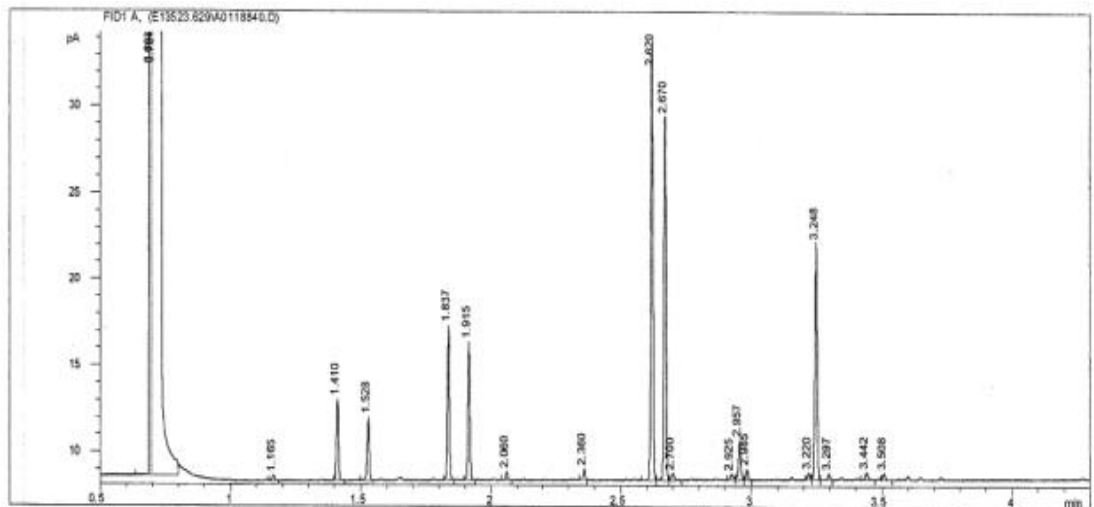
### 3.1.5. Kadmiyum Dirençli Suşun Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu

FAME grupların ihtiva ettikleri yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.3. ve GC kromotogramı Şekil 3.3'te verilmiştir. Cd 11-3 suşunda sırasıyla %22.87 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. FAME profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda Cd 11-3 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.

**Çizelge 3.3.** Cd 11-3 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6927	342818	0.004	----	6.6787		----	< min rt	
0.7010	9.583E+8	0.016	----	6.7407	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1653	479	0.010	----	10.1476		----		
1.4099	5226	0.009	1.098	11.4482	10:0 3OH	6.00	ECL deviates 0.000	
1.5283	4246	0.009	1.064	12.0000	12:0	4.73	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
1.8365	9435	0.008	1.006	13.2036	12:0 2OH	9.93	ECL deviates 0.000	
1.9149	8457	0.008	0.994	13.4832	12:0 3OH	8.80	ECL deviates 0.000	
2.0599	582	0.008	0.976	14.0002	14:0	0.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
2.3598	697	0.008	0.948	15.0008	15:0	----	ECL deviates 0.001	
2.6196	27585	0.009	0.931	15.8360	Sum In Feature 3	26.87	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6703	23493	0.009	0.928	15.9990	16:0	22.82	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
2.7000	720	0.012	----	16.0939		----		
2.9251	578	0.011	0.917	16.8115	17:1 w8c	0.55	ECL deviates -0.004	
2.9566	2975	0.010	0.916	16.9121	17:0 cyclo	2.85	ECL deviates -0.003	
2.9846	785	0.010	0.915	17.0012	17:0	0.75	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
3.2195	472	0.008	0.909	17.7521	Sum In Feature 5	0.45	ECL deviates -0.004	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2476	15894	0.009	0.908	17.8418	Sum In Feature 8	15.10	ECL deviates -0.006	18:1 w7c
3.2970	586	0.010	0.907	17.9996	18:0	0.56	ECL deviates 0.000	Reference -0.007
3.4415	821	0.011	----	18.4715		----		
3.5075	571	0.010	----	18.6869		----		
----	27585	----	----	----	Summed Feature 3	26.87	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	472	----	----	----	Summed Feature 5	0.45	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	15894	----	----	----	Summed Feature 8	15.10	18:1 w7c	18:1 w6c

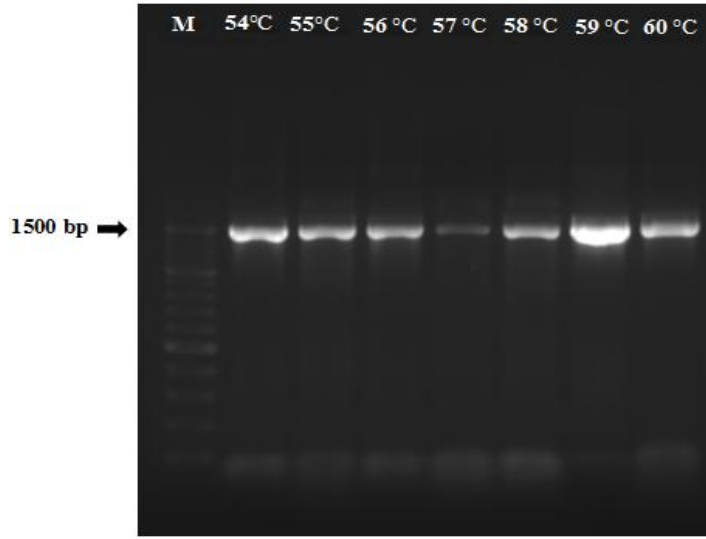
\*\*\* No Matches found in RTSBA6



**Şekil 3.3.** Cd 11-3suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromotogram

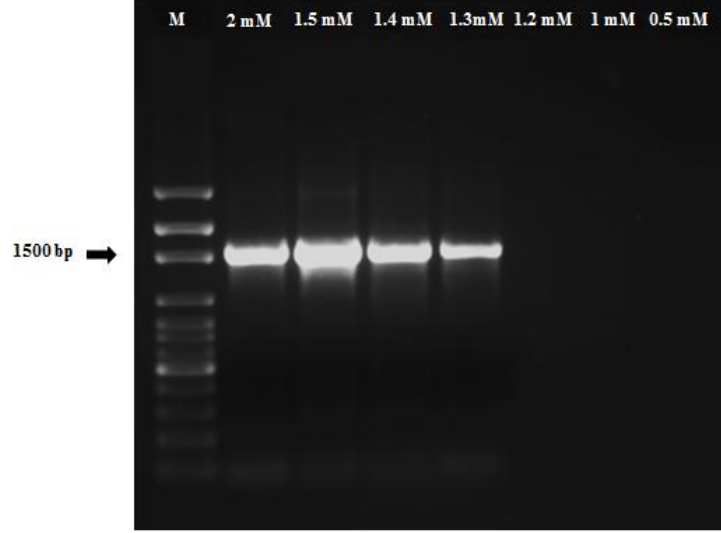
### 3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu

PZR optimizasyonunda farklı primer bağlanma (annealing) sıcaklıkları ve farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları uygulanmıştır. Cd 11-3 suşunun 16S rRNA bölgeleri PZR'de çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi analizinde, PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.4'te denenen 54-60°C sıcaklık aralığında en yoğun PCR ürününün 59°C'de elde edildiği görülmüştür.



**Şekil 3.4.** Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Cd 11-3 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

Optimum annealing sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları (0.5-2.0 mM aralığında) denenmiştir. Çünkü  $MgCl_2$  miktarı arttıkça PCR ürün miktarı azalmaktadır. Şekil 3.5.'te görüldüğü gibi en iyi PZR ürününün, 1.4 mM içeren reaksiyon koşullarında alındığı görülmektedir.



**Şekil 3.5.** Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Cd 11-3 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

### 3.1.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Cd 11-3 Suşunun İdentifikasyonu

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Cd 11-3 suşunun %96 oranında *Delftia tsuruhatensis* T7 (accession number AB075017) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Cd dirençli bakterinin filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.6.'da görüldüğü gibi Cd 11-3 suşunun homoloji gösterdiği ilk on bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.

#### 3.1.7.1. Filogenetik Analiz ile Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment)

Çalışmada, Cd 11-3 suşuna ait 16S rRNA (EK-1. Çizelge 1.) bölgesi ile gen bankasından alınan 10 bakteriye ait 16S rRNA nükleotid diziler MEGA 5.1



programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak hizalama yapılmıştır. Hizalama sonucuna göre filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Cd 11-3 suşunun 16S rRNA bölgesi için yapılan hizalama, 1537 karakter matrisi ile sonuçlanmıştır. Toplam karakterlerin 231 tanesi korunmuş, 1297 tanesi değişken, 92 tanesi filogenetik olarak bilgi verici, 136 tanesinde otomorfik karakter olduğu görülmüştür (Çizelge 3.4.).

**Çizelge 3.4.** Cd 11-3 için gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları

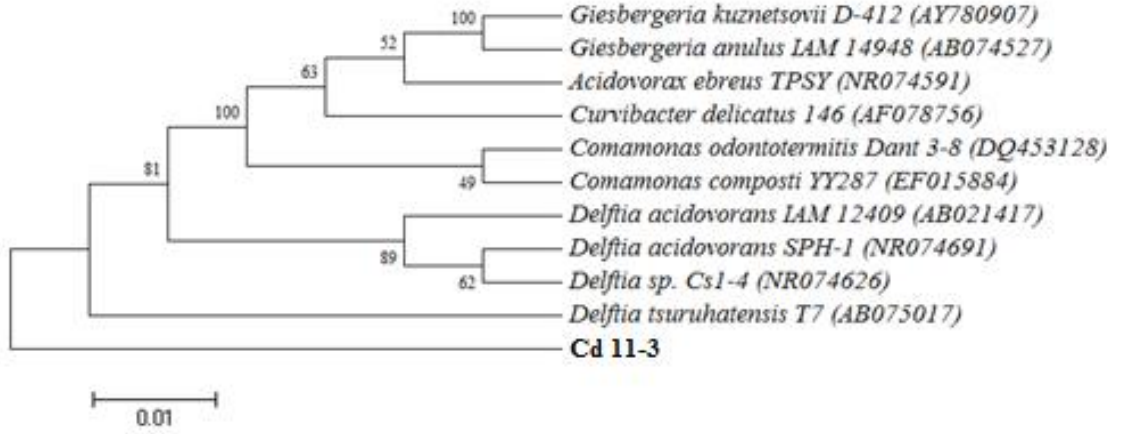
Karakter tipi	Karakter tipi sayısı/ Toplam karakter sayısı	Karakter tipi sayısı/Toplam karakter sayısı (%)
Değişken karakter sayısı	1297/1537	84.38
Korunmuş karakter sayısı	231/1537	15.00
Filogenetik açıdan bilgi verici karakter sayısı	92/1537	5.98
Otomorfik karakter sayısı	136/1537	8.84

Filogeniyi oluştururken uzaklık matrisi (Distance matrix) metodu kullanılmış ve bu veriler ışığında ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışmada, 16S rRNA dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizileri MEGA 5.1 bilgisayar programına veri olarak yüklenerek Cd 11-3 suşuna en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA (Çizelge 3.5.) bölgelerine göre hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.5.** Cd 11-3 suşu için 16S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

<b>Türler</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>1.</b> Cd 11-3	-										
<b>2.</b> <i>Delftia tsuruhatensis</i>	0.062	-									
<b>3.</b> <i>Delftia acidovorans</i>	0.066	0.005	-								
<b>4.</b> <i>Delftia sp.</i>	0.067	0.006	0.001	-							
<b>5.</b> <i>Delftia acidovorans</i>	0.073	0.011	0.006	0.007	-						
<b>6.</b> <i>Comamonas dontotermis</i>	0.103	0.041	0.041	0.042	0.044	-					
<b>7.</b> <i>Comamonas delicatus</i>	0.111	0.055	0.057	0.056	0.062	0.061	-				
<b>8.</b> <i>Comamonas composti</i>	0.107	0.044	0.045	0.044	0.048	0.042	0.068	-			
<b>9.</b> <i>Giesbergeria kuznetsovii</i>	0.109	0.051	0.051	0.050	0.054	0.059	0.051	0.040	-		
<b>10.</b> <i>Giesbergeria anulus</i>	0.109	0.051	0.051	0.050	0.054	0.059	0.051	0.040	0.000	-	
<b>11.</b> <i>Acidovorax ebreus</i>	0.106	0.045	0.047	0.046	0.051	0.046	0.053	0.048	0.037	0.037	-

16S rRNA bölgelerine sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining tree oluşturulmuştur (Şekil 3.6.). Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliği) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 500 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Soyağacın da birbirlerinden en fazla uzakta yer alan izolatlar soy ağacın da evrimsel olarak birbirlerine en uzak türler olarak belirlenmiştir. 16S rRNA için elde edilen dendograma göre Cd 11-3 tamamen ayrı bir grupta yer alırken, diğerlerinin ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. Genetik olarak Cd 11-3 suşuna en uzak tür *Comamonas delicatus* (0.111), en yakın tür ise *Delftia tsuruhatensis* (0.062) olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.6.** Cd 11-3 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.01; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir.)

### 3.1.8. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun Çoklu Metal Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi

*D. tsuruhatensis* suşunun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallere karşı çoklu direnç profilleri belirlenmiştir. Bu suşun Al, Li, Ba, Mn, Pb, Ag, Sn, Ni, Zn ve Sr ağır metallerine karşı çoklu direnç gösterdikleri Cr, Co, Fe, Cu, Sb ve Hg metallerine Çizelge 3.6.'da belirtilen konsantrasyonlarda duyarlı oldukları görülmektedir.

**Çizelge 3.6.** *D. tsuruhatensis* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

Ağır Metal	Konsantrasyon (mg/L)	<i>D. tsuruhatensis</i> (Cd 11-3 suşu)
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	R
LiCl	5000	R
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9H <sub>2</sub> O	1050	S
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1000	R
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	R
Co(NO <sub>3</sub> ) 6H <sub>2</sub> O	750	S
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	450	S
AgNO <sub>3</sub>	15	R
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	S
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	160	R
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	395	R
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	R
Hg(NO <sub>3</sub> ) 2H <sub>2</sub> O	220	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R

(S); duyarlı, (R); dirençli

### 3.1.9. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi

Çizelge 3.7.'de belirtildiği gibi *D. tsuruhatensis* suşunun antibiyotik direnç profilleri ve kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonları verilmiştir. Bu suşun β-laktam grubu antibiyotiklerden ampisilin, oksasilin ve penisiline, aminoglikozidlerden netilmisin ve tobramisine, kuinolonlardan pefloksasine, makrolidlerden eritromisine, rifamisin grubundan rifampine, sülfonamid grubundan trimethoprim-sülfametoksazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, sefalosporin<sub>2</sub> polipeptid, poliketid, glikopeptid ve amfenikol grubundan olan antibiyotiklere ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

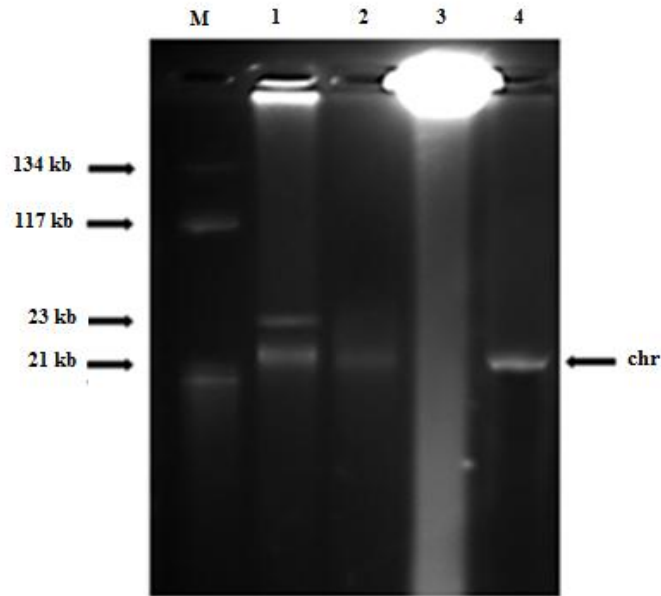
**Çizelge 3.7.** *D. tsuruhatensis* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>	<b><i>D. tsuruhatensis</i> (Cd 11-3 suşu)</b>
<b><u>β-laktamlar</u></b>		
Ampisilin, AMP	10	R
Amoksisilin-Klavulanik asit, AMC/CA	20/10	S
Impenem, (IPM)	10	S
Oksasilin, OXA	1	R
Penisilin, PEN	10	R
Tikarsilin, TIC	75	S
Tikarsilin - Klavulanik asit, TIM	75/10	S
<b><u>Aminoglikozidler</u></b>		
Amikasin, AMK	30	S
Gentamisin, GEN	10	S
Netilmisin, NET	30	R
Tobramisin, TOB	10	R
<b><u>Kuinolonlar</u></b>		
Siprofloksasin, CIP	5	S
Pefloksasin, PEF	5	R
<b><u>Sephalosporinler</u></b>		
Aztreonam, ATM	30	S
Sefepim, FEP	5	S
Seftazidim, CAZ	30	S
Sulbaktam /Sefoperazon, CFP	75/30	S
<b><u>Sülfonamidler</u></b>		
Trimetoprim- Sülfametoksazol, SXT	25	R
<b><u>Polipeptidler</u></b>		
Basitrasin, BAC	10	S
<b><u>Poliketidler</u></b>		
Tetrasiklin, TET	30	S
<b><u>Makrolidler</u></b>		
Eritromisin, ERY	15	R
<b><u>Rifamisinler</u></b>		
Rifampin, RIF	5	R
<b><u>Glikopeptidler</u></b>		
Vancomisin, VAN	30	S
<b><u>Amfenikoller</u></b>		
Kloramfenikol (C)	30	S

(S); duyarlı, (R); dirençli

### 3.1.10. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun DNA Analizi

*D. tsuruhatensis* suşunun Cd direnç genlerinin lokasyonunu belirlemek amacıyla DNA analizi yapılmıştır. Şekil 3.7.'de görüldüğü gibi marker olarak kullanılan *A. tumefaciens* C58C1 ile izole edilen plazmitin molekül ağırlıkları ve lokasyonları belirlenmiştir. *D. tsuruhatensis* suşunun Cd içermeyen ortamda 23 kb boyutunda plazmit taşıdığı görülürken Cd içeren ortamda plazmit varlığına rastlanılmamıştır. Cd dirençliliğinin 23 kb'lık plazmit üzerinde kodlanmadığını doğrulamak için farklı eliminasyon sıcaklıklarında üretilen suşun plazmit izolasyonu yapılmıştır. 42°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra suşun 23 kb olan plazmitinin elimine olduğu ve Cd içeren besiyerinde Cd dirençliliğinin devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle *D. tsuruhatensis* suşunun Cd dirençliliğinin kromozomal DNA ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları sonrasında *D. tsuruhatensis* suşunun antibiyotik dirençlilik profili tekrar incelenmiş ve oksasilin, ampisilin, penisilin ve rifampin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği belirlenmiştir. Bu antibiyotikler için direnç genlerinin lokasyonunun elimine olan 23 kb'lık plazmit üzerinde olduğu belirlenmiştir.

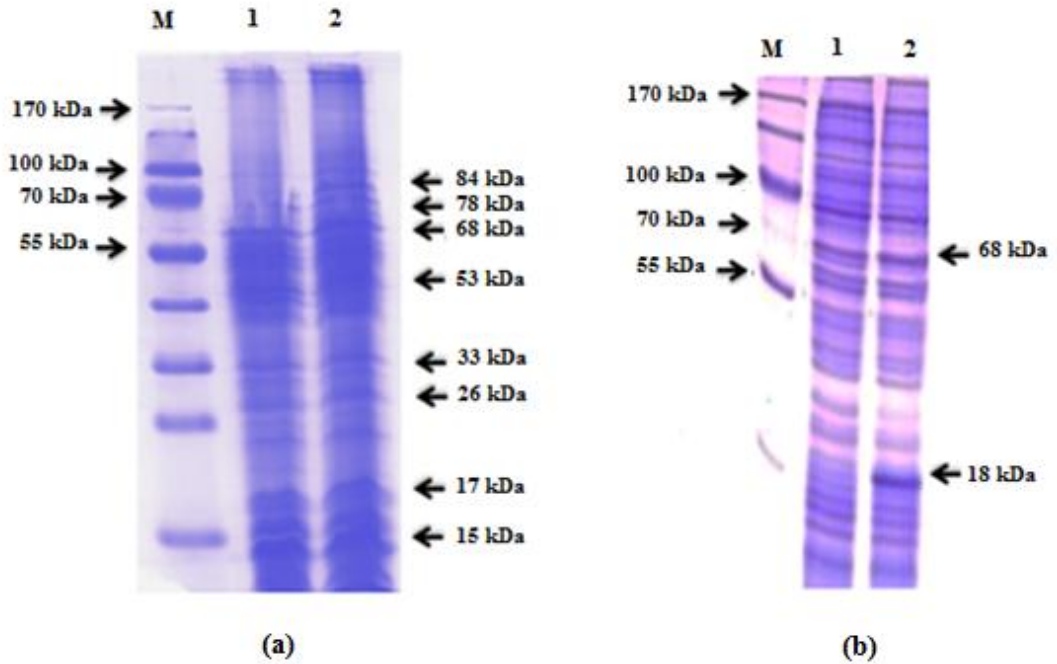


**Şekil 3.7.** *D. tsuruhatensis* suşunun plazmit profili

Marker (M); *A. tumefaciens* C58C1, (1); Cd içermeyen, (2); Cd içeren ortam, (3); plazmit eliminasyonu, (4); Kromozomal DNA (chr)

### 3.1.11. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun Bakterinin Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi

*D. tsuruhatensis* suşunun Cd içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile belirlenmiştir. Total protein ekstraksiyonu sonucu Cd içeren ortamda 84, 68, 33, 26, 17 ve 15 kDa boyutlarında olan bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.9, 1.32, 1.06, 1.21, 1.24 ve 1.43 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Dış membran protein ekstraksiyonu sonucu Cd içeren ortamda 68 ve 18 kDa boyutunda olan bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.32 ve 2.2 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.8.a ve 3.8.b). Bu sonuçlar doğrultusunda *D. tsuruhatensis* suşunun Cd dirençliliğinde her iki tip proteinin de etkin rol aldığı tespit edilmiştir.



**Şekil 3.8.** *D. tsuruhatensis* suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri  
Marker (M); Protein Weight Marker Prestained Protein Ladder, (1); Cd içermeyen, (2);  
Cd içeren ortam

### 3.1.12. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi

*In situ* uygulamada hedef olan Cd dirençli *D. tsuruhatensis* ile hibridizasyonu gerçekleştirmek için, pozitif kontrol olarak EUB338 (Bact338), EUB338 II (SBACT P 338), EUB338 III (SBACT V 338) problemleri, negatif kontrol olarak NONEUB (NON338) (Non-bact338) ve *D. tsuruhatensis* için CteA problemleri FITC ile işaretlenmiş olup optimizasyon çalışması yapılmıştır. *E. coli* DH5 $\alpha$ , tüm FISH uygulamalarında negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Leica QWin Plus programı kullanılarak yapılan intensity analizi sonucunda Çizelge 3.8.'de belirtildiği gibi, pozitif kontrol EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri, negatif kontrol probu NONEUB ile hibridizasyon oranları sırasıyla %89.6 $\pm$ 1.23, %3.50 $\pm$ 0.69 ve %1.08 $\pm$ 0.25 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.9.).

**Çizelge 3.8.** Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları

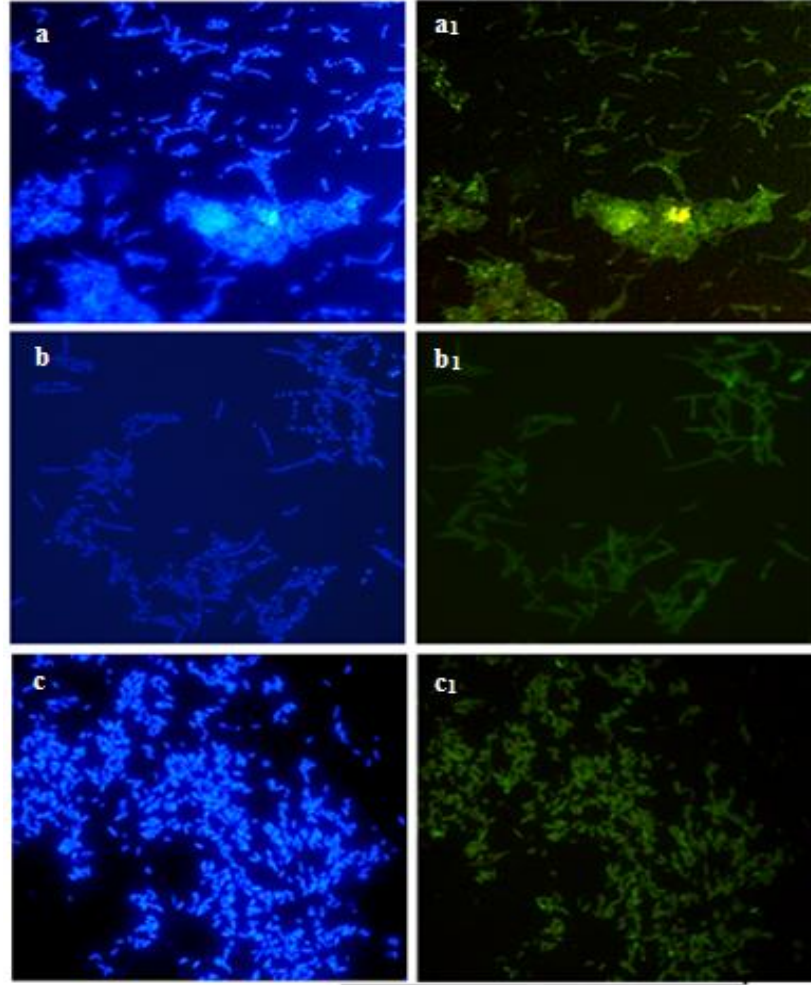
Kontrol Problemleri	Formamid (%) <sup>a</sup>	NaCl (mM) <sup>b</sup>	Hibridizasyon oranı (%)
Pozitif kontrol (EUB 338, II, III)	30	102	89.6 $\pm$ 1.23
Negatif kontrol (NONEUB338)	0	0.9	3.50 $\pm$ 0.69
Negatif kontrol ( <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ )	30	100	1.08 $\pm$ 0.25

<sup>a</sup> hibridizasyon çözeltisinde formamid konsantrasyonu

<sup>b</sup> yıkama çözeltisinde NaCl konsantrasyonu

( $\pm$ ); standart sapma





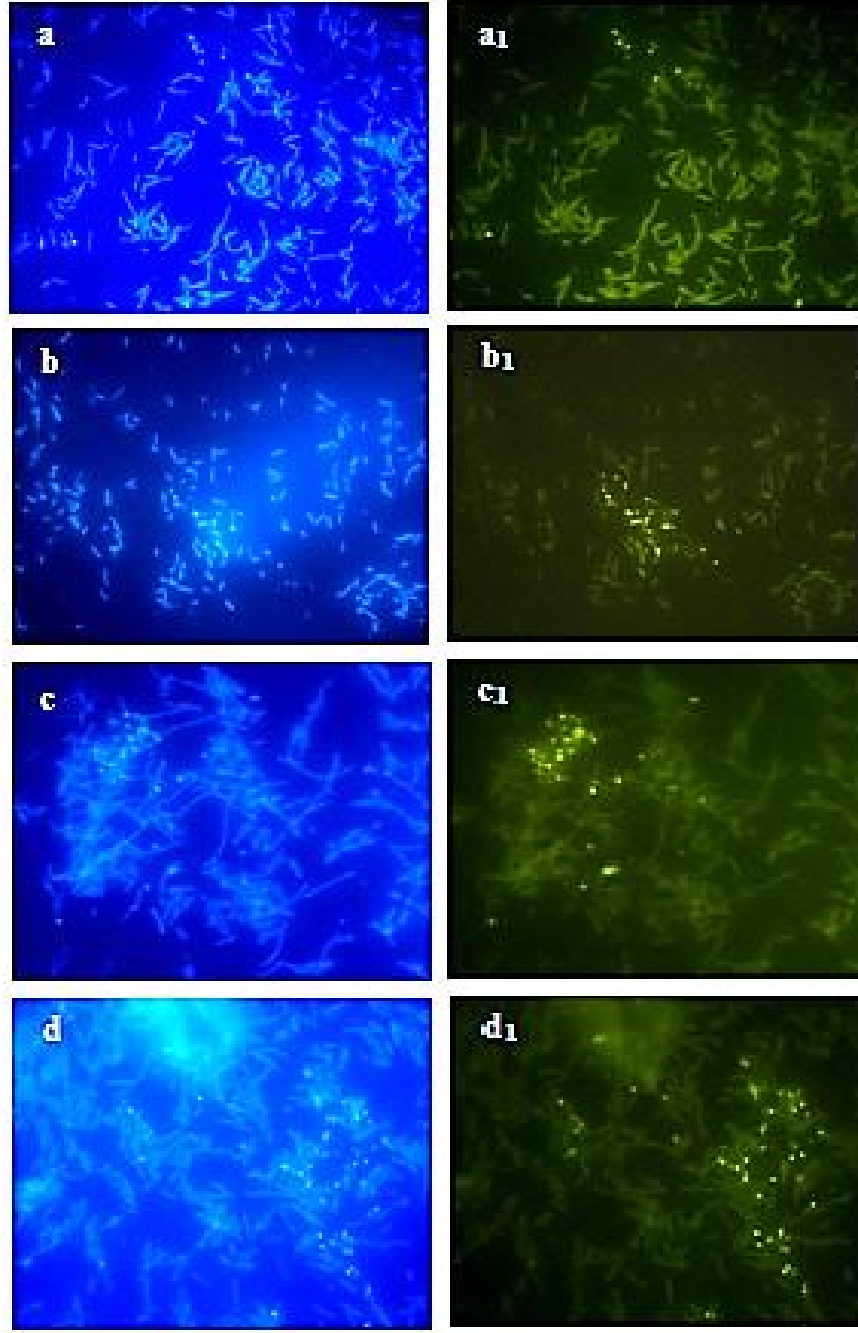
**Şekil 3.9.** EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a<sub>1</sub>), NONEUB negatif kontrol (b-b<sub>1</sub>), *E. coli* DH5α (c-c<sub>1</sub>) ile hibridizasyon

Çizelge 3.9. ve Şekil 3.10, 3.11.'de görüldüğü gibi CteA probu için optimum düzey ve stabilitede hibridizasyonun gerçekleşmesi için uygulanan hibridizasyon solüsyonunda formamid konsantrasyonu %30 olup hibridizasyon oranı  $88.0 \pm 1.58$  olarak belirlenmiştir.

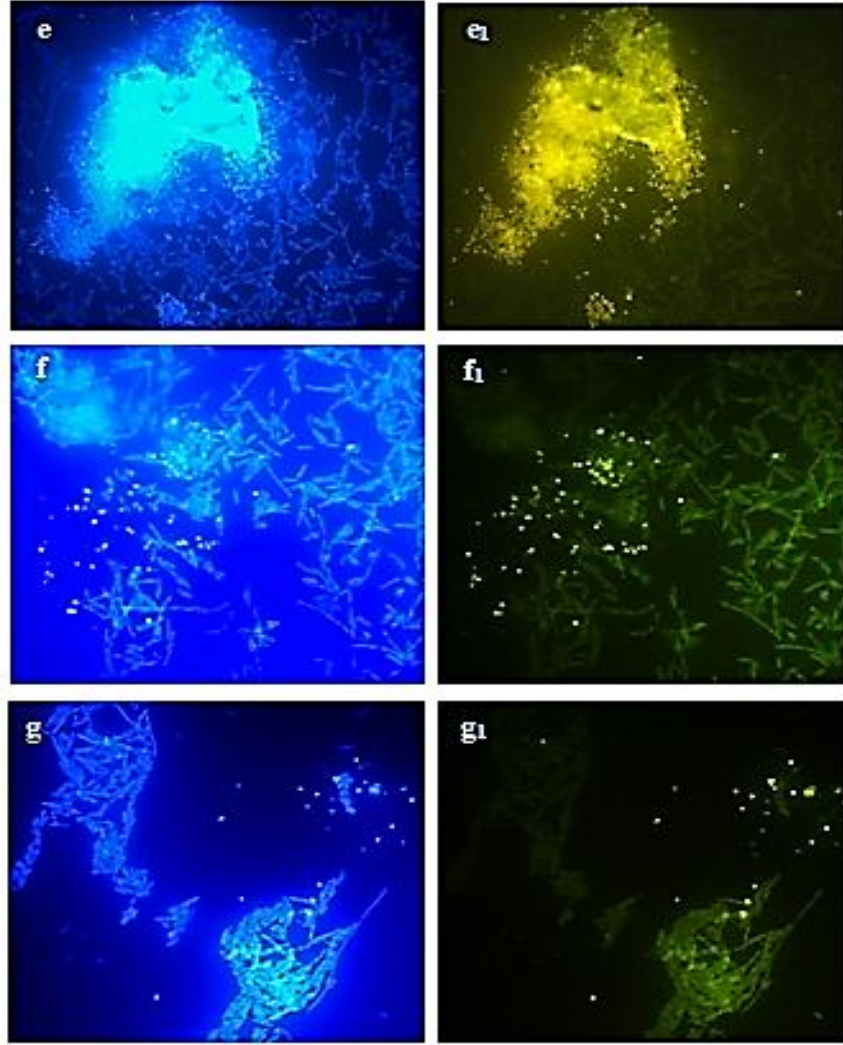
**Çizelge 3.9.** Değişen formamid konsantrasyonlarında Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun % hibridizasyon oranları

<b>Formamid konsantrasyonu</b> <b>(%)</b>	<b>Hibridizasyon oranı</b> <b>(%)</b>
10	9.04±0.26
15	23.3±0.65
20	44.7±0.69
25	62.1±1.23
30	88.0±1.58
35	71.5±0.33
40	22.6±1.03

(±); standart sapma



**Şekil 3.10.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a<sub>1</sub>), %15 (b-b<sub>1</sub>), %20 (c-c<sub>1</sub>), %25 (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



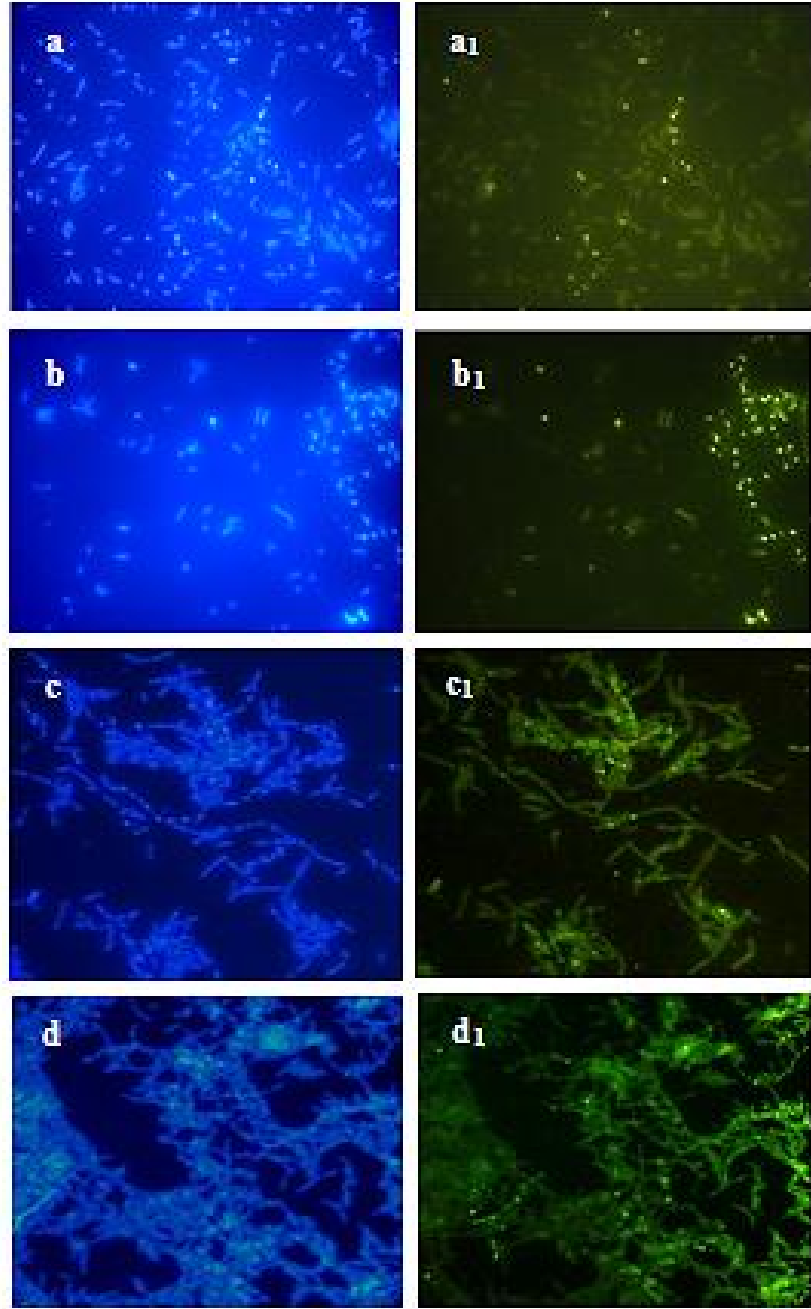
**Şekil 3.11.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e<sub>1</sub>), %35 (f-f<sub>1</sub>), %40 (g-g<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

Çizelge 3.10 ve Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14'te görüldüğü gibi göre yıkama solüsyonundaki NaCl konsantrasyonu 100 mM olup hibridizasyon oranı  $87.6 \pm 0.39$  olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu koşullarda su örneklerinde hibridizasyon çalışmaları yapılarak Kızılırmak'tan izole edilen Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun mevsimsel populasyon yayılım profili çıkarılmıştır.

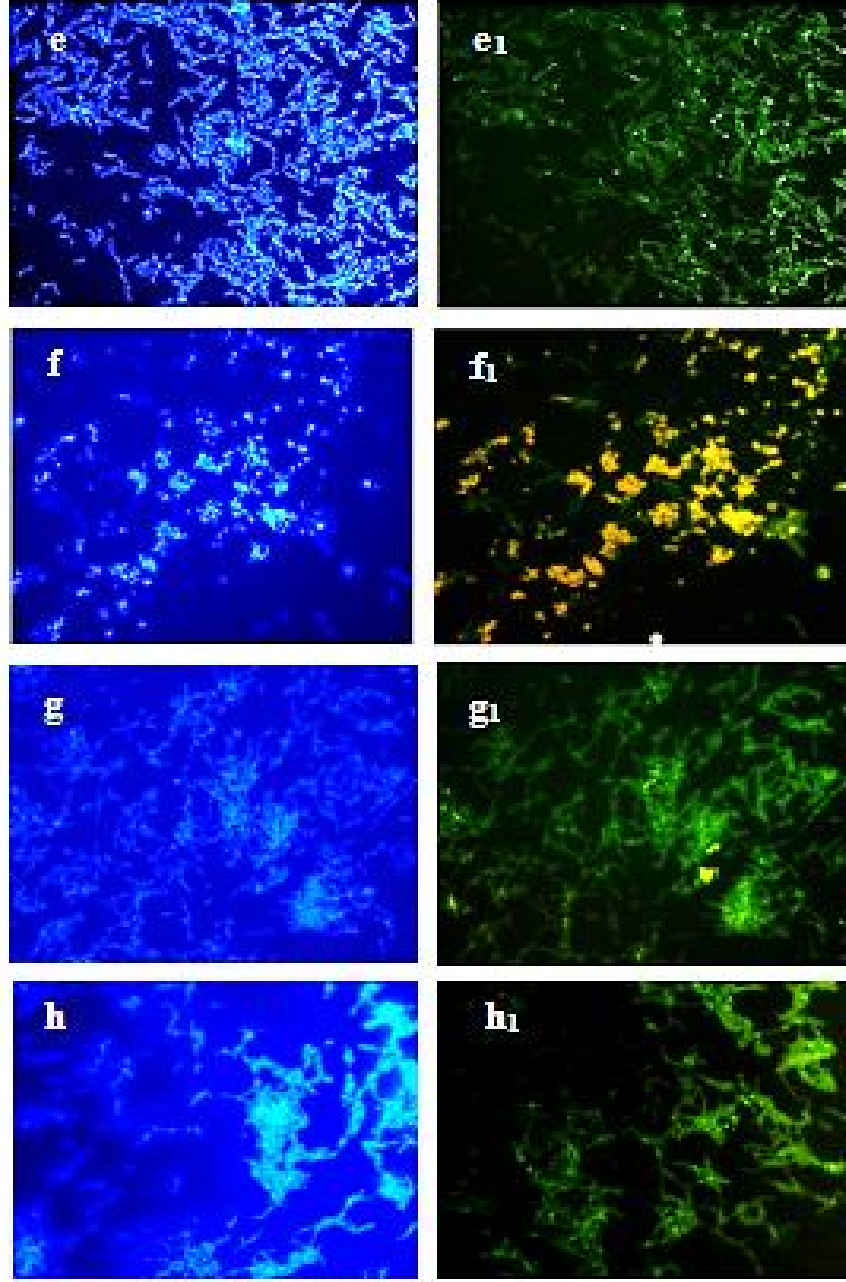
**Çizelge 3.10.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun % hibridizasyon oranları

NaCl konsantrasyonu (mM)	Hibridizasyon oranı (%)
95	83.2±1.11
96	85.2±1.85
97	86.3±0.79
98	87.1±0.41
99	87.4±0.22
100	87.6±0.39
101	86.1±1.02
102	83.6±1.38
103	81.7±1.18
104	80.3±0.53

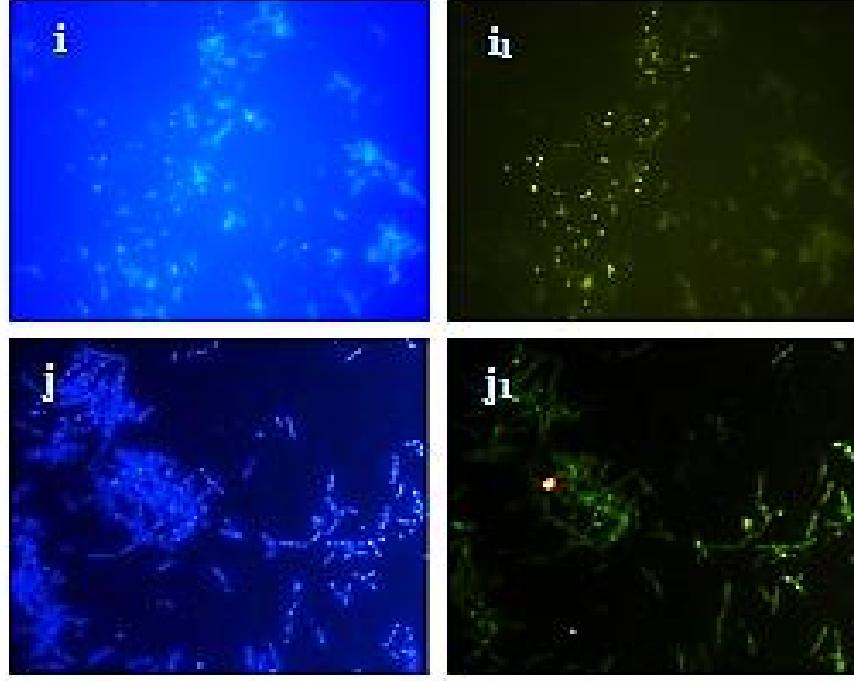
(±); standart sapma



**Şekil 3.12.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a<sub>1</sub>), 96 mM (b-b<sub>1</sub>), 97 mM (c-c<sub>1</sub>), 98 mM (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



**Şekil 3.13.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e<sub>1</sub>), 100 mM (f-f<sub>1</sub>), 101 mM (g-g<sub>1</sub>), 102 mM (h-h<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

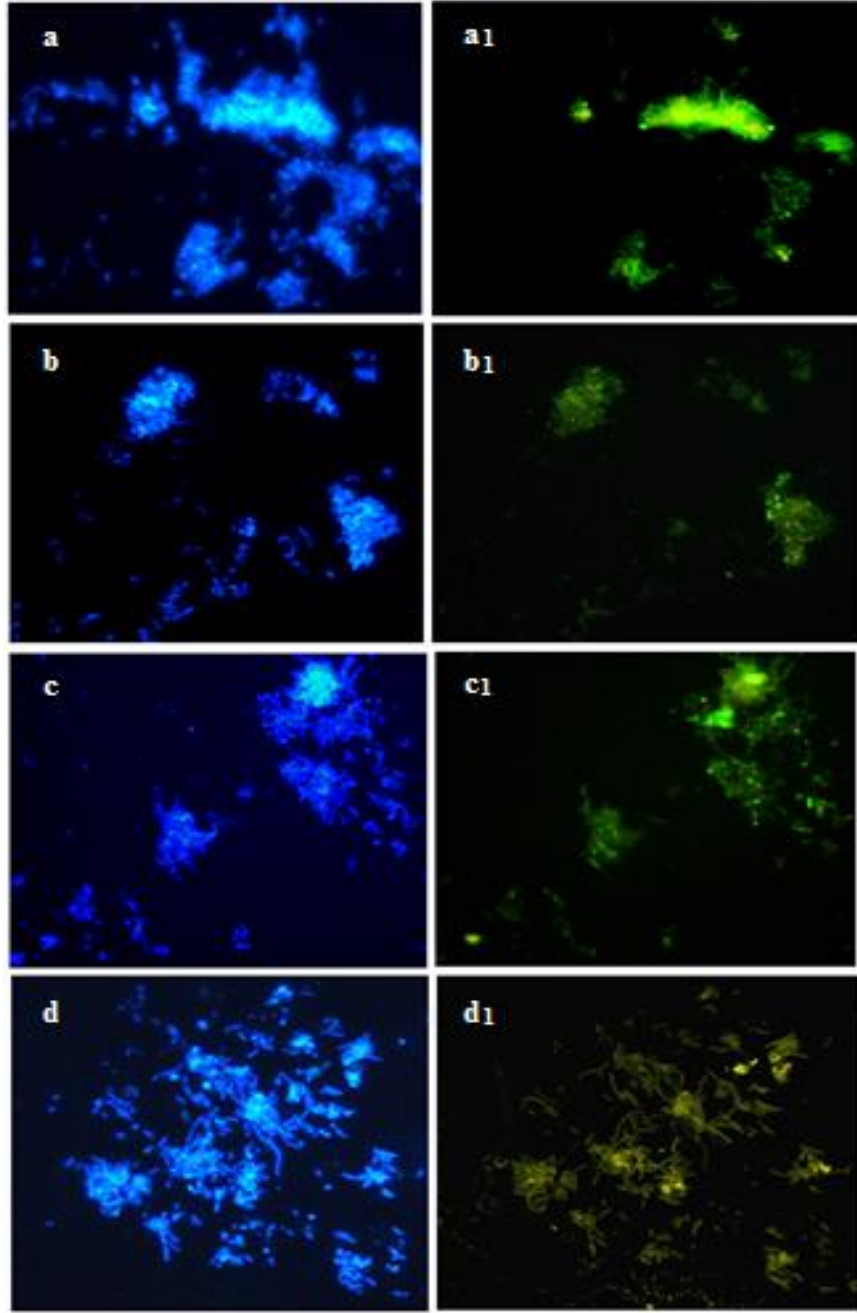


**Şekil 3.14.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i<sub>1</sub>), 104 mM (j-j<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

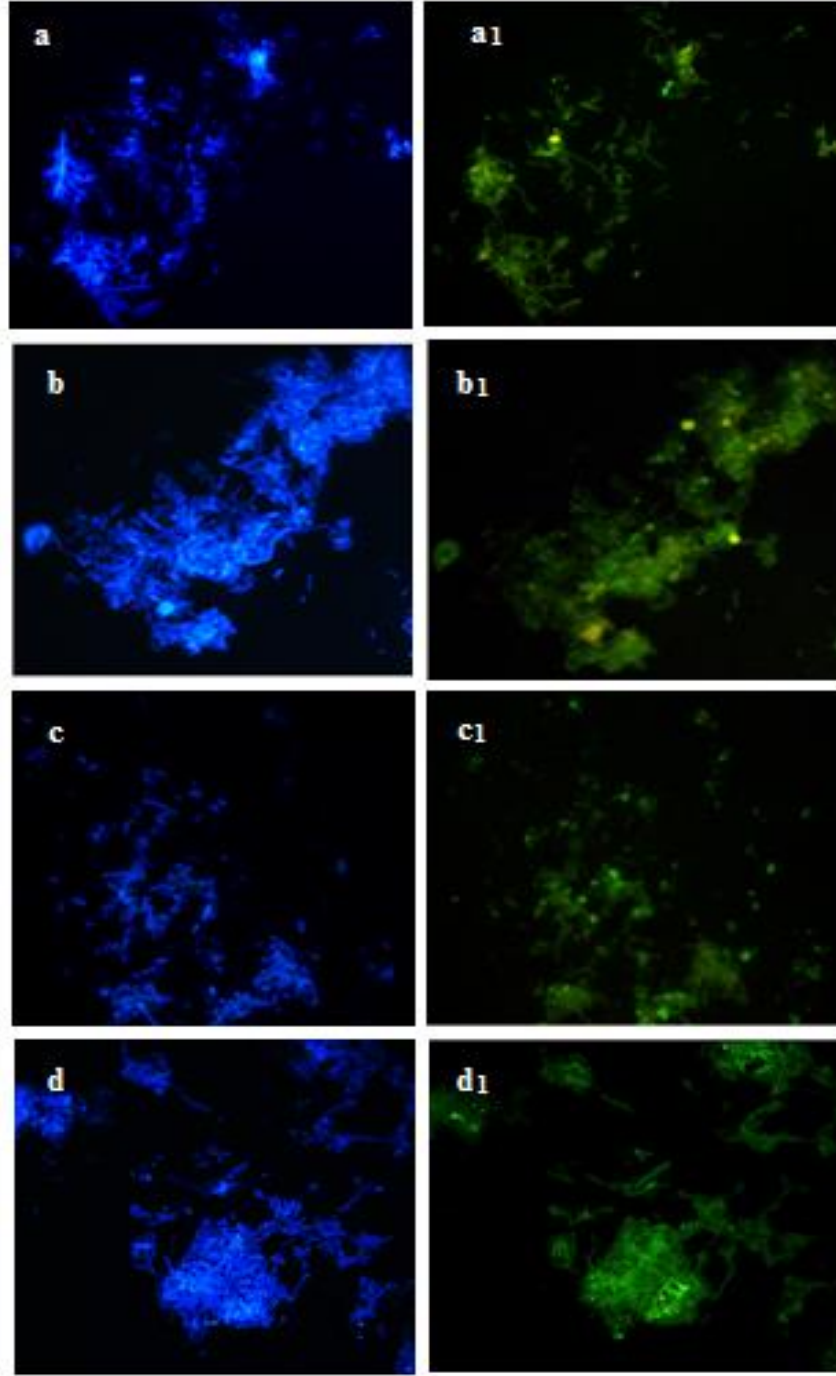
### **3.1.13. Kadmiyum Dirençli *Delftia tsuruhatensis* Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı**

Şekil 3.15, 3.16 ve 3.17.'de görüldüğü gibi CteA probu için belirlenen optimum koşullar (%30 formamid ve 100 mM NaCl) 2010 Ocak-2012 Ekim tarihleri arasında üçer aylık periyotlarla toplanmış ve fikse edilmiş olan su örnekleri kullanılarak Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun mevsimsel populasyon yayılım profili çıkarılmıştır. Şekil 3.19'da verilen grafikte FITC işaretli CteA probu ile hibridize olan *D. tsuruhatensis* suşunun biyokütle yüzdeleri (%) belirtilmiştir.

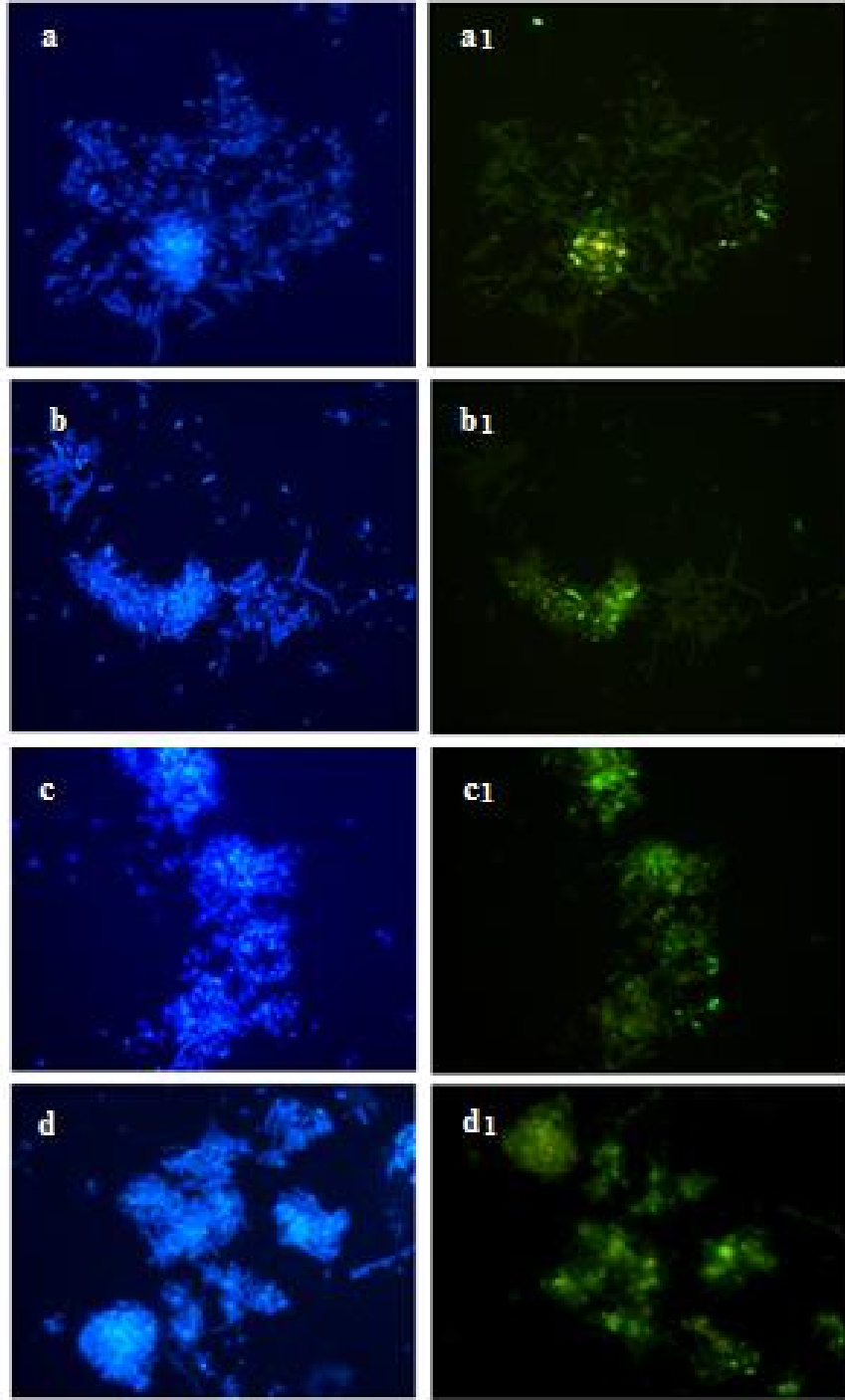




**Şekil 3.15.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

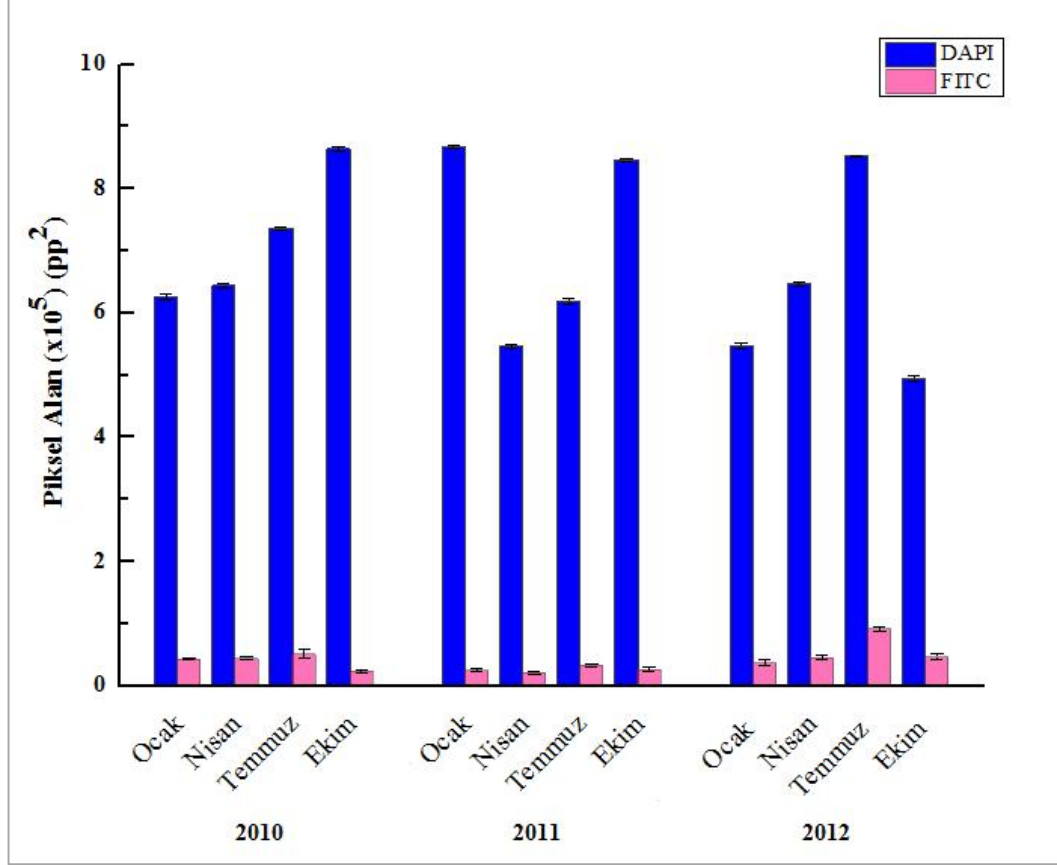


**Şekil 3.16.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi



**Şekil 3.17.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğu (%) DAPI ve CteA probu ile hibridize olan bu suşun FITC görüntülerinin piksel alanları (pp<sup>2</sup>) ve standart sapma değerleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.18.).



**Şekil 3.18.** 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yayılımı (pp<sup>2</sup>) (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

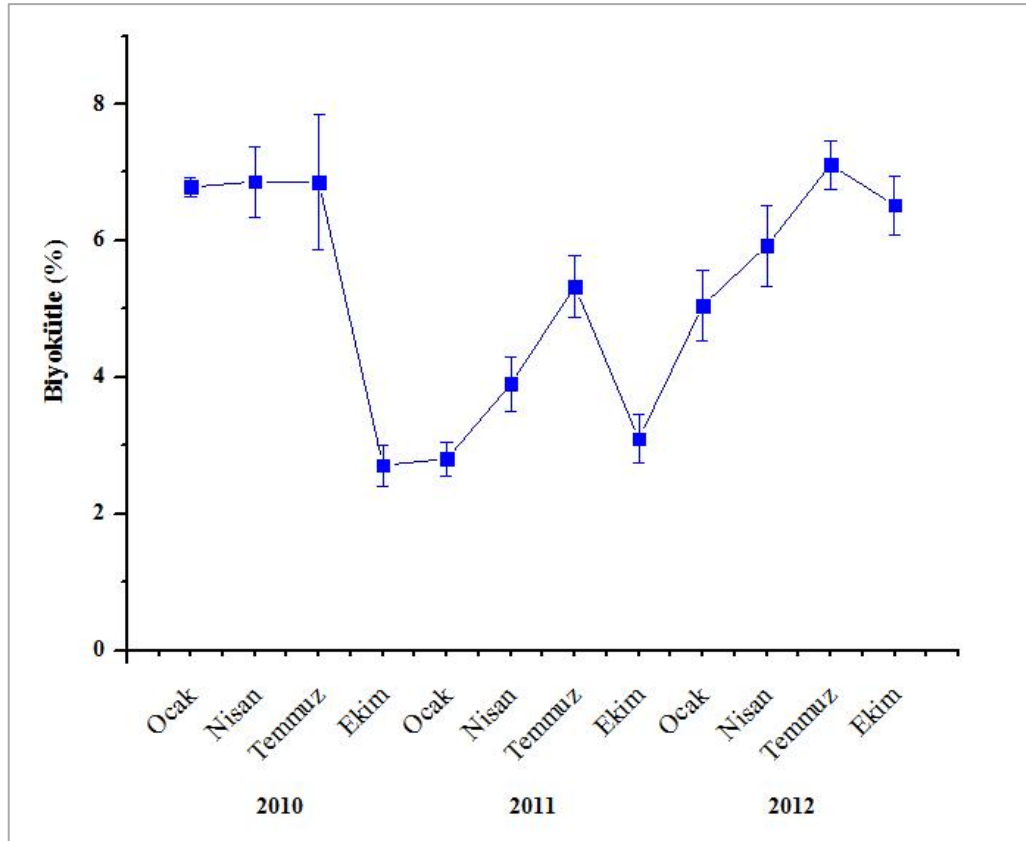
2010 Ekim ayında toplam bakteri populasyonunun en fazla olduğu ( $8.64 \times 10^5 \pm 0.034 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) belirlenmiştir. Ekim ayı *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğunun diğer aylara göre en düşük olduğu ( $0.23 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) tespit edilmiştir. Temmuz ayında *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğunun en fazla olduğu ( $0.50 \times 10^5 \pm 0.07 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) belirlenmiştir.

2011 Ocak ayında toplam bakteri populasyonunun en fazla olduğu ( $8.67 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) tespit edilmiştir. Nisan ayında *D. tsuruhatensis* suşunun

populasyon yoğunluğunun diğer aylara göre en düşük olduğu ( $0.21 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) belirlenmiştir. Temmuz ayında *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğunun en fazla olduğu ( $0.33 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) görülmüştür.

2012 Temmuz ayında hem toplam bakteri ( $8.52 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) ve *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğunda ( $0.92 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) artış görülmüştür. Ocak ayında *D. tsuruhatensis* suşunun populasyon yoğunluğunun diğer aylara göre düşük olduğu ( $0.36 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) belirlenmiştir.

FITC ile işaretli CteA probuyla hibridize olan *D. tsuruhatensis* suşununun toplam biyokütledeki yüzdeleri (%), piksel alan grafiğine dayanarak çizilen 2010-2012 yılı mevsimsel yayılım grafiği Şekil 3.19.'da verilmiştir.



**Şekil 3.19.** Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2010 yılı Ocak ayında *D. tsuruhatensis* suşunun ortalama yoğunluğu  $6.79 \pm 0.14$ , Nisan ayında  $6.87 \pm 0.52$ , Temmuz ayında  $6.85 \pm 0.98$  ve Ekim ayında  $2.71 \pm 0.30$  olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında populasyon yayılım oranlarında çok fazla değişiklik gözlenmezken, populasyon yayılımında Temmuz ayında azalma görülmüştür. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında gözlenen ortalama *D. tsuruhatensis* yoğunlukları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ), Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen azalışın anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) gözlenmiştir.

2011 yılı *D. tsuruhatensis* suşunun mevsimsel yayılımına bakıldığında biyokütledeki ortalama yoğunluğu Ocak ayında  $2.81 \pm 0.25$ , Nisan ayında  $3.91 \pm 0.40$ , Temmuz ayında  $5.33 \pm 0.46$  ve Ekim ayında  $3.09 \pm 0.36$  olarak belirlenmiştir. Ocak ayından, Nisan ve Temmuz aylarına geçerken gözlenen artışın ve Temmuz ayında gözlenen ortalama Cd dirençli *D. tsuruhatensis* yoğunluğundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir.

2012 yılı biyokütledeki *D. tsuruhatensis* suşunun ortalama yoğunluğu Ocak ayında  $5.05 \pm 0.52$ , Nisan ayında  $5.93 \pm 0.59$ , Temmuz ayında  $7.12 \pm 0.36$  ve Ekim ayında  $6.52 \pm 0.43$  olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında gözlenen ortalama Cd dirençli *D. tsuruhatensis* populasyon yoğunlukları arasındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ), Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen yoğunluk azalışının anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) belirlenmiştir.

Yapılan ANOVA testi neticesinde 2010, 2011 ve 2012 yılı içerisinde Ocak, Nisan ve Temmuz ve Ekim aylarında gözlenen ortalama Cd dirençli *D. tsuruhatensis* yoğunluklarının eşit olmadığı ( $p < 0.001$ ) ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu üç yıl için uygulanan Shapiro-Wilk istatistiksel analiz testine göre *D. tsuruhatensis* için verilerin normal dağılım ( $p < 0.05$ ) gösterdiği belirlenmiştir.

## 3.2. Bölüm 2

### 3.2.1. Civa Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Maksimum Tolere Edilebilen Civa Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Hg dirençli bakterilerin seçimi için belirli konsantrasyonda  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 mg/L) içeren nutrient agar ortamları hazırlanmış ve alınan su örneklerinden belirli dilüsyonlarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyeler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiş ve sadece 2 farklı bölgeden (10 ve 11. bölge) 8 farklı Hg dirençli mikroorganizma izole edilmiştir. Çizelge 3.11.'de gösterildiği gibi bu sekiz izolattan sadece Hg 10-2 ve Hg 11-4 olarak kodlanan izolatlar 220 mg/L  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  konsantrasyonu MTK değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalar Hg direnci yüksek olan bu iki izolat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu suşların stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.11.** Hg dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri

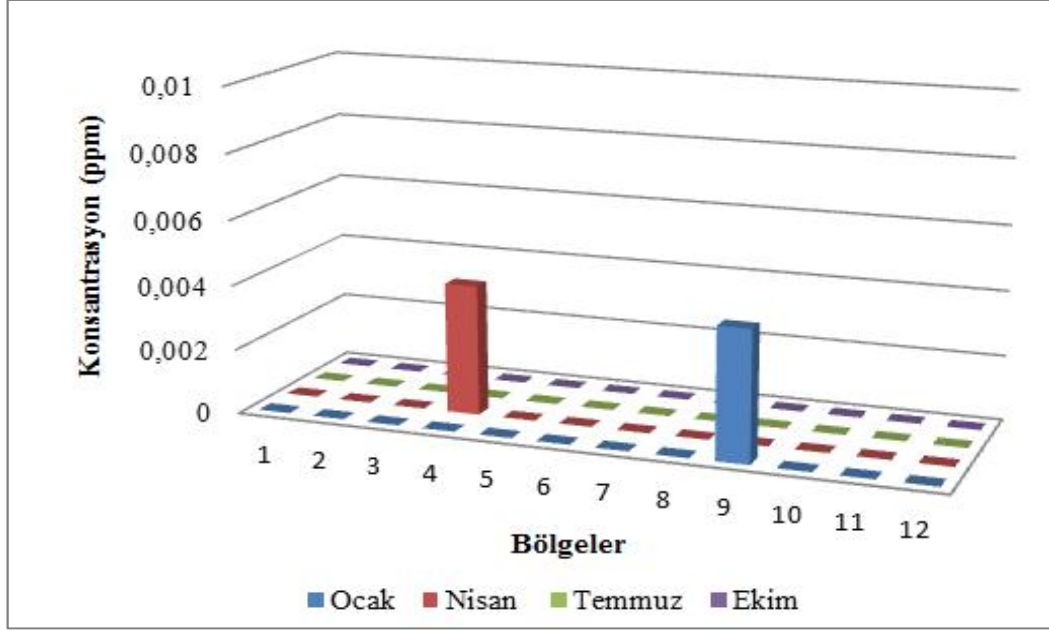
Bölge-İzolat	Hg (mg/L)										
	100	120	140	150	160	170	180	190	200	210	220
10-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
11-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(+); üreme var, (-); üreme yok

### 3.2.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Civa Analizi

2010-2011 dönemlerinde mevsimsel periyotlarla Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinde ICP-MS ile yapılan Hg analiz sonuçları Şekil 3.20.'de verilmiştir.

Sadece 4. ve 9. bölgelerde TSE, WHO ve ABD Çevre Koruma Ajansı EPA'nın içme suyu standartlarında ön görülen civa değerlerinin altında (<0.005) Ocak ve Nisan aylarında sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.20. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan civa analiz sonuçları

### 3.2.3. Civa Dirençli Suşların Biyokimyasal ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çizelge 3.12.'de gösterildiği gibi Hg 10-2 ve Hg 11-4 olarak adlandırılan suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri (API 20NE) tespit edilmiştir. Suşların optik özellik bakımından saydam olduğu ve her iki suşun beyaz renkte pigmente sahip olduğu belirlenmiştir. Hg 10-2 ve Hg 11-4'ün morfolojilerini belirlemek için gram boyama yapılmış gram negatif oldukları ve morfolojileri bakımında da basil oldukları tespit edilmiştir. Biyokimyasal testler sonucu her iki suşunda arabinoz, glukonat, mannitol, glukoz, malonat ve arjinin pozitif, laktoz, DP 300, inositol, adonitol, ksiloz, kazein, indol, nişasta, dekstrin, maltoz, lizin dekarboksilaz, eskulin, polimiksin B, sorbitol, ONPG, ornitin, nitrat redüksiyonu, sukroz ve ramnoz ise negatif olarak tespit edilmiştir.



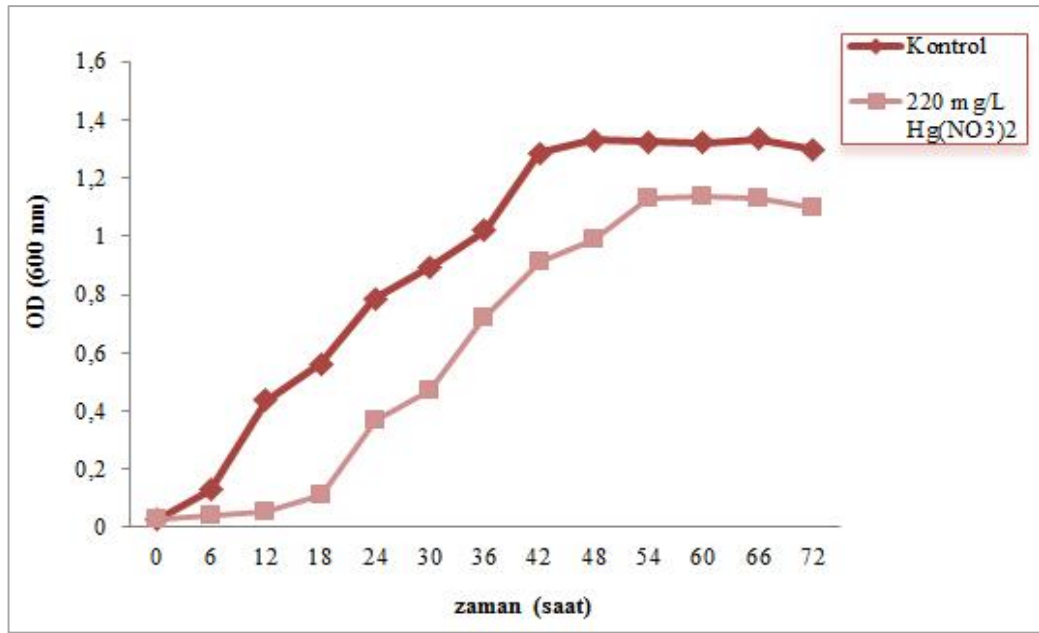
**Çizelge 3.12.** Hg dirençli bakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

<b>Biyokimyasal özellikler</b>	<b>Hg 10-2 suşu</b>	<b>Hg 11-4 Suşu</b>
Koloni rengi	Sarı	Sarı
Gram boyama	-	-
Hücre morfolojisi	Basil	Basil
Katalaz	+	+
Oksidaz	+	+
Kazein	-	-
Jelatin	+	+
İndol	-	-
Nişasta	-	-
Sitrat	+	+
Üreaz	-	-
Hemoliz	+	+
Laktoz	-	-
D-Glukoz	+	+
İnositol	-	-
L-Arabinoz	+	+
Glukonat	+	+
D-Mannitol	-	-
Fruktoz	+	+
Maltoz	-	-
Sodyum malonat	-	-
Glikojen	-	-
Ksiloz	-	-
Sukroz	-	-
L-ramnoz asimilasyonu	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-
Laktik asit	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+
Beta-galaktosidaz	-	-
Ornithin dekarboksilaz	-	-
N-asetilglukozamin	-	-
Tirozin	+	+
Nitrat redüksiyonu	-	-
Eskulin	-	-
Polimiksin B	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
<b>Tanımlanan tür</b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>

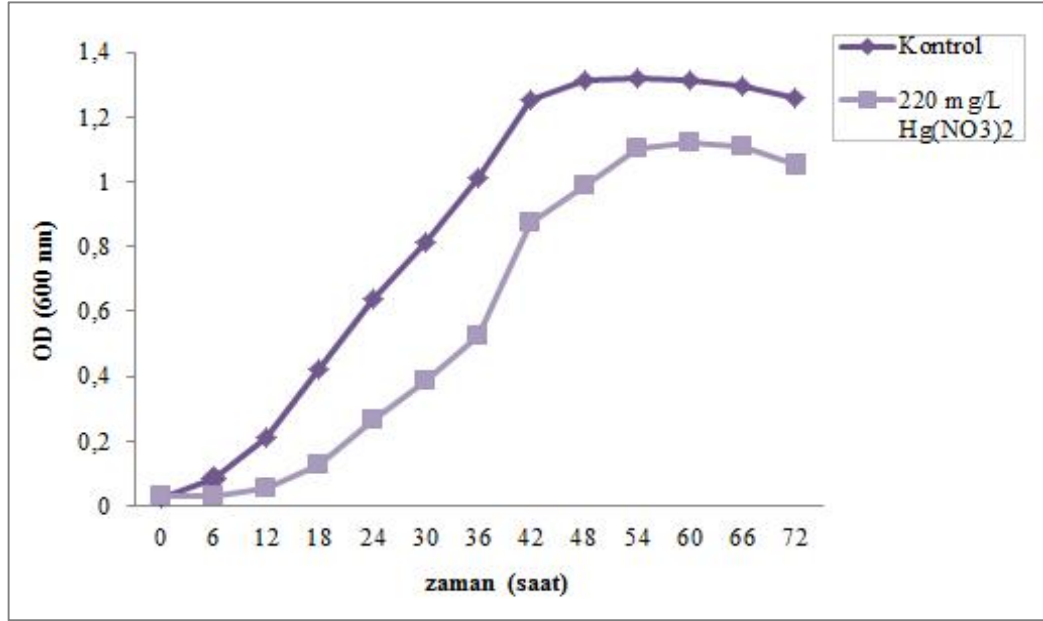
(+); pozitif; (-); negatif

### 3.2.4. Civa Dirençli Suşların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

İzole edilen Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının üreme eğrileri sırasıyla Şekil 3.21 ve 3.22.'de verilmiştir. Hg 10-2 ve Hg 11-4'ün benzer üreme profili gösterdikleri belirlenmiştir. Her iki suşunda Hg içermeyen kontrol ortamında üretildiklerinde lag fazından erken çıktıkları ve ilk saatlerde log fazına geçtikleri görülmektedir. Hg içeren ortamda üretilen bu suşların ise lag fazındaki hazırlık evresinin uzun sürdüğü ve log fazına geçişlerinin 12. saatten sonra olduğu tespit edilmiştir. Hg 10-2 için Hg içermeyen ortamda 19.1 dakikada bir bölünme gösterdiği, Hg içeren ortamda ise 16.1 dakikada bir bölündüğü belirlenmiştir. Hg 11-4 metal içermeyen ortamda 16.8 dakikada bir bölünürken, Hg içeren ortamda ise 14.4 dakikada bir ürettiği gözlemlenmiştir. Hg 11-4 suşunun daha hızlı ürettiği belirlenmiştir.



Şekil 3.21. Hg 10-2 üreme eğrisi; Hg içermeyen , Hg içeren ortam



Şekil 3.22. Hg 11-4 üreme eğrisi; —◆— Hg içermeyen, —■— Hg içeren ortam

### 3.2.5. Civa Dirençli Suşların Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu

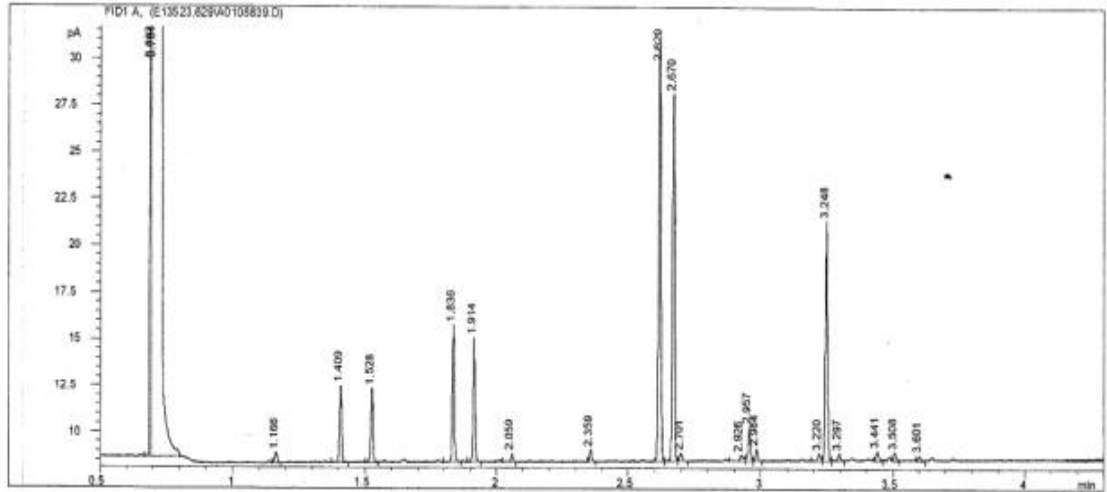
Hg 10-2 suşunda FAME gruplarının ihtiva ettikleri yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.13. ve GC kromotogramı Şekil 3.23.'te verilmiştir. Hg 10-2 suşunda %23.13 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Hg 10-2 suşunun *Pseudomonas syringae* (0.129) ile eşleştiği tespit edilmiştir. Hg 11-4 suşunda ise FAME gruplarının ihtiva ettikleri yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.14 ve GC kromotogramı Şekil 3.24.'te verilmiştir. Hg 11-4 suşunda %23.82 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Hg 11-4 suşunun *Pseudomonas putida* (0.320) ile eşleştiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.13.** Hg 10-2 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6925	370781	0.004	----	6.6792		----	< min rt	
0.7008	9.477E+8	0.016	----	6.7409	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1656	777	0.010	----	10.1514		----		
1.4092	4720	0.009	1.098	11.4509	10:0 3OH	5.90	ECL deviates 0.003	
1.5275	4620	0.009	1.064	12.0005	12:0	5.60	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
1.8361	7949	0.008	1.006	13.2041	12:0 2OH	9.10	ECL deviates 0.000	
1.9144	6960	0.008	0.994	13.4827	12:0 3OH	7.88	ECL deviates 0.000	
2.0594	504	0.008	0.976	13.9992	14:0	0.56	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
2.3593	660	0.008	0.948	14.9992	15:0	----	ECL deviates -0.001	
2.6199	25511	0.009	0.931	15.8371	Sum In Feature 3	27.03	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6702	21890	0.009	0.928	15.9990	16:0	23.13	ECL deviates -0.001	Reference -0.006
2.7008	644	0.011	----	16.0968		----		
2.9257	647	0.013	0.917	16.8145	17:1 w8c	0.68	ECL deviates -0.001	
2.9566	2378	0.010	0.916	16.9131	17:0 cyclo	2.48	ECL deviates -0.002	
2.9842	763	0.009	0.915	17.0011	17:0	0.79	ECL deviates 0.001	Reference -0.005
3.2199	631	0.011	0.909	17.7555	Sum In Feature 5	0.65	ECL deviates 0.000	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2475	14638	0.009	0.908	17.8441	Sum In Feature 8	15.13	ECL deviates -0.003	18:1 w7c
3.2967	652	0.011	0.907	18.0015	18:0	0.67	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.4407	830	0.012	----	18.4727		----		
3.5078	627	0.009	----	18.6921		----		
3.6015	403	0.010	0.902	18.9988	19:0	0.41	ECL deviates -0.001	Reference -0.013
----	25511	----	----	----	Summed Feature 3	27.03	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	631	----	----	----	Summed Feature 5	0.65	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	14638	----	----	----	Summed Feature 8	15.13	18:1 w7c	18:1 w6c

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.129	Pseudomonas-syringae-syringae
	0.118	Pseudomonas-putida-biotype B/vancouverensis



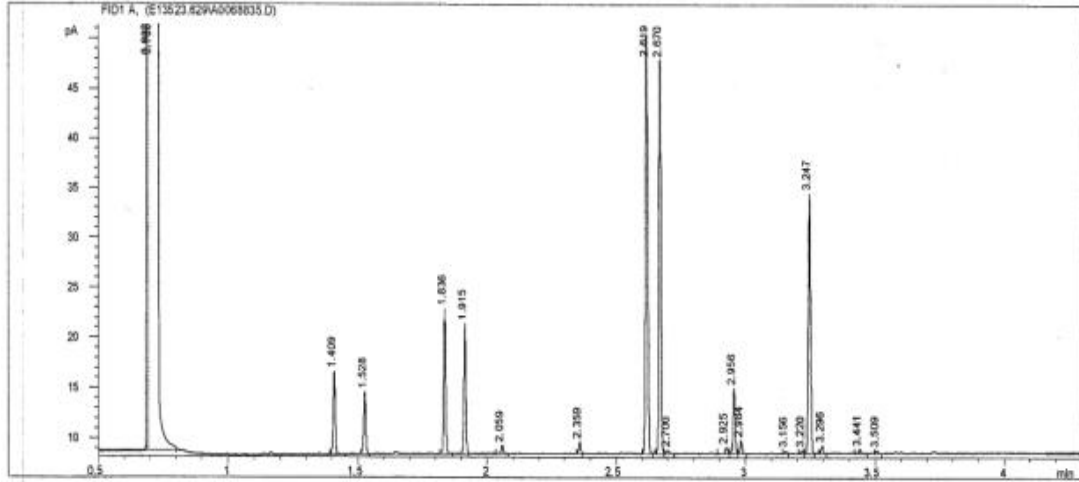
**Şekil 3.23.** Hg 10-2 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromatogramı

**Çizelge 3.14.** Hg 11-4 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6920	296252	0.004	----	6.6767		----	< min rt	
0.7000	9.515E+8	0.016	----	6.7358	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.4093	9082	0.009	1.098	11.4491	10:0 3OH	5.80	ECL deviates 0.001	
1.5277	6913	0.009	1.064	12.0000	12:0	4.28	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
1.8360	15432	0.008	1.006	13.2037	12:0 2OH	9.03	ECL deviates 0.000	
1.9147	13603	0.008	0.994	13.4842	12:0 3OH	7.87	ECL deviates 0.001	
2.0595	936	0.009	0.976	14.0000	14:0	0.53	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.3594	1317	0.009	0.948	15.0005	15:0	----	ECL deviates 0.000	
2.6192	48350	0.009	0.931	15.8362	Sum In Feature 3	26.18	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6700	44108	0.009	0.928	15.9996	16:0	23.82	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
2.7004	592	0.012	----	16.0963		----		
2.9253	909	0.010	0.917	16.8138	17:1 w8c	0.49	ECL deviates -0.001	
2.9562	7791	0.009	0.916	16.9124	17:0 cyclo	4.15	ECL deviates -0.003	
2.9838	1536	0.009	0.915	17.0007	17:0	0.82	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.1556	346	0.009	0.910	17.5501	16:0 3OH	0.18	ECL deviates 0.002	
3.2197	460	0.009	0.909	17.7552	Sum In Feature 5	0.24	ECL deviates -0.001	18:2 w6,9c/18:0 ante
3.2474	30459	0.009	0.908	17.8437	Sum In Feature 8	16.09	ECL deviates -0.004	18:1 w7c
3.2962	1007	0.010	0.907	17.9997	18:0	0.53	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
3.4410	697	0.011	----	18.4731		----		
3.5087	414	0.009	----	18.6944		----		
----	48350	---	----	----	Summed Feature 3	26.18	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	460	---	----	----	Summed Feature 5	0.24	18:0 ante/18:2 w6,9c	18:2 w6,9c/18:0 ante
----	30459	---	----	----	Summed Feature 8	16.09	18:1 w7c	18:1 w6c

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.320	Pseudomonas-putida-biotype A

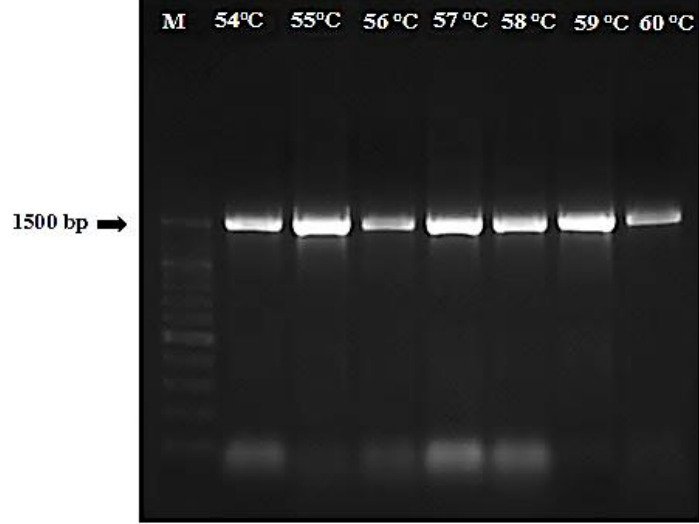


**Şekil 3.24.** Hg 11-4 suşunun FAME analiz sonucu elde edilen GC kromotogramı

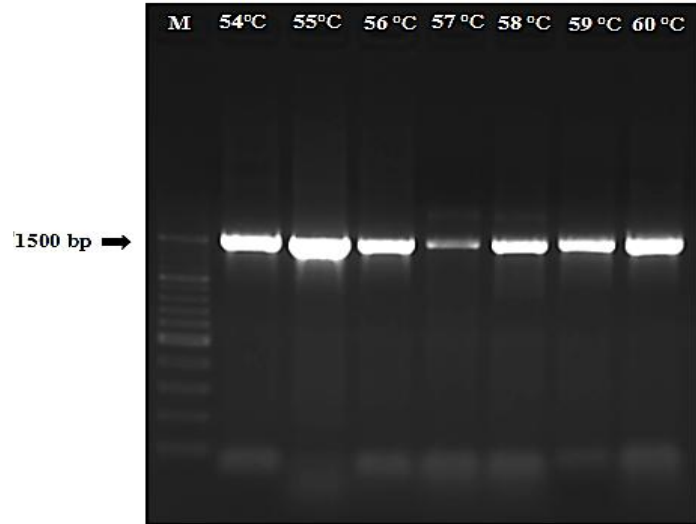
### 3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu

PZR optimizasyonunda farklı primer bağlanma sıcaklıkları ve farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları uygulanmıştır. Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının 16S rRNA bölgeleri

PCR'da çoğatıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde, PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.25 ve 3.26.'da Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarına ait en yoğun PZR ürünlerinin 55°C'de elde edildiği gösterilmektedir.

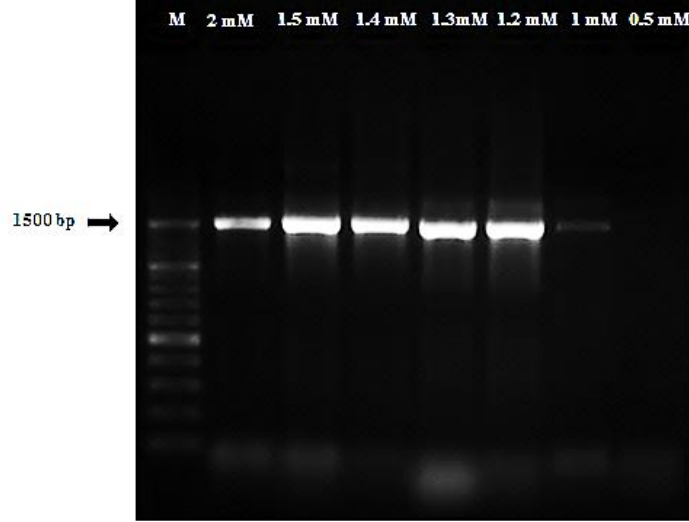


**Şekil 3.25.** Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Hg 10-2 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

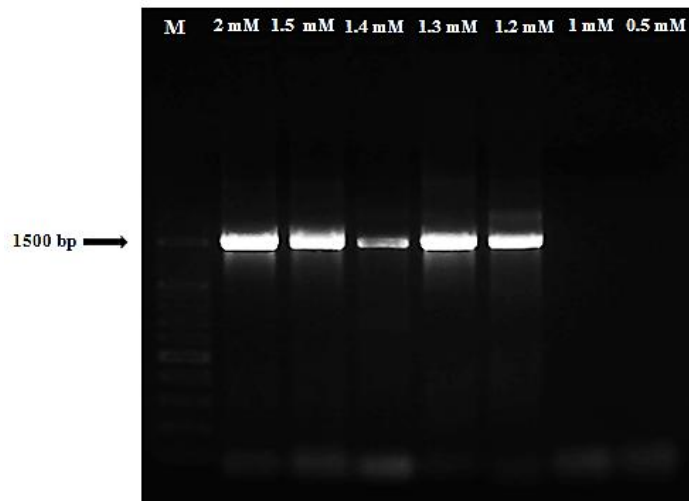


**Şekil 3.26.** Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Hg 11-4 suşlarına ait PZR ürünleri, Marker (M)

Optimum annealing sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları (0.5-2 mM aralığında) denenmiştir. Çünkü  $MgCl_2$  miktarı arttıkça ürün miktarı azalmaktadır. Şekil 3.27 ve 3.28’de görüldüğü gibi Hg 10-2 suşu için en iyi PZR ürününün, 1.4 mM içeren reaksiyon koşullarında alındığı görülürken Hg 11-4 suşu için optimum  $MgCl_2$  konsantrasyonu 1.3 mM olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.27.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Hg 10-2 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)



**Şekil 3.28.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Hg 11-4 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

### **3.2.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Hg 10-2 ve Hg 11-4 Suşlarının İdentifikasyonu**

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Hg 10-2'nin %96 oranında, Hg-11-4'ün ise %98 oranında *Pseudomonas koreensis* (accession number AF468452) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının filogenetik ağaçları, 16S rRNA sekans dizileri kullanılarak Mega 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.29.-3.30.'da görüldüğü gibi bu suşların homoloji gösterdiği ilk on bakteri ile soy ağaçları oluşturulmuştur.

#### **3.2.7.1. Filogenetik Analize Dahil Edilen Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment)**

Çalışmada, Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının 16S rRNA (EK-1. Çizelge 2 ve Çizelge 3.) bölgeleri ile gen bankasından alınan 10 bakteriye ait 16S rRNA nükleotit dizileri MEGA 5.1 programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak hizalama yapılmıştır. Hizalama sonucuna göre de filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Hg 10-2'nin 16S rRNA bölgesi için yapılan hizalama 1531 karakter matrisi ile sonuçlanmıştır. Toplam karakterlerin 1419 tanesi korunmuş, 98 tanesi değişken, 92 tanesi filogenetik olarak bilgi verici, 64 tanesinde otomorfik karakter olduğu görülmüştür (Çizelge 3.15.). Hg 11-4'ün 16S rRNA bölgesi için yapılan hizalama, 1547 karakter matrisi ile sonuçlanmıştır. Toplam karakterlerin 730 tanesi korunmuş, 788 tanesi değişken, 45 tanesi filogenetik olarak bilgi verici, 742 tanesinde otomorfik karakter olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.16.).



**Çizelge 3.15.** Hg 10-2 için gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları

<b>Karakter tipi</b>	<b>Karakter tipi sayısı/ Toplam karakter sayısı</b>	<b>Karakter tipi sayısı/Toplam karakter sayısı (%)</b>
Değişken karakter sayısı	98/1531	6.4
Korunmuş karakter sayısı	1419/1531	97.3
Filogenetik açıdan bilgi verici karakter sayısı	92/1537	2.2
Otomorfik karakter sayısı	64/1531	4.1

**Çizelge 3.16.** Hg 11-4 için gerçekleştirilen nükleotit dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları

<b>Karakter tipi</b>	<b>Karakter tipi sayısı/ Toplam karakter sayısı</b>	<b>Karakter tipi sayısı/Toplam karakter sayısı (%)</b>
Değişken karakter sayısı	788/1547	50.934
Korunmuş karakter sayısı	730/1547	47.19
Filogenetik açıdan bilgi verici karakter sayısı	45/1547	2.91
Otomorfik karakter sayısı	742/1547	47.96

Bu çalışmada, 16S rRNA baz dizileri MEGA 5.1 bilgisayar programına veri olarak yüklenerek Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarına en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA (Çizelge 3.17 ve 3.18.) bölgelerine göre hesaplanmıştır.

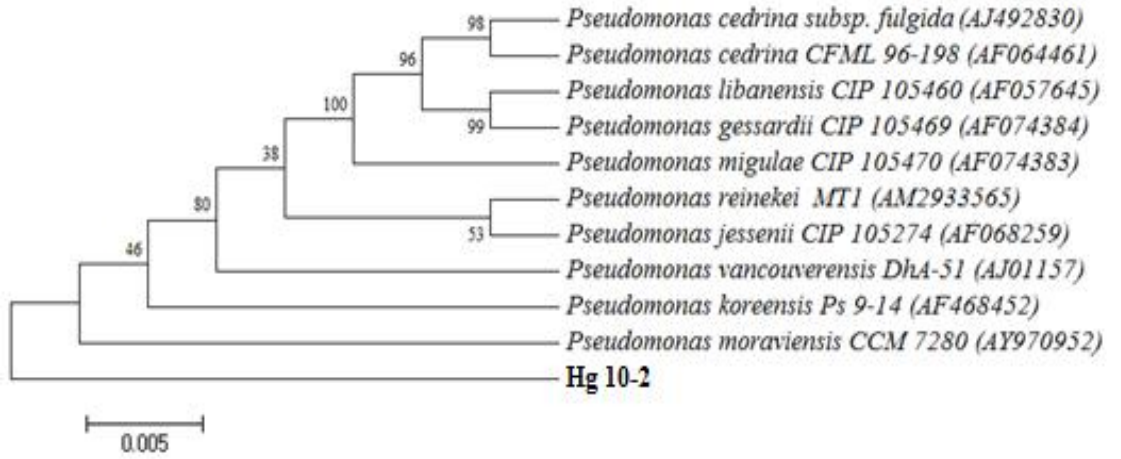
**Çizelge 3.17.** Hg 10-2 suşu için 16S rRNA dizi verileri ile gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

<b>Türler</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>1.</b> Hg 10-2	-										
<b>2.</b> <i>Pseudomonas koreensis</i>	0.042	-									
<b>3.</b> <i>Pseudomonas moraviensis</i>	0.044	0.004	-								
<b>4.</b> <i>Pseudomonas reinekei</i>	0.045	0.004	0.006	-							
<b>5.</b> <i>Pseudomonas vancouverensis</i>	0.049	0.007	0.009	0.006	-						
<b>6.</b> <i>Pseudomonas cedrina subsp.</i>	0.056	0.019	0.023	0.018	0.022	-					
<b>7.</b> <i>Pseudomonas cedrina</i>	0.057	0.018	0.022	0.018	0.021	0.001	-				
<b>8.</b> <i>Pseudomonas jessenii</i>	0.046	0.004	0.008	0.002	0.007	0.019	0.018	-			
<b>9.</b> <i>Pseudomonas libanensis</i>	0.059	0.018	0.021	0.017	0.021	0.007	0.006	0.018	-		
<b>10.</b> <i>Pseudomonas gessardii</i>	0.060	0.019	0.021	0.017	0.021	0.007	0.007	0.019	0.001	-	
<b>11.</b> <i>Pseudomonas migulae</i>	0.057	0.016	0.018	0.014	0.018	0.009	0.008	0.015	0.007	0.007	-

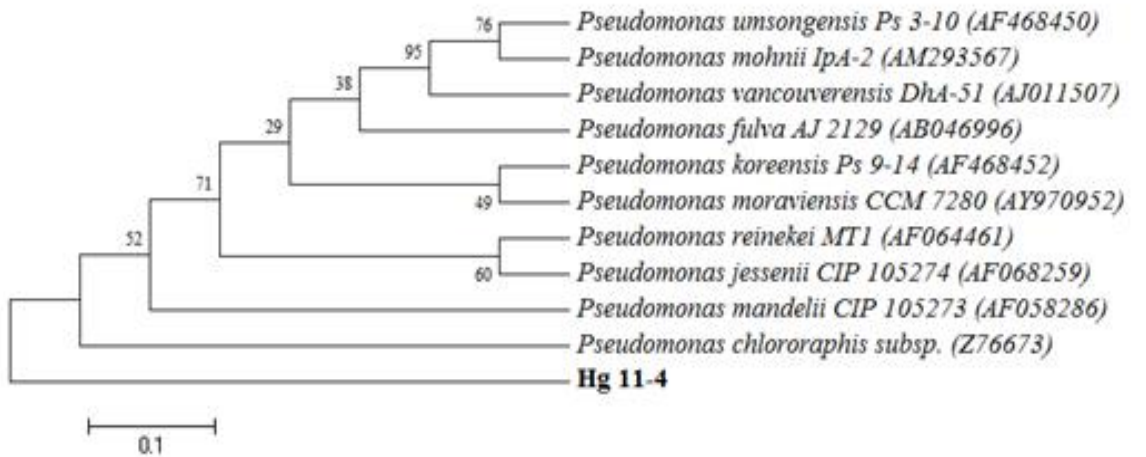
**Çizelge 3.18.** Hg 11-4 suşu için 16S rRNA dizi verileri ile gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

<b>Türler</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>1.</b> Hg 11-4	-										
<b>2.</b> <i>Pseudomonas koreensis</i>	1.074	-									
<b>3.</b> <i>Pseudomonas moraviensis</i>	1.081	0.011	-								
<b>4.</b> <i>Pseudomonas reinekei</i>	1.073	0.010	0.009	-							
<b>5.</b> <i>Pseudomonas vancouverensis</i>	1.084	0.011	0.016	0.012	-						
<b>6.</b> <i>Pseudomonas jessenii</i>	1.075	0.022	0.025	0.019	0.026	-					
<b>7.</b> <i>Pseudomonas umsongensis</i>	1.087	0.022	0.019	0.027	0.025	0.038	-				
<b>8.</b> <i>Pseudomonas mohnii</i>	1.089	0.020	0.022	0.020	0.024	0.030	0.034	-			
<b>9.</b> <i>Pseudomonas fulva</i>	1.088	0.023	0.030	0.026	0.022	0.034	0.036	0.018	-		
<b>10.</b> <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.075	0.025	0.016	0.025	0.021	0.025	0.027	0.032	0.034	-	
<b>11.</b> <i>Pseudomonas mandelii</i>	1.084	0.015	0.022	0.019	0.021	0.030	0.031	0.031	0.030	0.036	-

16S rRNA bölgelerine sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak neighbour-joining ağacı 500 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi oluşturulmuştur (Şekil 3.2.10. ve 3.2.11.) Hg 10-2 ve 11-4 tamamen ayrı bir grupta yer alırken, diğerlerinin ayrı bir grup oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre genetik olarak Hg 10-2'ye en en uzak tür *Pseudomonas gessardii* (0.060), yakın tür ise *Pseudomonas koreensis*'tir (0.042). Hg 11-4 suşuna en uzak tür *Pseudomonas mohnii* (1.089), en yakın tür ise *Pseudomonas koreensis* (1.073) olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.29.** Hg 10-2 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.005; nükleotidler arasındaki farkı ifade etmektedir.)



**Şekil 3.30.** Hg 11-4 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotidler arasındaki farkı ifade etmektedir.)

### 3.2.8. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşlarının Çoklu Metal Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

*P. koreensis* suşlarının Çizelge 3.19.'da belirtilen konsantrasyonlarda Al, Li, Ba, Pb, Ag, Ni, Sr ağır metallerine karşı çoklu direnç gösterdikleri, buna ek olarak Hg 11-4 suşunun Ba metaline karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan her iki suşun da Cr, Mn, Co, Fe, Cu, Sn, Zn, Sb ve Cd metallerine karşı kullanılan konsantrasyonlarda duyarlı oldukları belirlenmiştir.

**Çizelge 3.19.** *P. koreensis* suşlarının çoklu metal direnç profilleri

Ağır Metal	Konsantrasyon (mg/L)	<i>P. koreensis</i> (Hg 10-2 suşu)	<i>P. koreensis</i> (Hg 11-4 suşu)
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	R	R
LiCl	5000	R	R
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	R	S
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9H <sub>2</sub> O	1050	S	S
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1000	S	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	R	R
Co(NO <sub>3</sub> ) 6H <sub>2</sub> O	750	S	S
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	450	S	S
AgNO <sub>3</sub>	15	R	R
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	S	S
K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 0.5H <sub>2</sub> O	1400	S	S
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	160	S	S
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	395	R	R
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	S	S
Cd(NO <sub>3</sub> ) 4H <sub>2</sub> O	900	S	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R	S

(S); duyarlı, (R); dirençli

### **3.2.9. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi**

Çizelge 3.20.'de belirtildiği gibi *P. koreensis* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ve kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonları verilmiştir. *P. koreensis* suşlarının,  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerden ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, oksasiline ve penisiline, aminoglikozidlerden netilmisin ve tobramisine, sülfonamid grubundan trimethoprim sülfametoksazol, polipeptidlerden basitrasine, makrolidlerden eritromisine ve glikopeptid grubundan vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları, kuinolonlar, sefalosporin, poliketid ve amfenikol grubundan olan antibiyotiklere ise duyarlı oldukları belirlenmiştir. Diğer taraftan  $\beta$ -laktam grubundan tikarsilin/klavulanik asit ve rifamisin grubundan rifampin antibiyotiğine karşı dirençliliğinin sadece *P. koreensis* Hg 10-2 suşunda olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 3.20.** *P. koreensis* suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>	<b><i>P. koreensis</i> (Hg 10-2 suşu)</b>	<b><i>P. koreensis</i> (Hg 11-4 suşu)</b>
<b><u>β-laktamlar</u></b>			
Ampisilin, AMP	10	R	R
Amoksisilin-Klavulanik asit, AMC/CA	20/10	R	R
Oksasilin, OXA	1	R	R
Penisilin, PEN	10	R	R
Tikarsilin, TIC	75	S	S
Tikarsilin - Klavulanik asit, TIM	75/10	R	S
<b><u>Aminoglikozidler</u></b>			
Amikasin, AMK	30	S	S
Gentamisin, GEN	10	S	S
Netilmisin, NET	30	R	R
Tobramisin, TOB	10	R	R
<b><u>Kuinolonlar</u></b>			
Siprofloksasin, CIP	5	S	S
Pefloksasin, PEF	5	S	S
<b><u>Sephalosporinler</u></b>			
Aztreonam, ATM	30	S	S
Sefepim, FEP	5	S	S
Seftazidim, CAZ	30	S	S
Sulbaktam /Sefoperazon, CFP	75/30	S	S
<b><u>Sülfonamidler</u></b>			
Trimetoprim-Sülfametoksazol, SXT	25	R	R
<b><u>Polipeptidler</u></b>			
Basitrasin, BAC	10	R	R
<b><u>Poliketidler</u></b>			
Tetrasiklin, TET	30	S	S
<b><u>Makrolidler</u></b>			
Eritromisin, ERY	15	R	R
<b><u>Rifamisinler</u></b>			
Rifampin, RIF	5	R	S
<b><u>Glikopeptidler</u></b>			
Vankomisin, VAN	30	R	R
<b><u>Amfenikoller</u></b>			
Kloramfenikol (C)	30	S	S

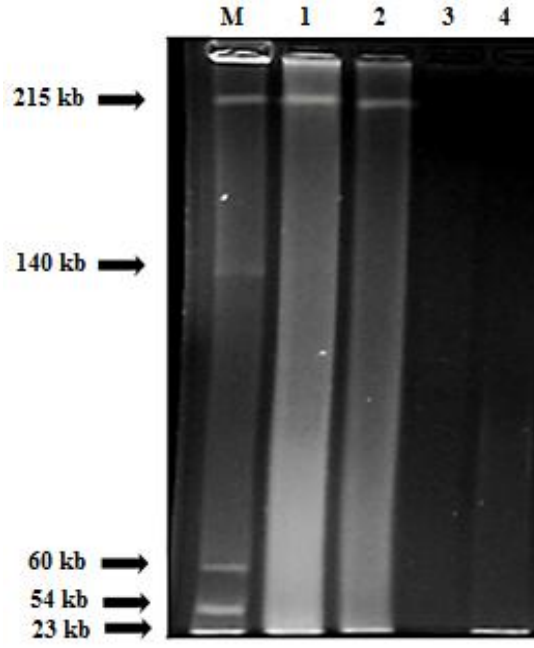
(S); duyarlı, (R); dirençli

### 3.2.10. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşlarının DNA Analizi

İzole edilen *P. koreensis* suşlarının Hg'ye karşı dirençlilik genlerinin lokasyonunu belirlemek amacıyla DNA analizi yapılmıştır. Marker olarak kullanılan *A. tumefaciens* C58C1 ile Hg dirençli suşlardan izole edilen plazmitlerin molekül ağırlıkları ve lokasyonları, Şekil 3.31 ve 3.32.'de görüldüğü gibi belirlenmiştir. Hg içeren ortamda üretilen her iki *P. koreensis* suşundan 215 kb boyutunda plazmit izole edilmiştir. Plazmit profilleri belirlenen farklı bölgelerden izole edilen Hg dirençli suşların Hg dirençliliğinin plazmit ile ilişkisini belirlemek için farklı eliminasyon sıcaklıklarında üretilip plazmit izolasyonları yapılmıştır. Eliminasyon sıcaklıkları Hg 10-2 için 38°C ve Hg 11-4 için 40°C olarak belirlenmiştir. *P. koreensis* suşları 48 saat inkübe edildikten sonra plazmit izolasyonları yapılmıştır. Hg içeren besiyerinde üremedikleri test edilen bu suşların antibiyotik direnç profillerindeki değişiklik kontrol edilmiştir.

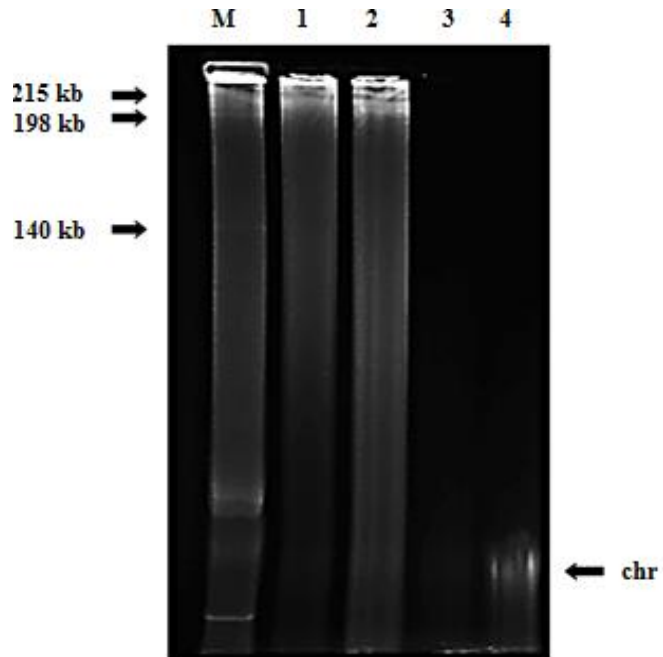
*P. koreensis* Hg 10-2 suşunun eliminasyon analizi sonucunda, Hg içeren besiyerinde üreyemediği ve Hg direnç genlerinin 215 kb boyutundaki plazmit ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Hg 10-2 suşunun amoksisilin, ampisilin, basitrasin, oksasilin, rifampin, penisilin, vankomisine ve eritromisin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği tespit edilmiştir. *P. koreensis* Hg 11-4 suşunun eliminasyon analizi sonucunda Hg 10-2 gibi Hg içeren besiyerinde üreyemediği, amoksisilin, ampisilin ve eritromisin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği belirlenmiştir. Her iki *P. koreensis* suşu için Hg ve bu antibiyotiklere karşı direnç genlerinin, elimine olan 215 kb'lik plazmitler üzerinde kodlandığı belirlenmiştir.





**Şekil 3.31.** *P. korensis* Hg 10-2 suşunun plazmit profili

Marker (M); *A. tumafaciens*, (1); Hg içermeyen, (2); Hg içeren ortam, (3); plazmit eliminasyonu, (4); Kromozomal DNA (chr)

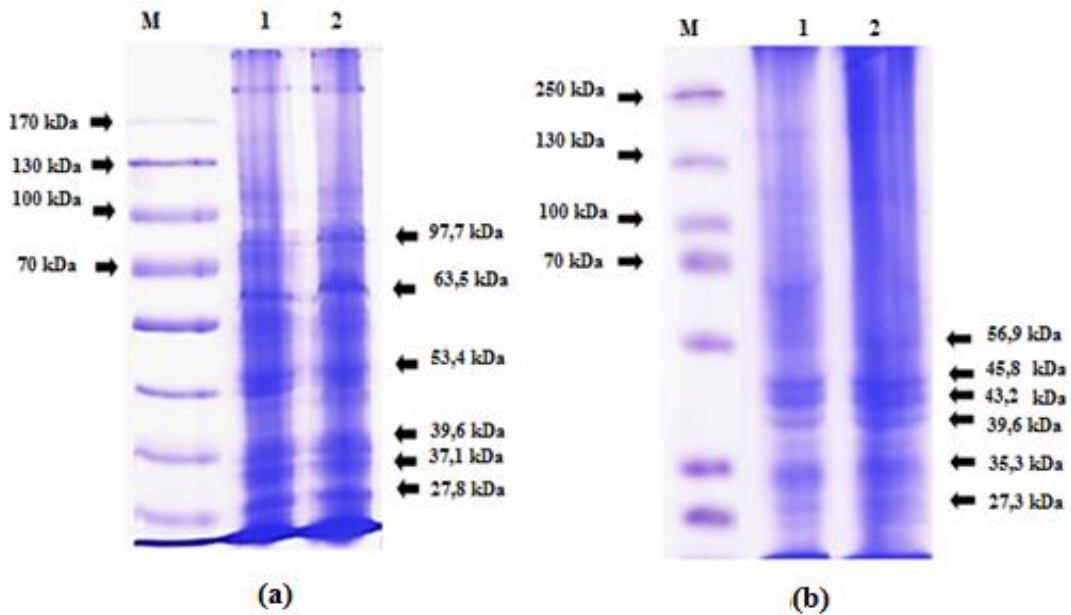


**Şekil 3.32.** *P. korensis* Hg 11-4 suşunun plazmit profili

Marker (M); *A. tumafaciens*, (1); Hg içermeyen, (2); Hg içeren ortam, (3); plazmit eliminasyonu, (4); Kromozomal DNA (chr)

### 3.2.11. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşlarının Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi

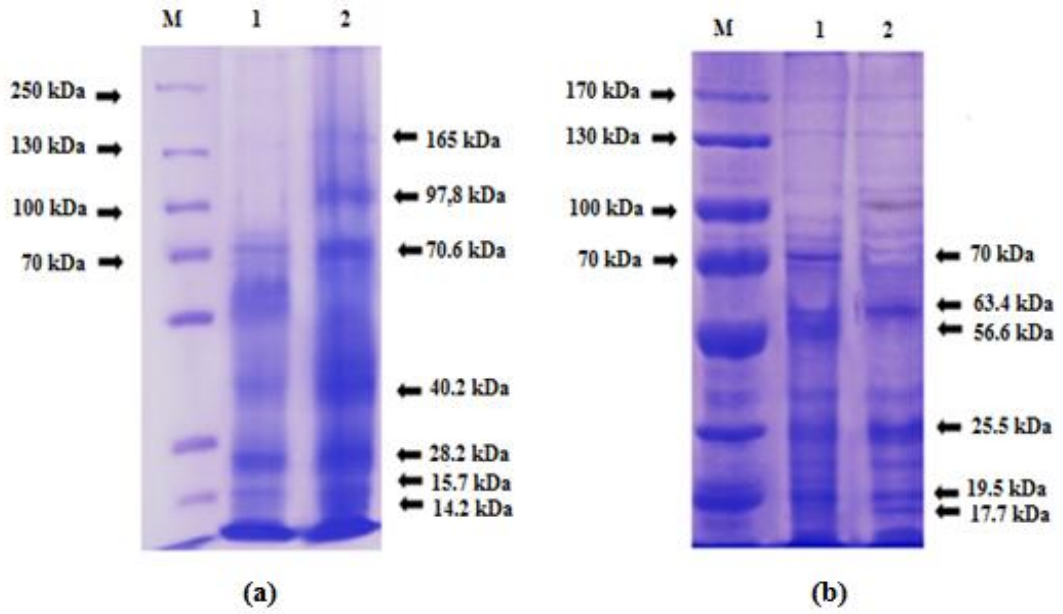
*P. koreensis* Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının Hg içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Şekil 3.33.a.'da görüldüğü gibi Hg 10-2 için total protein ekspresyonu sonucunda Hg içeren ortamda 97.7, 63.5 ve 53.4 kDa boyutlarında olan bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.71, 1.72, 2.07 kat artış olduğu tespit edilmiştir. 39.6, 37.1 ve 27.8 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda ise sırasıyla 1.4, 1.3 ve 1.5 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.33.b.'de dış membran protein ekspresyonu sonucunda Hg içeren ortamda 56.9, 45.8, 43.2, 39.6 35.3 ve 27.3 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.34, 1.08, 1.01, 1.5, 1.1 ve 2.47 kat artış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.33. *P. koreensis* Hg 10-2 suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri

Marker (M); Protein Weight Marker Prestained Protein Ladder, (1); Hg içermeyen, (2); Hg içeren ortam

Şekil 3.34.a.'da Hg 11-4 için total protein ekspresyonu sonrasında Hg içeren ortamda 70.6, 40.2, 28.2,15.7 ve 14.2 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda da sırasıyla 1.71, 1.46, 1.22 ve 1.07 kat artış olduğu görülmüştür. Şekil 3.34.b.'de Hg 11-4 suşunun dış membran protein ekspresyonu sonrasında Hg içeren ortamda 25.8 ve 19.5 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 2.38 ve 1.11 kat artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *P. koreensis* suşlarının Hg dirençliliğinde her iki tip proteinin de etkin rol aldığı görülmüştür.



**Şekil 3.34.** *P. koreensis* Hg 11-4 suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri  
 Marker (M); Protein Weight Marker Prestained Protein Ladder, (1); Hg içermeyen, (2); Hg içeren ortam

### 3.2.12. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşunun Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi

*In situ* uygulamada hedef olan hücreler ile hibridizasyonu gerçekleştirmek için, pozitif kontrol olarak EUB338 (Bact338), EUB338 II (SBACT P 338), EUB338 III (SBACT V 338) probları, negatif kontrol olarak NONEUB (NON338-Non-bact338) ve *P. koreensis* için de Pchl454 FITC işaretli probları ile kullanılarak optimizasyon

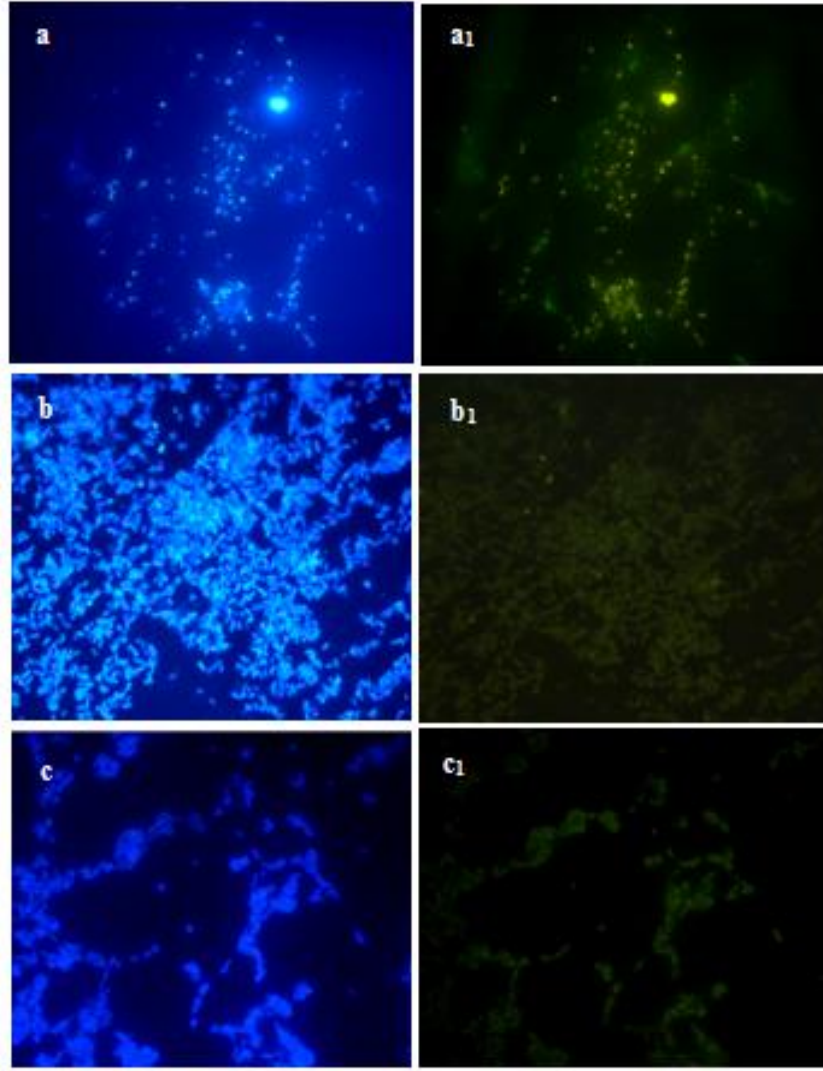
çalışmaları yapılmıştır. Optimum hibridizasyon koşullarını bulmak için referans suş kullanılarak değişik formamid/NaCl konsantrasyonlarında hibridizasyon çalışmaları yapılmıştır. *E. coli* DH5 $\alpha$ , tüm FISH uygulamalarında negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda Çizelge 3.21.'de belirtildiği gibi, pozitif kontrol EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri, negatif kontrol probu NONEUB ile hibridizasyon oranları sırasıyla %93.9 $\pm$ 0.97, %2.22 $\pm$ 0.37 ve %1.42 $\pm$ 0.26 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.35.).

**Çizelge 3.21.** Hg dirençli *P. koreensis* suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları

Kontrol Problemleri	Formamid (%) <sup>a</sup>	NaCl (mM) <sup>b</sup>	Hibridizasyon oranı (%)
Pozitif kontrol (EUB 338, II, III)	30	102	93.9 $\pm$ 0.97
Negatif kontrol (NONEUB338)	0	0.9	2.22 $\pm$ 0.37
Negatif kontrol ( <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ )	30	100	1.42 $\pm$ 0.26

<sup>a</sup> hibridizasyon çözeltisinde formamid konsantrasyonu.

<sup>b</sup> yıkama çözeltisinde NaCl konsantrasyonu  
( $\pm$ ); standart sapma



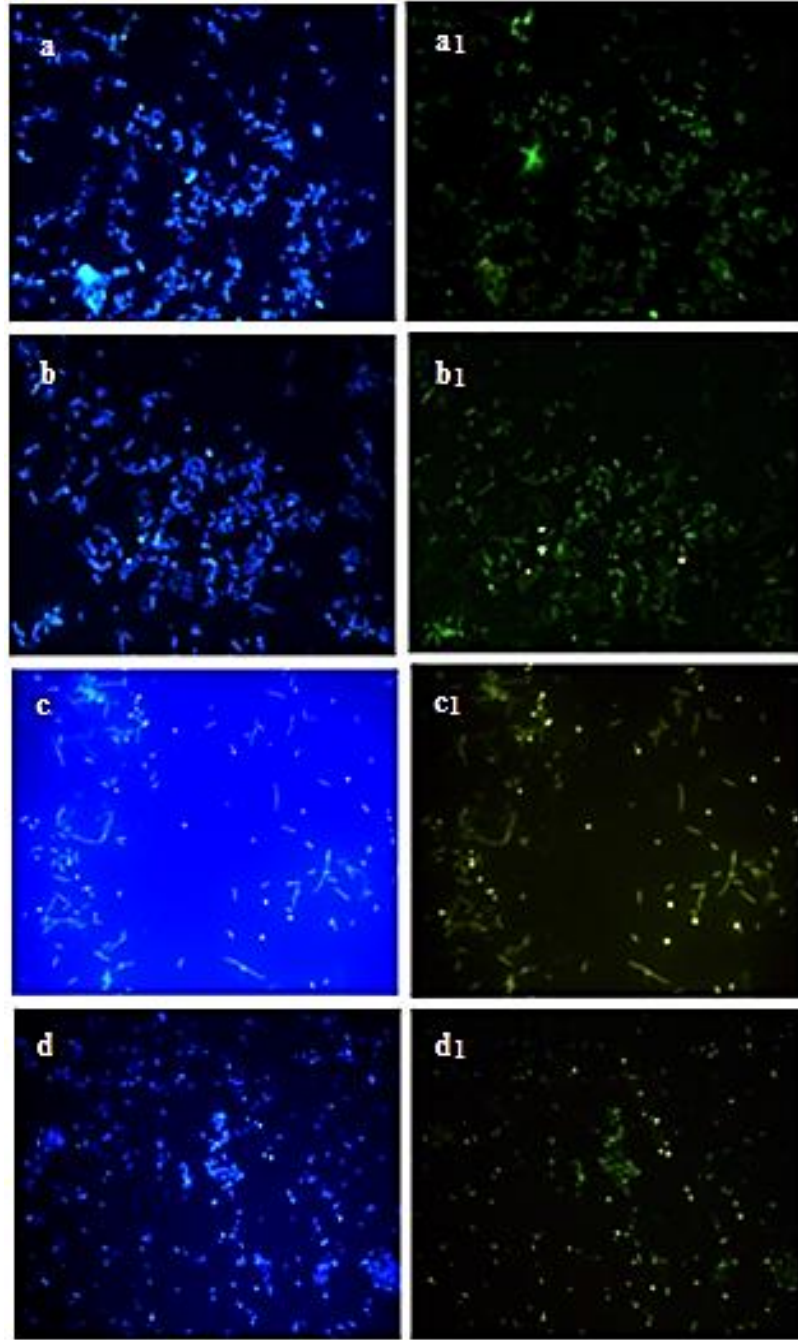
**Şekil 3.35.** EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a<sub>1</sub>), NONEUB negatif kontrol (b-b<sub>1</sub>), *E. coli* DH5α (c-c<sub>1</sub>) ile hibridizasyon

Çizelge 3.22.'de ve Şekil 3.36 ve 3.37.'de görüldüğü gibi Pchl454 probu için optimum düzey ve stabilitede hibridizasyonun gerçekleşmesi için uygulanan hibridizasyon solüsyonunda formamid konsantrasyonu %35 olup hibridizasyon oranı  $85.5 \pm 0.47$  olarak belirlenmiştir.

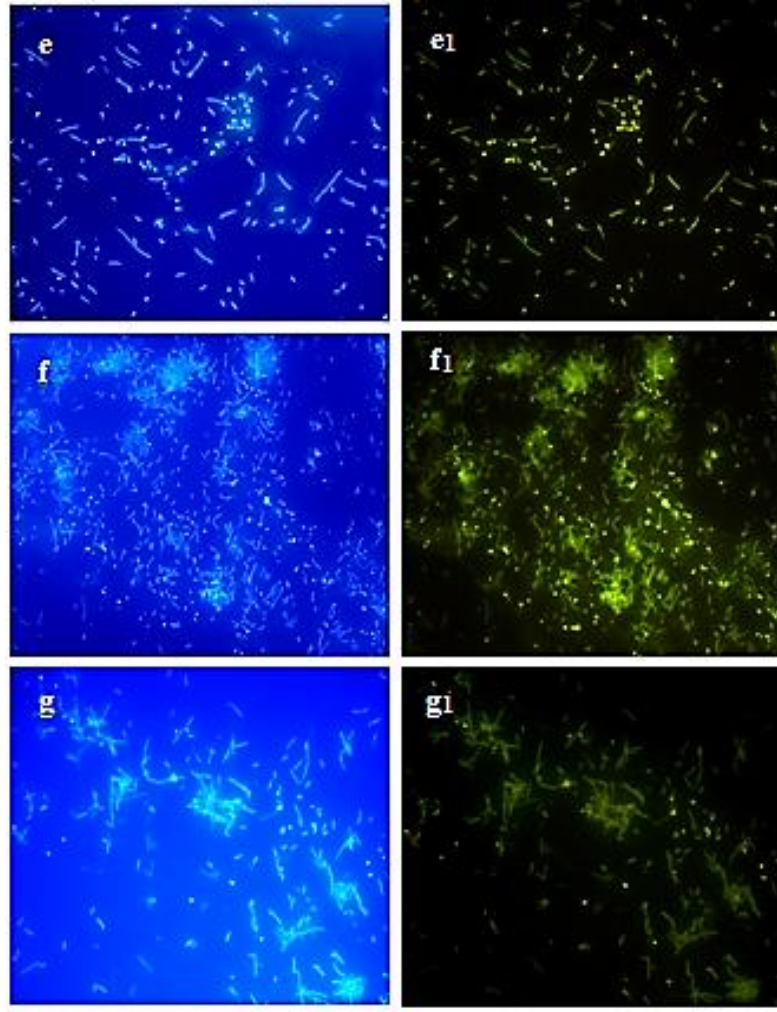
**Çizelge 3.22.** Değişen formamid konsantrasyonlarında Hg dirençli *P. koreensis* suşunun % hibridizasyon oranları

Formamid konsantrasyonu (%)	Hibridizasyon oranı (%)
10	$19.5 \pm 0.38$
15	$24.4 \pm 0.62$
20	$46.4 \pm 0.62$
25	$50.1 \pm 0.61$
30	$72.1 \pm 0.36$
35	$85.5 \pm 0.47$
40	$62.5 \pm 0.75$

(±); standart sapma



**Şekil 3.36.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a<sub>1</sub>), %15 (b-b<sub>1</sub>), %20 (c-c<sub>1</sub>), %25 (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



**Şekil 3.37.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e<sub>1</sub>), %35 (f-f<sub>1</sub>), %40 (g-g<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

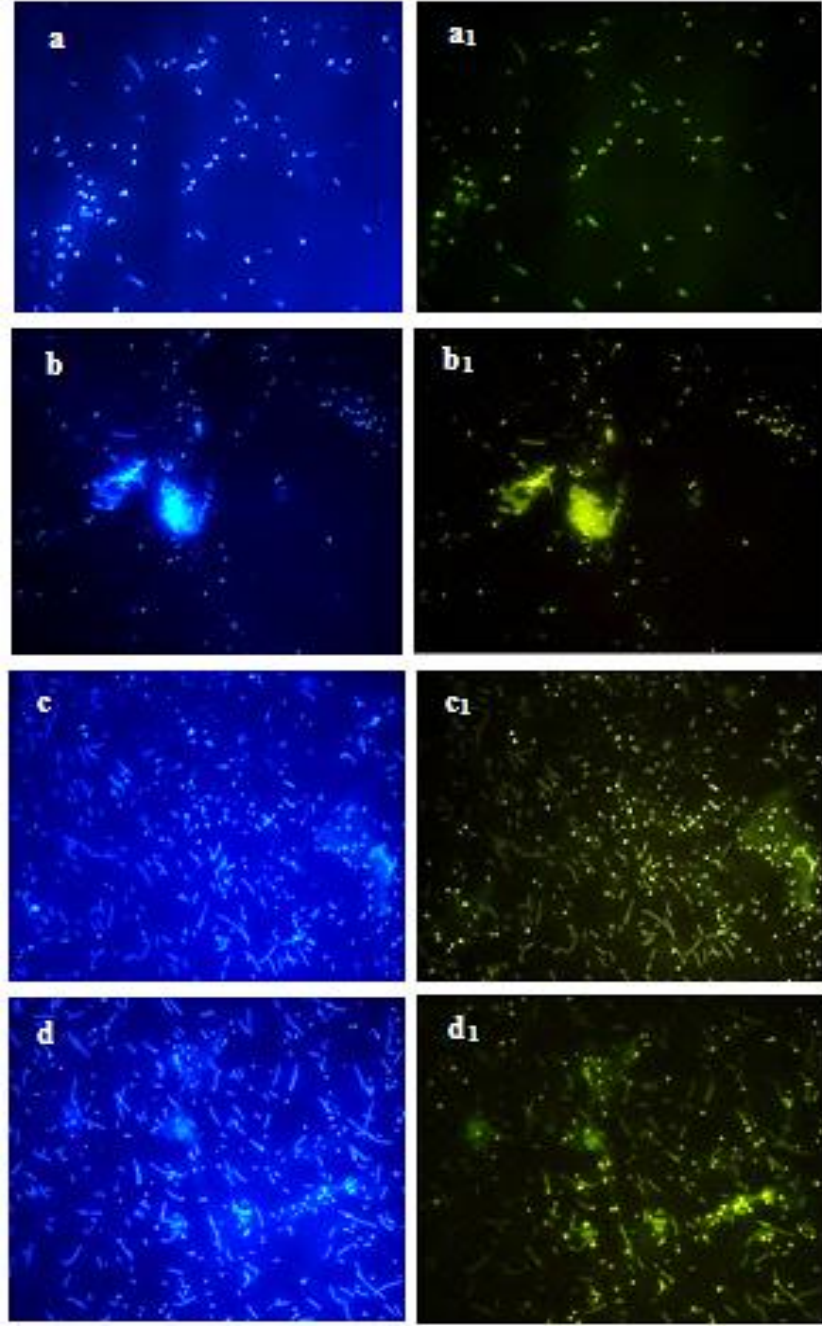


Formamid konsantrasyonu belirlendikten Çizelge 3.22.'de belirtildiği gibi yıkama solüsyonundaki NaCl konsantrasyonu 97 mM olup olarak belirlenmiştir (Şekil 3.38, 3.39 ve 3.40.). Belirlenen bu koşullarda su örneklerinde hibridizasyon çalışmaları yapılarak Kızılırmak'tan izole edilen Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yayılımını mevsimsel olarak belirlenmiştir.

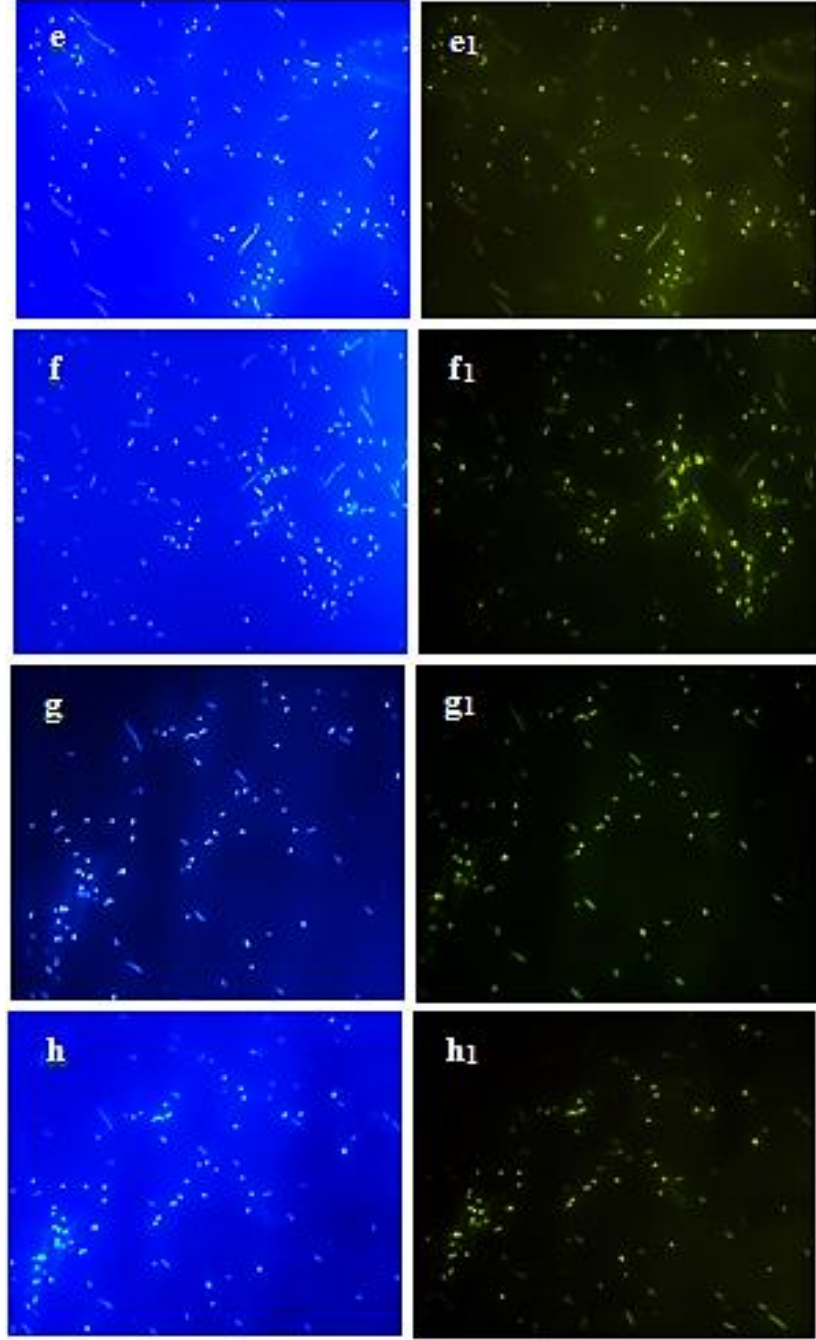
**Çizelge 3.22.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında Hg dirençli *P. koreensis* suşunun % hibridizasyon oranları

NaCl konsantrasyonu (mM)	Hibridizasyon oranı (%)
95	84.2±0.45
96	83.9±1.02
97	86.3±0.76
98	81.6±0.07
99	82.0±1.82
100	81.3±1.09
101	80.9±0.47
102	79.2±0.57
103	79.1±0.79
104	78.8±0.77

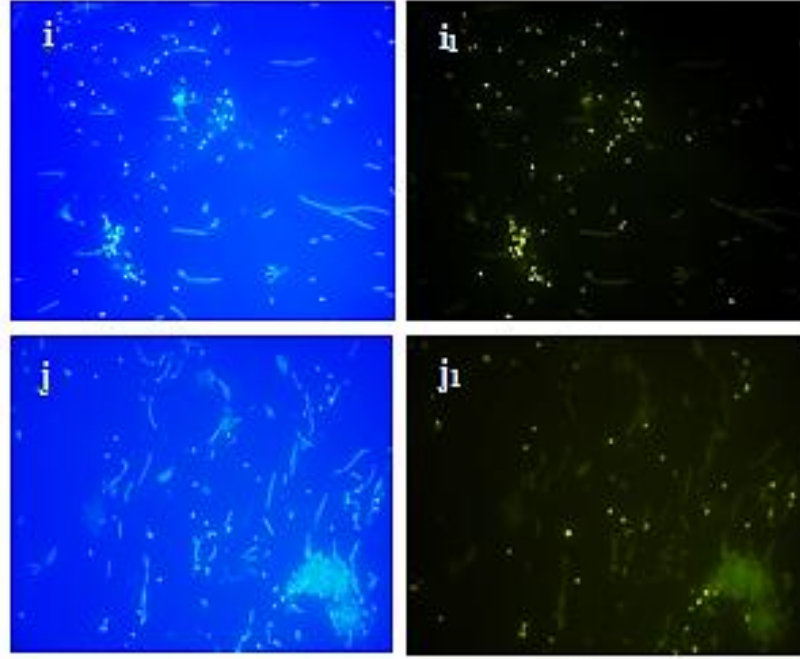
(±); standart sapma



**Şekil 3.38.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a<sub>1</sub>) , 96 mM (b-b<sub>1</sub>), 97 mM (c-c<sub>1</sub>), 98 mM (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



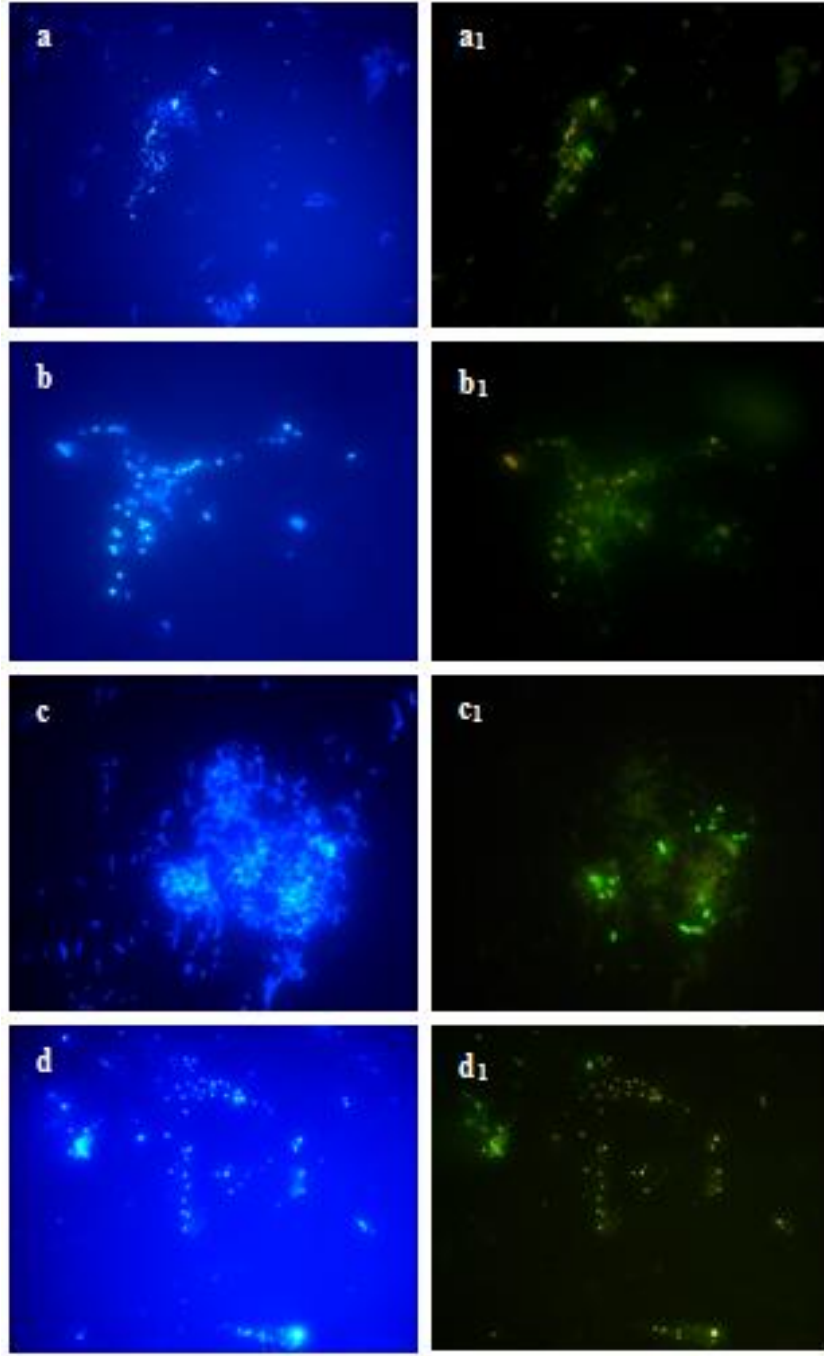
**Şekil 3.39.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e<sub>1</sub>), 100 mM (f-f<sub>1</sub>), 101 mM (g-g<sub>1</sub>), 102 mM (h-h<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



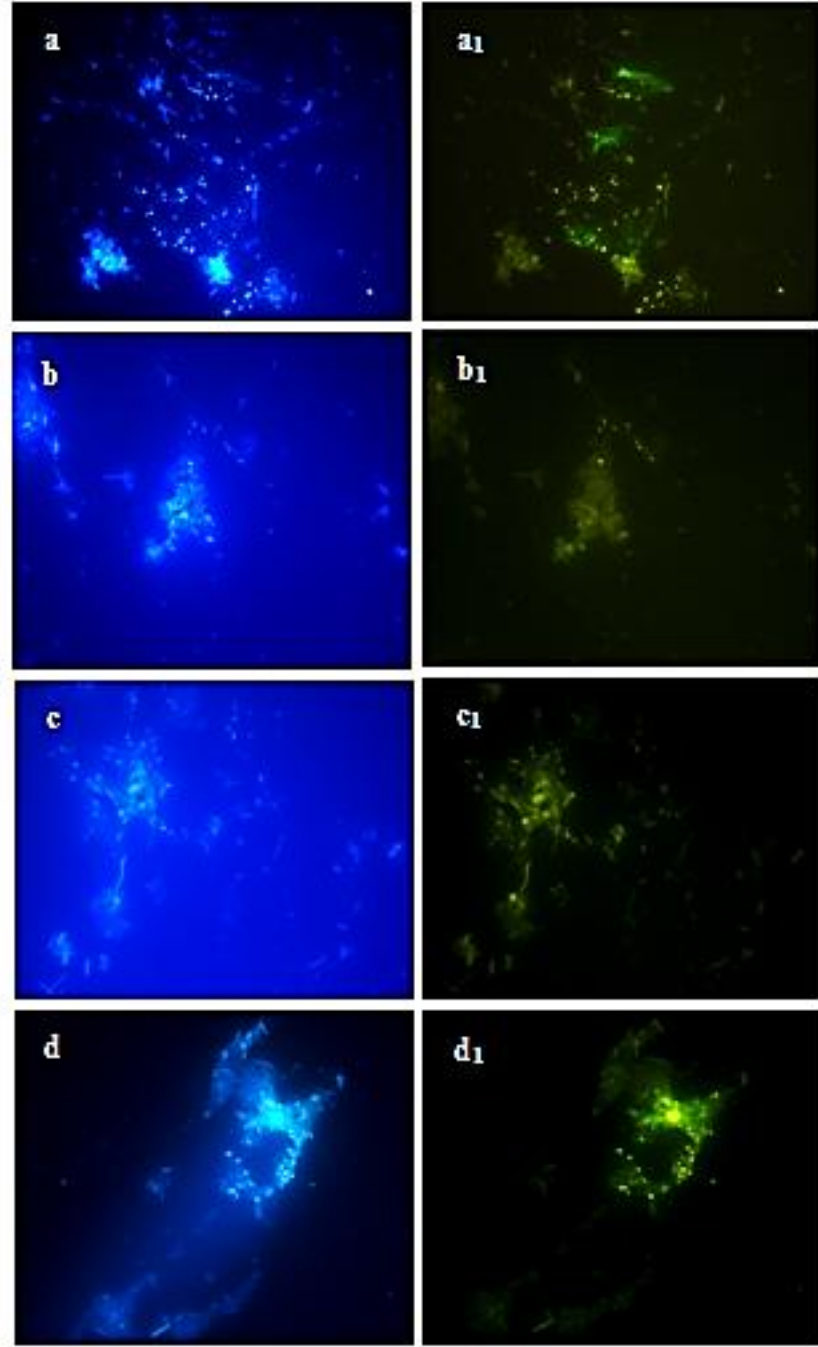
**Şekil 3.40.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i<sub>1</sub>), 104 mM (j-j<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

### 3.2.13. Civa Dirençli *Pseudomonas koreensis* Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı

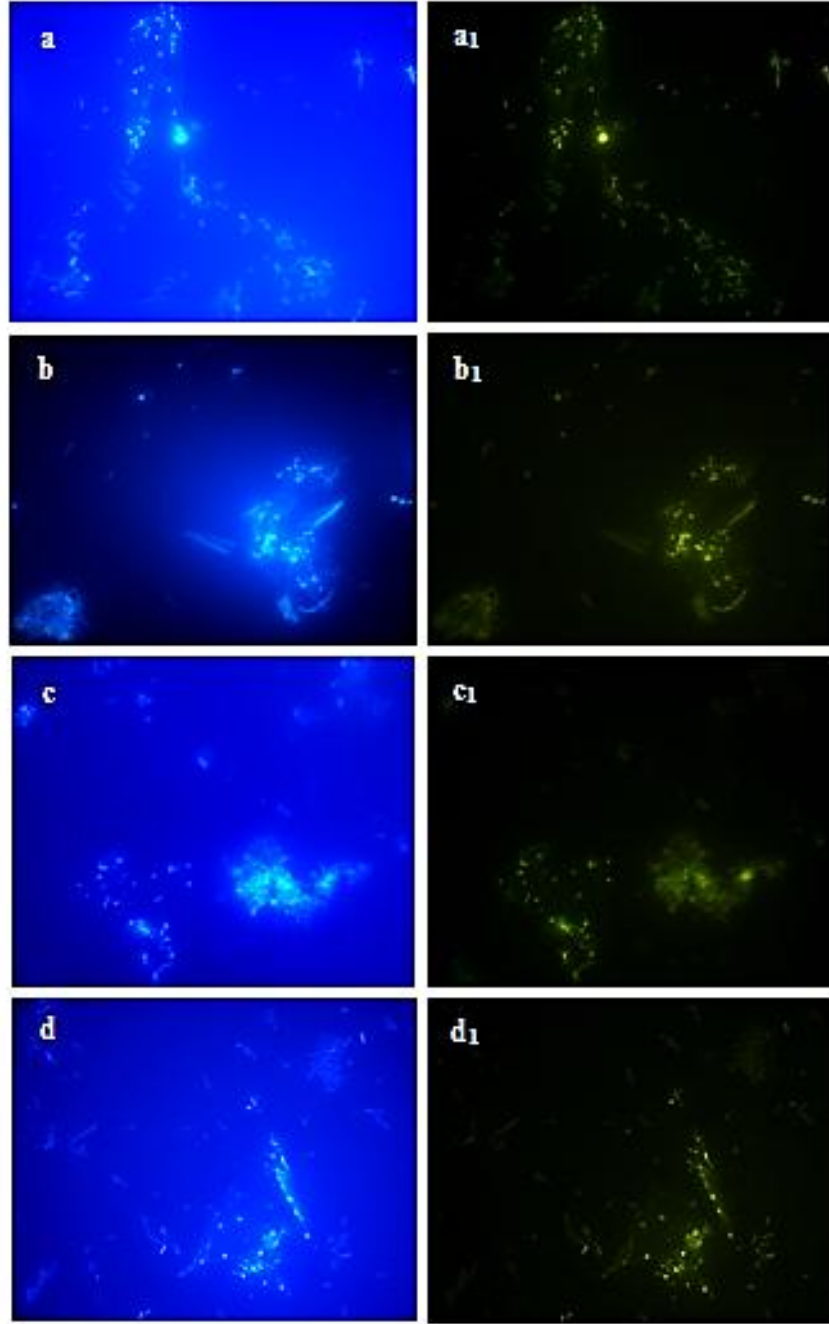
Şekil 3.41, 3.42 ve 3.43.'te görüldüğü gibi Pchl454 probu için belirlenen optimum koşullarda (%35 formamid ve 97 mM NaCl), 2010 Ocak-2012 Ekim tarihleri arasında üçer aylık periyotlarla toplanmış ve fikse edilmiş olan su örnekleri kullanılarak Hg dirençli *P. koreensis* suşunun mevsimsel populasyon yayılım profili çıkarılmıştır. Şekil 3.45.'te verilen grafikte FITC işaretli Pchl454 probu ile hibridize olan *P. koreensis* suşunun biyokütle yüzdeleri (%) belirtilmiştir.



**Şekil 3.41.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

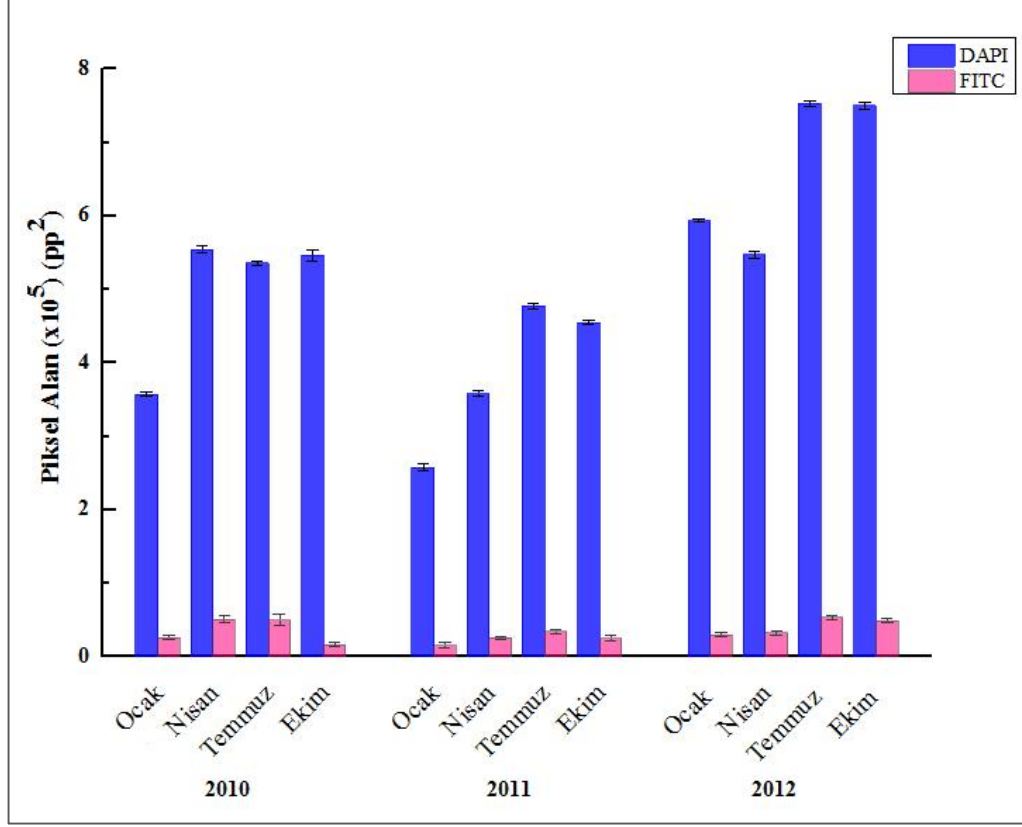


**Şekil 3.42.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi



**Şekil 3.43.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğu (%) DAPI ve Pchl454 probu ile hibridize olan bu suşun FITC görüntülerinin piksel alanları ( $pp^2$ ) ve standart sapma değerleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.44.).



**Şekil 3.44.** 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Hg dirençli *P. koreensis* suşunun populasyon yayılımı ( $pp^2$ ) (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2010 Nisan ayında hem toplam bakteri ( $5.54 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5 pp^2$ ) ve *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.51 \times 10^5 \pm 0.04 \times 10^5 pp^2$ ) en fazla olduğu görülmüştür. Ekim ayında ise *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.17 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5 pp^2$ ) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

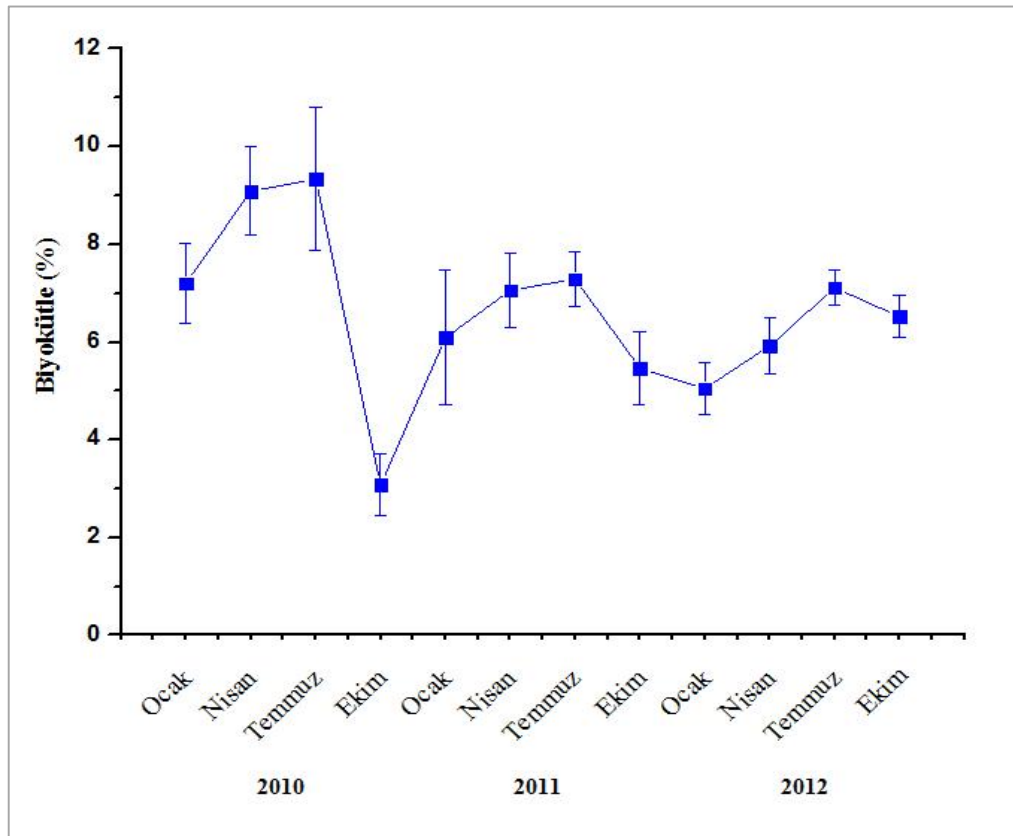
2011 Temmuz ayında toplam bakteri ( $4.78 \times 10^5 \pm 0.04 \times 10^5 pp^2$ ) ve *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunda ( $0.35 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5 pp^2$ ) artış görülmüştür. Ocak



ayında *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.16 \times 10^5 \pm 0.04 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

2011 yılında olduğu gibi yine 2012 Temmuz ayında da toplam bakteri ( $7.53 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) ve *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunda ( $0.54 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) artış görülmüştür. Ocak ayında *P. koreensis* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.30 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

FITC ile işaretli Pchl454 probu ile hibridize olan *P. koreensis* suşunun toplam biyokütledeki yüzdeleri (%), piksel alan grafiğine dayanarak çizilen 2010-2012 yılı mevsimsel yayılım grafiği Şekil 3.45.'te verilmiştir.



**Şekil 3.45.** Hg dirençli *P. koreensis* suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2010 yılı *P. koreensis* suşunun ortalama yoğunluğu Ocak ayında %7.20±0.83, Nisan ayında %9.09±0.91, Temmuz ayında %9.34±1.45 ve Ekim ayında %3.07±0.63 olarak belirlenmiştir. Ocaktan, Nisan ayına geçerken gözlenen ortalama *P. koreensis* yoğunlukları arasındaki artışın ve Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen ortalama azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Nisan ayından Temmuz ayına geçerken gözlenen artışın ise anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) belirlenmiştir.

2011 yılı *P. koreensis* suşunun ortalama yoğunluğu Ocak ayında %6.09±1.38, Nisan ayında %7.06±0.75, Temmuz ayında %7.29±0.57 ve Ekim ayında %5.47±0.75 olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında gözlenen ortalama *P. koreensis* yoğunlukları arasındaki artışın anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) ve Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen ortalama azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p<0.05$ ) belirlenmiştir.

2012 yılı *P. koreensis* suşunun ortalama yoğunluğu Ocak ayında %5.05±0.52, Nisan ayında %5.93±0.59, Temmuz ayında %7.12±0.36 ve Ekim ayında %6.52±0.43 olarak belirlenmiştir. Ocaktan, Nisan ve Temmuz aylarına geçerken ve Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen ortalama artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Temmuzdan Ekim ayına geçerken gözlenen azalışın ise anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) belirlenmiştir.

Yapılan ANOVA testi neticesinde 2010, 2011 ve 2012 yılı içerisinde Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında gözlenen ortalama Hg dirençli *P. koreensis* populasyon yayılımlarının eşit olmadığı ( $p<0.001$ ) belirlenmiştir. Ayrıca bu üç yıl için uygulanan Shapiro-Wilk istatistiksel analiz testine göre *P. koreensis* verilerin normal dağılım ( $p<0.05$ ) gösterdiği görülmüştür.

### 3.3. Bölüm 3

#### 3.3.1. Antimon Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Maksimum Tolere Edilebilen Antimon Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Sb dirençli bakterilerin seçimi için belirli konsantrasyonda  $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0.5H_2O$  (100 mg/L) içeren nutrient agar ortamları hazırlanmış ve alınan su örneklerinden belirli dilüsyonlarda ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyeler, ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiş ve 1, 2, 4, 10 ve 11. bölgelerden antimon dirençli 11 suş izole edilmiştir. Çizelge 3.24.'te gösterildiği gibi bu 11 izolattan sadece Sb 01-01 olarak kodlanan suşun, 1400 mg/L  $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0.5H_2O$  konsantrasyonunda üreyebildiği MTK değeri olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, Sb direnci yüksek olan bu izolat kullanılmıştır. Sb 01-01'in stok kültürleri hazırlanmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere  $+4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.24.** Sb dirençli bakteriler için belirlenen MTK değerleri

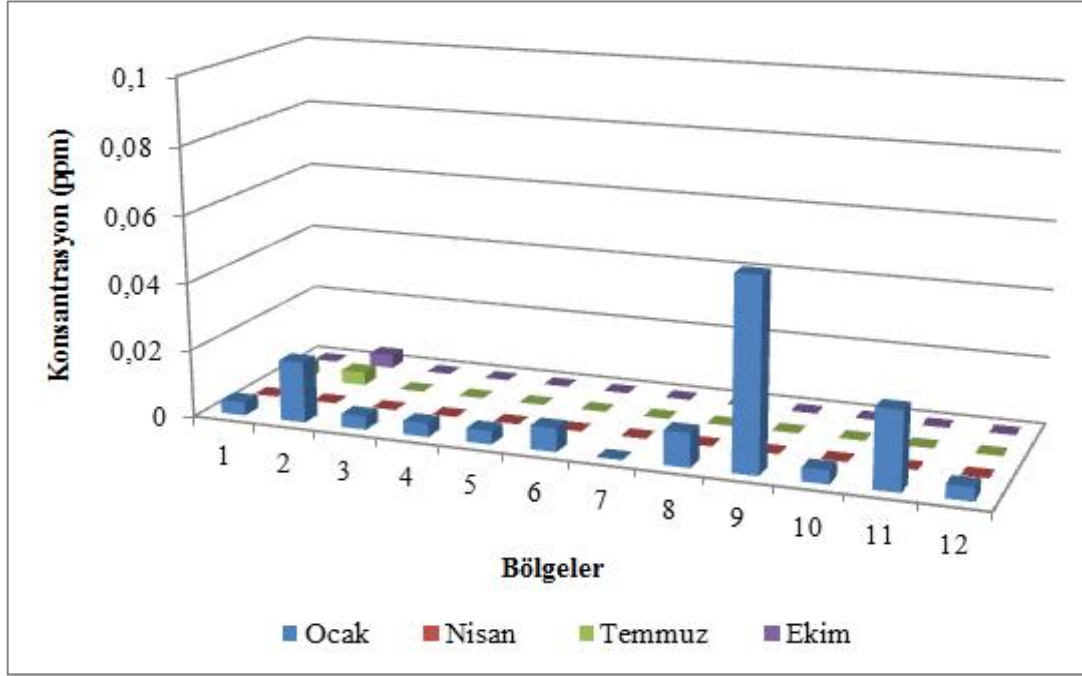
Bölge-İzolat	Sb (mg/L)								
	100	250	500	750	1000	1200	1300	1400	1500
01-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
01-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
04-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
04-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
04-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(+); üreme var, (-); üreme yok

#### 3.3.2. Su örneklerinde ICP-MS ile Antimon Analizi

Şekil 3.47.'de belirtildiği gibi 2010-2011 dönemlerinde mevsimsel periyotlarla Kırıkkale-Kızılırmak'tan alınan su örneklerinde ICP-MS ile yapılan analiz

sonuçlarına göre en yüksek antimon konsantrasyonu sadece Ocak ayında 2, 9 ve 11. bölgelerde sırasıyla 0.018, 0.056 ve 0.023 ppm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.47. 2010-2011 dönemi ICP-MS ile yapılan antimon analiz sonuçları

### 3.3.3. Antimon Dirençli Suşun Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

En yüksek Sb (1400 mg/L) konsantrasyonlarında üreyebilen Sb 01-01 olarak kodlanan izolatanın biyokimyasal özellikleri (API 20NE) Çizelge 3.25.'te verilmiştir. Sb 01-01 suşunun beyaz renkli, gram negatif basil olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucu katalaz, sitrat, glukonat, L-ramnoz ve laktik asit testleri pozitif, üreaz, oksidaz, kazein, jelatin, indol, nişasta, laktoz, glukoz, inositol, L-arabinoz, fruktoz, sodyum malonat, maltoz, glikojen, ksiloz, sukroz, lizin dekarboksilaz, betagalaktosidaz, ornithin dekarboksilaz, N-asetilglukozamin, trozin, eskülin, polimiksin B, H<sub>2</sub>S ve nitrat redüksiyon testleri ise negatif olarak tespit edilmiştir.

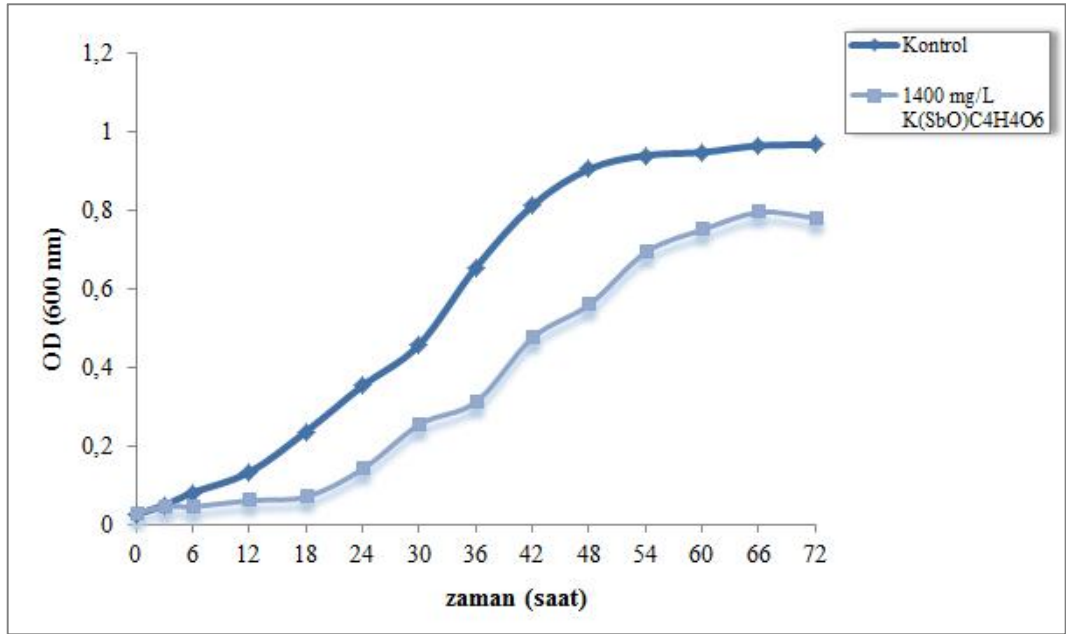
**Çizelge 3.25.** Sb 01-01 suşunun biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

<b>Biyokimyasal özellikler</b>	<b>Sb 01-01 Suşu</b>
Koloni rengi	Beyaz
Gram boyama	-
Katalaz	+
Oksidaz	-
Kazein	-
Jelatin	-
İndol	-
Nişasta	-
Sitrat	+
Üreaz	-
Hemoliz	-
Laktoz	-
D-Glukoz	-
İnositol	-
L-Arabinoz	-
Glukonat	+
D-Mannitol	-
Fruktoz	-
Maltoz	-
Sodyum malonat	-
Glikojen	-
Ksiloz	-
Sukroz	+
L-ramnoz asimilasyonu	-
Lizin dekarboksilaz	-
Laktik asit	+
Arjinin dihidrolaz	-
Beta-galaktosidaz	-
Ornithin dekarboksilaz	-
N-asetilglukozamin	-
Tirozin	-
Nitrat redüksiyonu	-
Eskulin	-
Polimiksin B	-
H <sub>2</sub> S	-
<b>Tanımlanan tür</b>	<i>Acinetobacter junii</i>

(+); üreme var, (-); üreme yok

### 3.3.4. Antimon Dirençli Suşun Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

Sb 01-01 suşunun üreme eğrisi Şekil 3.48.'de verilmiştir. Kontrol ortamında üretilen Sb 01-01 lag fazından 3 saat sonra log fazına geçtiği görülmektedir. Sb içeren ortamda ise Sb 01-01'in lag fazından log fazına geçişi 18.saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. Sb 01-01 suşunun Sb içermeyen ortamda 25.3 dakikada bir, Sb içeren ortamda ise 21.7 dakikada bir bölünme gösterdiği belirlenmiştir. Sb metalinin Sb 01-01 suşunun üremesi üzerine etkisinin sınırlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.48. Sb 01-01'in üreme eğrisi; —●— Sb içeren, —■— Sb içermeyen ortam

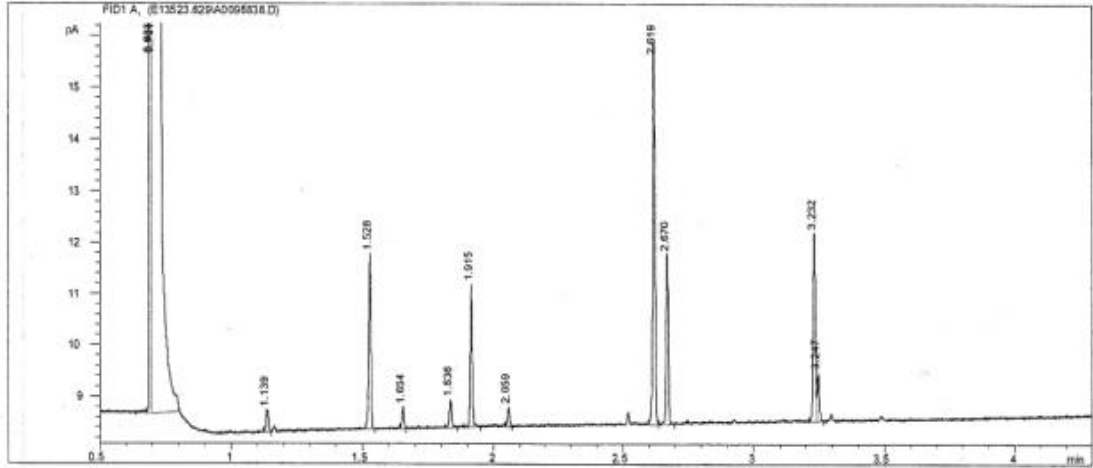
### 3.3.5. Antimon Dirençli Suşun Yağ Asitleri Metil Esterler Analizi (FAME) ile İdentifikasyonu

FAME grupların ihtiva ettikleri yağ asitleri yüzde oranları Çizelge 3.26 ve GC kromotogramı Şekil 3.49'da verilmiştir. Sb 01-01 suşunda %16.40 oranında 12:0 yağ asidi belirlenmiştir. FAME profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizi sonucunda Sb 01-01 suşu cins düzeyinde dahi tespit edilememiştir.

**Çizelge 3.26.** Sb 01-01 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen yağ asitleri % oranları

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6926	318794	0.005	----	6.6872		----	< min rt	
0.7007	9.582E+8	0.017	----	6.7478	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1387	571	0.009	1.207	9.9981	10:0	2.71	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
1.5282	3921	0.009	1.064	12.0029	12:0	16.40	ECL deviates 0.003	Reference 0.000
1.6539	508	0.009	1.038	12.5029	unknown 12.502	----	ECL deviates 0.001	
1.8358	718	0.010	1.006	13.2033	12:0 2OH	2.84	ECL deviates -0.001	
1.9149	3031	0.008	0.994	13.4852	12:0 3OH	11.85	ECL deviates 0.002	
2.0594	470	0.009	0.976	13.9999	14:0	1.80	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.6193	8469	0.009	0.931	15.8354	Sum In Feature 3	30.99	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/16:1 w6c
2.6702	3812	0.009	0.928	15.9991	16:0	13.91	ECL deviates -0.001	Reference -0.006
3.2317	4426	0.009	0.908	17.7887	18:1 w9c	15.80	ECL deviates -0.005	
3.2471	1039	0.008	0.908	17.8380	Sum In Feature 8	3.71	ECL deviates -0.010	18:1 w7c
----	8469	---	----	----	Summed Feature 3	30.99		16:1 w6c/16:1 w7c
----	1039	---	----	----	Summed Feature 8	3.71		18:1 w6c

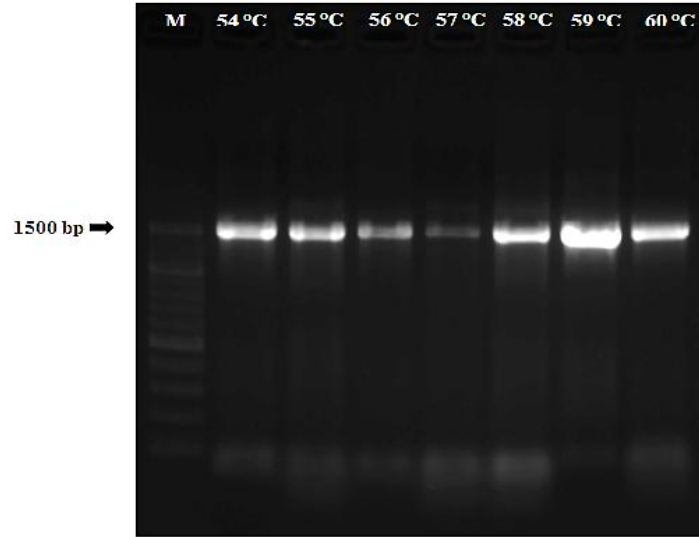
\*\*\* No Matches found in RTSBA6



**Şekil 3.49.** Sb 01-01 suşunun FAME analizi sonucu elde edilen GC kromotogramı

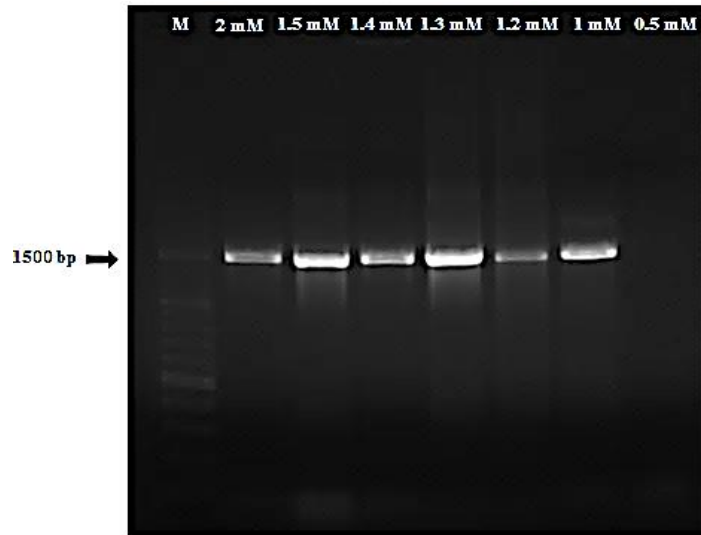
### 3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Optimizasyonu

PZR optimizasyonunda farklı primer bağlanma sıcaklıkları ve farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları uygulanmıştır. Sb 01-01 suşunun 16S rRNA bölgeleri PZR'den sonra agaroz jel elektroforezinde yürütlen PZR ürünlerinin yaklaşık 1500 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.50.'de denenen 54-60°C sıcaklık aralığında en yoğun PZR ürününün 59°C'de elde edildiği görülmüştür.



**Şekil 3.50.** Farklı annealing sıcaklıklarında (54-60°C) Sb 01-01 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)

Optimum annealing sıcaklığı belirlendikten sonra spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları (0.5-2 mM aralığında) denenmiştir. Şekil 3.51.'de görüldüğü gibi Sb 01-01 suşu için optimum  $MgCl_2$  konsantrasyonu 1.3 mM olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.51.** Farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında (0.5-2 mM) Sb 01-01 suşuna ait PZR ürünleri; Marker (M)



### 3.3.7. 16S rRNA Sekans Analizi ve Sb 01-01 Suşunun İdentifikasyonu

16S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde Sb 01-01 ise %97 oranında *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909 (accession number Z93440) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Sb dirençli bakterinin filogenetik ağacı, 16S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.1 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.52.'de görüldüğü gibi Sb 01-01 suşunun homoloji gösterdiği ilk on bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.

#### 3.3.7.1. Filogenetik Analiz ile Türlerin 16S rRNA Dizilerinin Hizalanması (Alignment)

Çalışmada, Sb 01-01 suşuna ait 16S rRNA (EK-1 Çizelge 4.) bölgesi ile gen bankasından alınan 10 bakteriye ait 16S rRNA nükleotid diziler MEGA 5.1 programında yer alan Clustal W seçeneği kullanılarak yapılan hizalama sonucuna göre filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Sb 01-01'in 16S rRNA bölgesi için yapılan hizalama, 1557 karakter matrisi ile sonuçlanmıştır. Toplam karakterlerin 704 tanesi korunmuş, 782 tanesi değişken, 82 tanesi filogenetik olarak bilgi verici, 700 tanesinde otomorfik karakter olduğu görülmüştür (Çizelge 3.27.).

**Çizelge 3.27.** Gerçekleştirilen nükleotid dizi hizalaması sonucunda ortaya çıkan karakter tipi ve sayıları

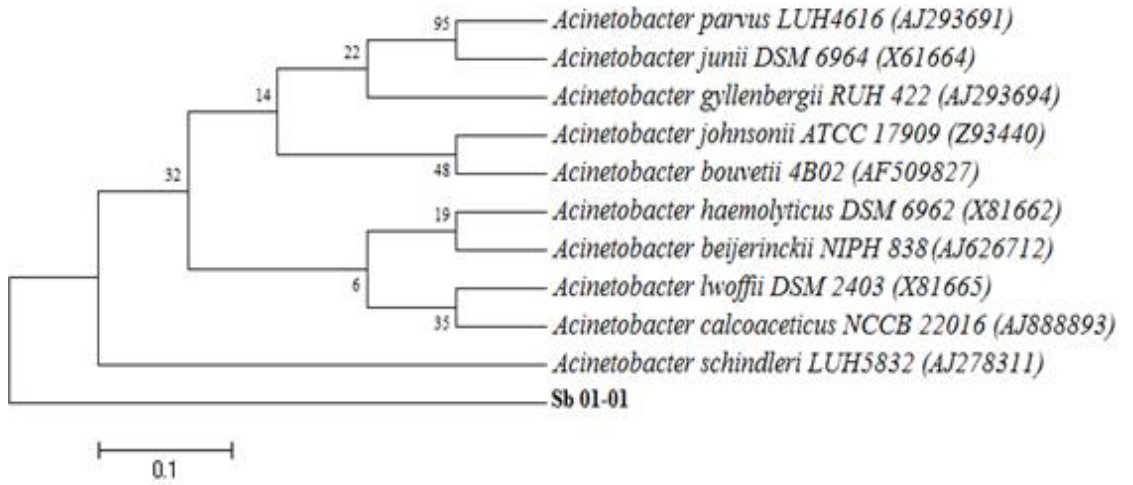
Karakter tipi	Karakter tipi sayısı/ Toplam karakter sayısı	Karakter tipi sayısı/Toplam karakter sayısı (%)
Değişken karakter sayısı	782/1557	50.2
Korunmuş karakter sayısı	704/1557	45.2
Filogenetik açıdan bilgi verici karakter sayısı	82/1557	5.26
Otomorfik karakter sayısı	700/1557	4.96

Bu alışmada, 16S rRNA dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizileri MEGA 5.1 bilgisayar programına veri olarak yüklenerek Sb 01-01 suşuna en yakın homoloji gösteren türler arasındaki genetik varyasyon ve filogenetik ilişki belirlenmiştir. Nümerik analiz için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi 16S rRNA (izelge 3.28.) bölgelerine göre hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.28.** Sb 01-01 suşu için 16S rRNA dizi verileri ile gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

<b>Türler</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
1. Sb 01-01	-										
2. <i>Acinetobacter johnsonii</i>	1.020	-									
3. <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1.023	0.011	-								
4. <i>Acinetobacter beijerinckii</i>	1.024	0.010	0.009	-							
5. <i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	1.023	0.011	0.016	0.012	-						
6. <i>Acinetobacter lwoffii</i>	1.039	0.022	0.025	0.019	0.026	-					
7. <i>Acinetobacter schindleri</i>	1.028	0.022	0.019	0.027	0.025	0.038	-				
8. <i>Acinetobacter parvus</i>	1.039	0.020	0.022	0.020	0.024	0.030	0.034	-			
9. <i>Acinetobacter junii</i>	1.046	0.023	0.030	0.026	0.022	0.034	0.036	0.018	-		
10. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.027	0.025	0.016	0.025	0.021	0.025	0.027	0.032	0.034	-	
11. <i>Acinetobacter bouvetii</i>	1.032	0.015	0.022	0.019	0.021	0.030	0.031	0.031	0.030	0.036	-

16S rRNA bölgelerine sıralanan dizilerin MEGA 5.1 programında uzaklık matrisine dayalı olarak komşu bağlantı ağacı (neighbour-joining tree) oluşturulmuştur (Şekil 3.52.). Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliği) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 500 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. 16S rRNA için elde edilen dendograma göre Sb 01-01 tamamen ayrı bir grupta yer alırken, diğerlerinin ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. Bu sonuca göre genetik olarak Sb 01-01'e en uzak tür *Acinetobacter junii* (1.046), en yakın tür ise *Acinetobacter johnsonii* (1.020) olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.52.** Sb 01-01 suşuna ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram (0.1; nükleotidler arasındaki farkı ifade etmektedir.)

### 3.3.8. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun Çoklu Metal Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi

Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun, bu çalışma için seçilen diğer ağır metallere karşı dirençlilikleri de tespit edilmiştir. *A. johnsonii* suşunun Li, Ba, Ag, Ni ve Sr ağır metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği Al, Pb, Cr, Mn, Co, Fe, Cu, Sn, Zn, Cd ve Hg gibi metallere karşı Çizelge 3.29.'da verilen konsantrasyonlarda duyarlı olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.29.** *A. johnsonii* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

Ağır Metal	Konsantrasyon (mg/L)	<i>A. Johnsonii</i> (Sb 01-01 suşu)
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	300	S
LiCl	5000	R
BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2700	R
CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9H <sub>2</sub> O	1050	S
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1000	S
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1200	S
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	750	S
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	450	S
AgNO <sub>3</sub>	15	R
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	450	S
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	160	S
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	395	R
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	825	S
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	900	R
Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	220	S
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2000	R

(S); duyarlı, (R); dirençli)

### 3.3.9. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Profilinin Belirlenmesi

Çizelge 3.30.'da *A. johnsonii* suşunun antibiyotik direnç profili ve kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonları verilmiştir. *A. johnsonii*'nin β-laktam grubundan oksasilin ve tikarsilin-klavulanik asite, aminoglikozidlerden tobramisine, sefalosporinlerden aztreonam, sülfonamid grubundan trimethoprim-sülfametoksazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, kuinolonlar, polipeptid, poliketid, makrolidlerden, rifamisin, glikopeptid ve amfenikol grubundan olan antibiyotiklere ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

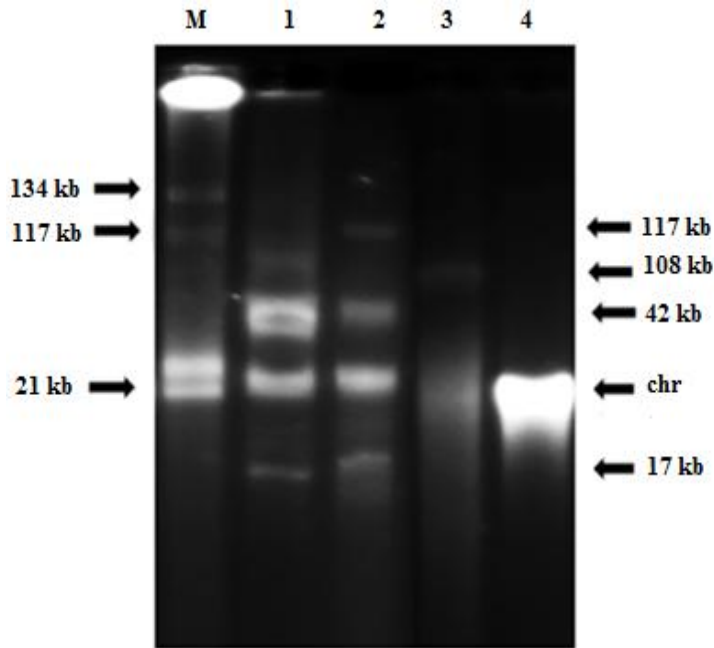
**Çizelge 3.30.** *A. johnsonii* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Konsantrasyon (µg/disk)</b>	<b><i>A. johnsonii</i> (Sb 01-01 suşu)</b>
<b><u>β-laktamlar</u></b>		
Ampisilin, AMP	10	S
Amoksisilin-Klavulanik asit, AMC/CA	20/10	S
Oksasilin, OXA	1	R
Penisilin, PEN	10	S
Tikarsilin, TIC	75	S
Tikarsilin - Klavulanik asit, TIM	75/10	R
<b><u>Aminoglikozidler</u></b>		
Amikasin, AMK	30	S
Gentamisin, GEN	10	S
Netilmisin, NET	30	S
Tobramisin, TOB	10	R
<b><u>Kuinolonlar</u></b>		
Siprofloksasin, CIP	5	S
Pefloksasin, PEF	5	S
<b><u>Sephalosporinler</u></b>		
Aztreonam, ATM	30	R
Sefepim, FEP	5	S
Seftazidim, CAZ	30	S
Sulbaktam /Sefoperazon, CFP	75/30	S
<b><u>Sülfonamidler</u></b>		
Trimetoprim- Sülfametoksazol, SXT	25	R
<b><u>Polipeptidler</u></b>		
Basitrasin, BAC	10	S
<b><u>Poliketidler</u></b>		
Tetrasiklin, TET	30	S
<b><u>Makrolidler</u></b>		
Eritromisin, ERY	15	S
<b><u>Rifamisinler</u></b>		
Rifampin, RIF	5	S
<b><u>Glikopeptidler</u></b>		
Vankomisin, VAN	30	S
<b><u>Amfenikoller</u></b>		
Kloramfenikol (C)	30	S

(S); duyarlı, (R); dirençli)

### 3.3.10. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun DNA Analizi

*A. johnsonii* suşunun Sb dirençlilik genlerinin lokasyonunu belirlemek amacıyla DNA analizi yapılmıştır. Şekil 3.53.'te görüldüğü gibi marker olarak kullanılan *A. tumefaciens* C58C1 ile molekül ağırlıkları bilinmeyen plazmitlerin molekül ağırlıkları ve lokasyonları belirlenmiştir. *A. johnsonii* suşunun DNA analizi sonucunda Sb içermeyen ortamda 108, 42, 23 ve 17, Sb içeren ortamda 117, 42 ve 17 kb boyutlarında plazmitler tespit edilmiştir. *A. johnsonii* suşunda yapılan plazmit eliminasyon çalışmalarıyla Sb dirençliliğinin kökeni araştırılmıştır. Eliminasyon sıcaklıkları Sb 01-01 için 39°C olarak belirlenmiştir. Eliminasyon çalışmaları sonucunda sadece 108 kb boyutundaki plazmit tespit edilmiştir. Ayrıca Sb dirençliliğinin de yok olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre *A. johnsonii* suşunun Sb direnç genlerinin 117 kb olan plazmit üzerinde olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan basitrasin ve oksasilin antibiyotiklerine karşı dirençliliğin eliminasyon sonrası kaybolduğu tespit edilmiştir.

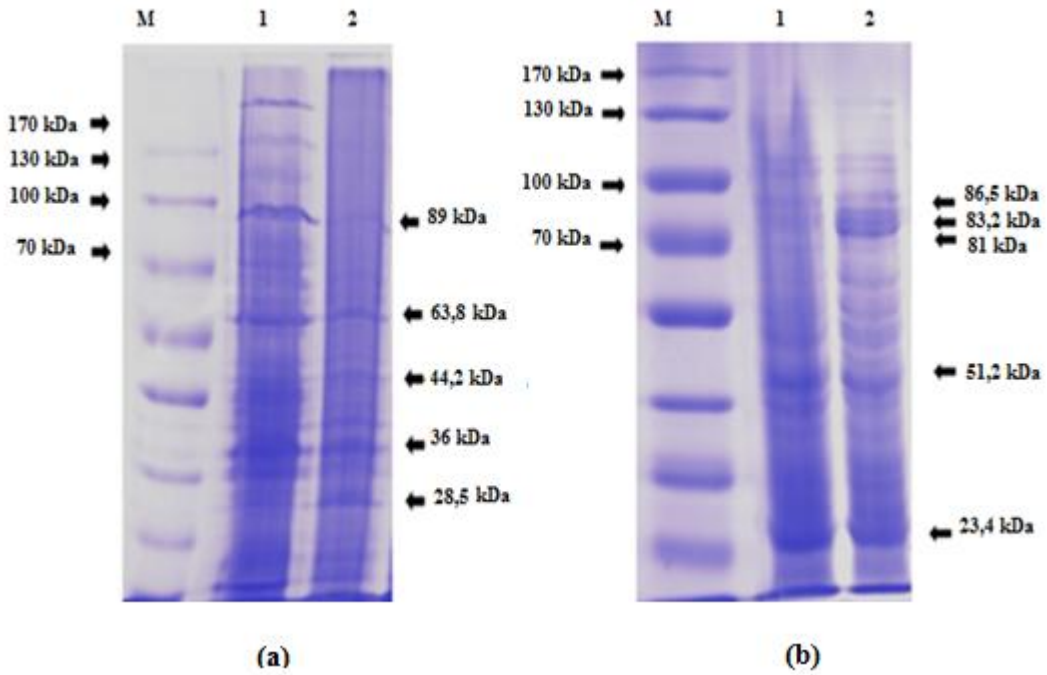


**Şekil 3.53.** *A. johnsonii* suşunun plazmit profili

Marker (M); *A. tumefaciens* C58C1, (1); Sb içeren, (2); Sb içermeyen ortam, (3); plazmit eliminasyonu, (4); Kromozomal DNA (chr)

### 3.3.11. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi

*A. johnsonii* suşunun Sb içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Şekil 3.54.a'da görüldüğü gibi *A. johnsonii* suşunun total protein ekspresyonu sonucunda Sb içeren ortamda 89, 63.8, 44.2 ve 36 boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 8.1, 13.6, 11 ve 2.9 kat azalma belirlenirken 28.5 kDa boyutundaki bantın ekspresyonunda 2.3 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.54.b'de görüldüğü gibi *A. johnsonii* suşunun dış membran protein ekspresyonu sonucunda Sb içeren ortamda 86.5, 83.2 ve 81 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.08, 1.1 ve 2.45 kat artış olduğu belirlenmiştir. 23.4 kDa boyutundaki bantın ekspresyonunda ise 0.9 kat azalma tespit edilmiştir.



**Şekil 3.54.** *A. johnsonii* suşunun total ve dış membran protein profilleri

Marker (M); (Protein Weight Marker Prestained Protein Ladder, (1); Sb içermeyen, (2); Sb içeren ortam



### 3.3.12. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) ile Mevsimsel Analizi

*In situ* uygulamada hedef olan antimon dirençli Sb 01-01 ile hibridizasyonu gerçekleştirmek için, pozitif kontrol olarak EUB338 (Bact338), EUB338 II (SBACT P 338), EUB338 III (SBACT V 338) problemleri, negatif kontrol olarak NONEUB (NON338) (Non-bact338), *A. johnsonii* için de ACA652 (ACA23A) problemleri FITC ile işaretlenmiş olup optimizasyon çalışması yapılmıştır. *E. coli* DH5 $\alpha$ , tüm FISH uygulamalarında negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Leica QWin Plus programı kullanılarak yapılan intensity analizi sonucunda Çizelge 3.31.'de belirtildiği gibi, pozitif kontrol EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri, negatif kontrol probu NONEUB ile hibridizasyon oranları sırasıyla %79.5 $\pm$ 1.75, %2.84 $\pm$ 1.27 ve %3.12 $\pm$ 0.35 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.55.).

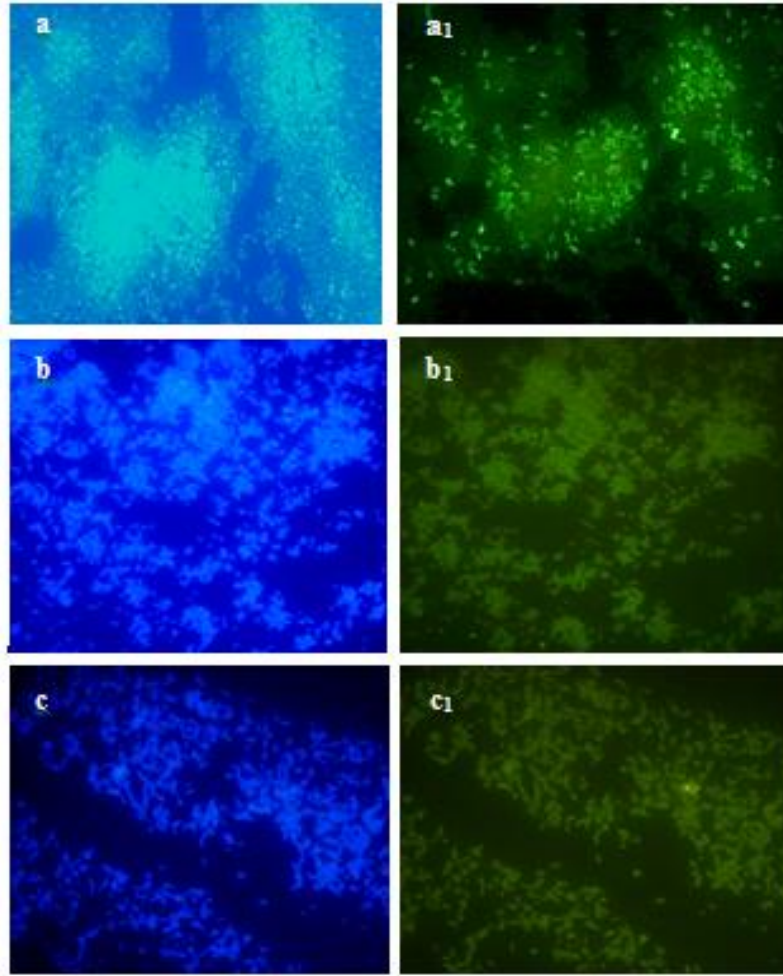
**Çizelge 3.31.** Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun pozitif ve negatif kontrol problemleri ile % hibridizasyon oranları

Kontrol Problemleri	Formamid (%) <sup>a</sup>	NaCl (mM) <sup>b</sup>	Hibridizasyon oranı (%)
Pozitif kontrol (EUB 338, II, III)	30	102	79.5 $\pm$ 1.75
Negatif kontrol (NONEUB338)	0	0.9	2.84 $\pm$ 1.27
Negatif kontrol ( <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ )	30	100	3.12 $\pm$ 0.35

<sup>a</sup> hibridizasyon çözeltisinde formamid konsantrasyonu.

<sup>b</sup> yıkama çözeltisinde NaCl konsantrasyonu

( $\pm$ ); standart sapma



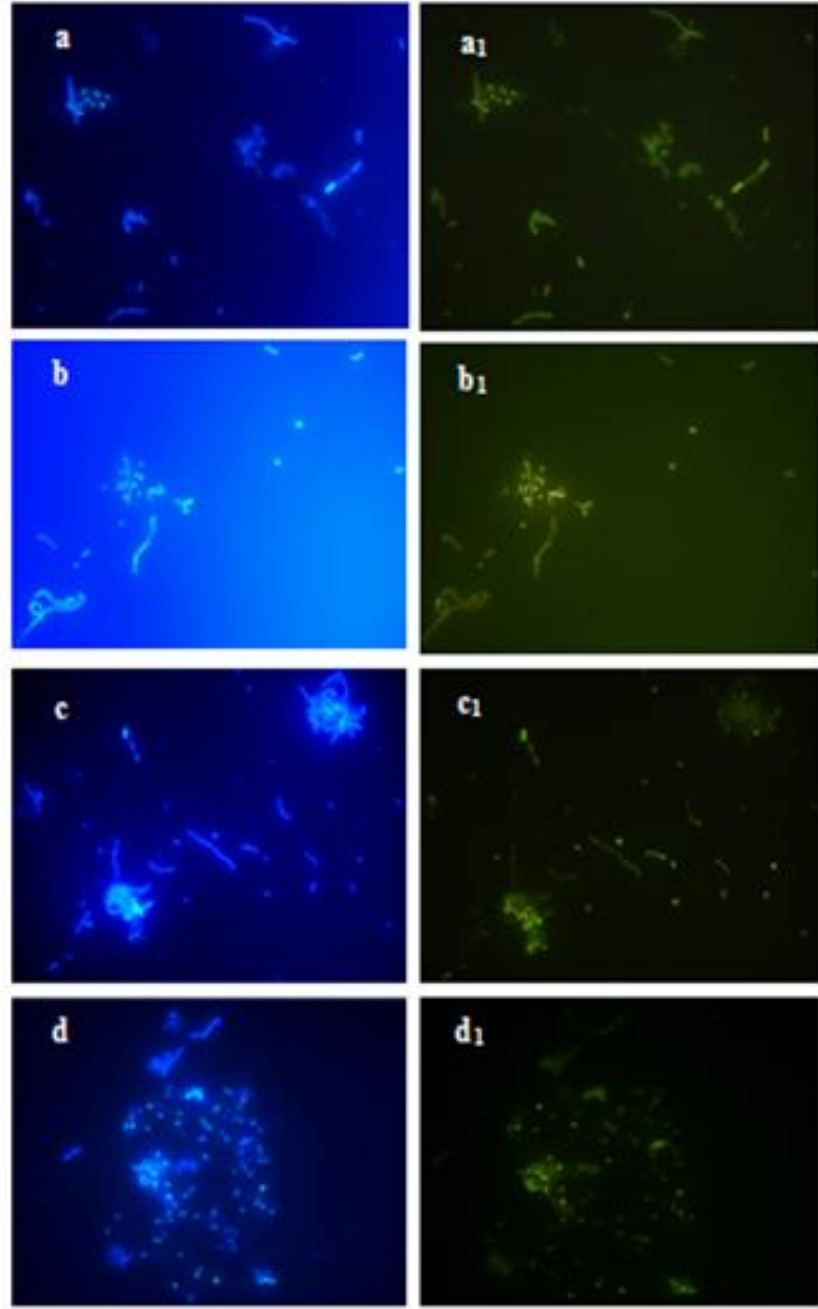
**Şekil 3.55.** EUB338, EUB338 II, EUB338 III problemleri pozitif kontrol (a-a<sub>1</sub>), NONEUB negatif kontrol (b-b<sub>1</sub>), *E. coli* DH5α (c-c<sub>1</sub>) ile hibridizasyon

Çizelge 3.32.'de ve Şekil 3.56-3.57.'de görüldüğü gibi ACA652 probe için optimum düzey ve stabilitede hibridizasyonun gerçekleşmesi için uygulanan hibridizasyon solüsyonunda formamid konsantrasyonu %35 olup hibridizasyon oranı  $74.0 \pm 0.84$  olarak belirlenmiştir.

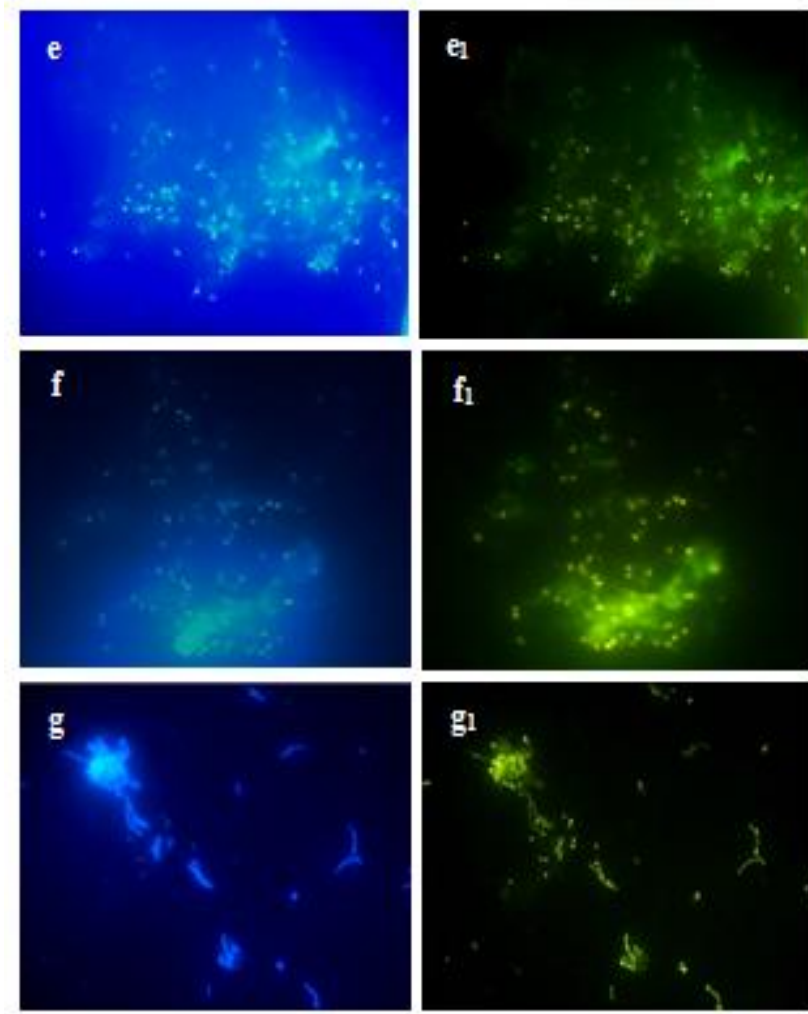
**Çizelge 3.32.** Değişen formamid konsantrasyonlarında Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun % hibridizasyon oranları

<b>Formamid konsantrasyonu (%)</b>	<b>Hibridizasyon oranı (%)</b>
10	5.22±1.81
15	19.4±4.62
20	26.8±3.67
25	37.1±4.28
30	52.03±4.69
35	74.1±1.21
40	64.8±3.43

(±); standart sapma



**Şekil 3.56.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %10 (a-a<sub>1</sub>), %15 (b-b<sub>1</sub>), %20 (c-c<sub>1</sub>), %25 (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



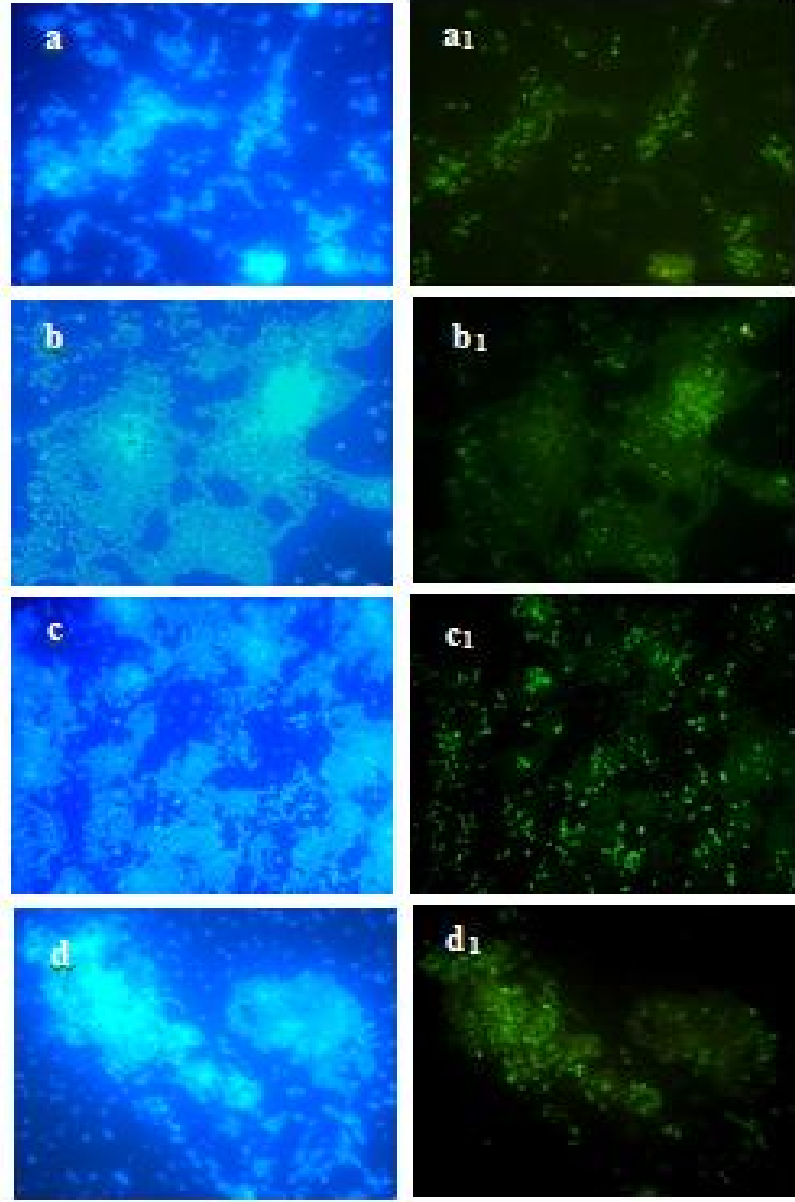
**Şekil 3.57.** Değişen formamid konsantrasyonlarında %30 (e-e<sub>1</sub>), %35 (f-f<sub>1</sub>), %40 (g-g<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

Çizelge 3.33.'e göre yıkama solüsyonundaki NaCl konsantrasyonu 102 mM olup hibridizasyon oranı  $74.1 \pm 1.21$  olarak belirlenmiştir (Şekil 3.58, 3.59 ve 3.60.). Belirlenen bu koşullarda su örneklerinde hibridizasyon çalışmaları yapılarak Kızılırmak'tan izole edilen Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun mevsimsel populasyon yayılım profili çıkarılmıştır.

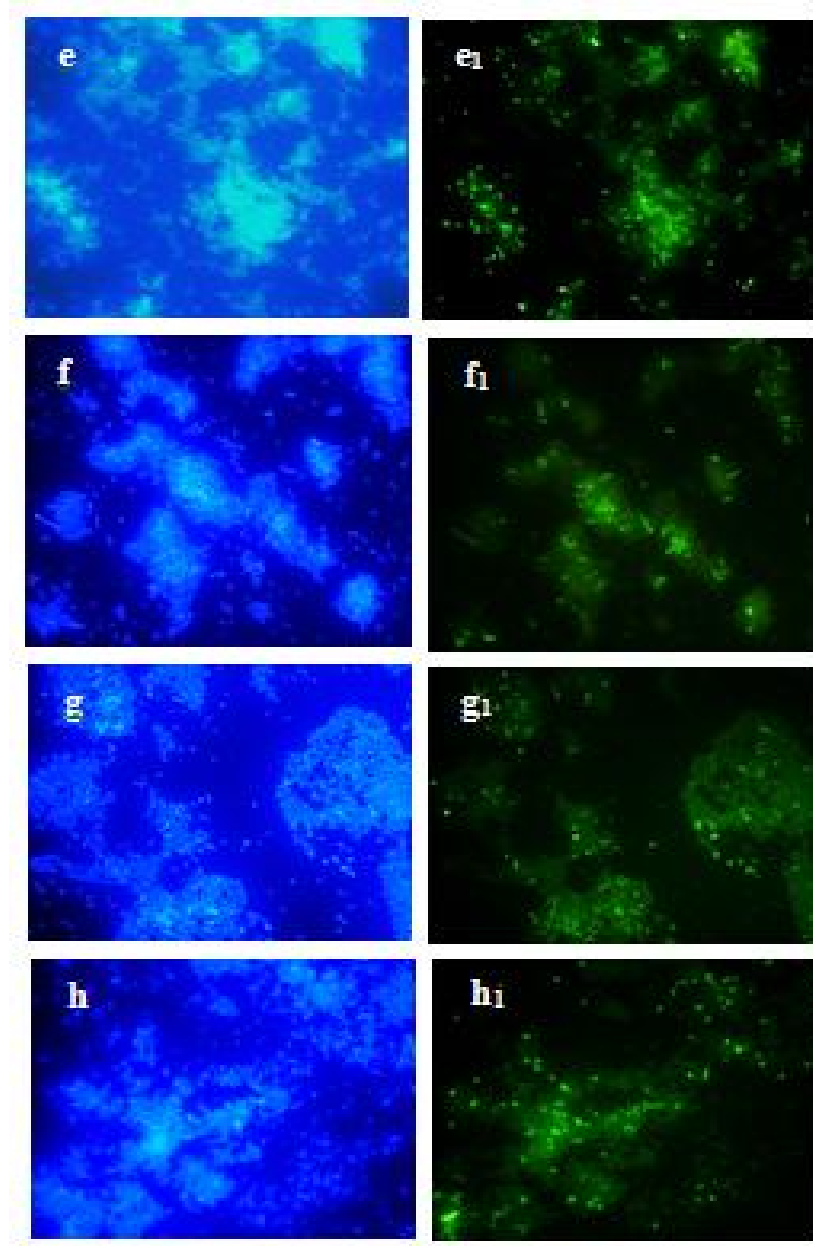
**Çizelge 3.33.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun % hibridizasyon oranları

NaCl konsantrasyonu (mM)	Hibridizasyon oranı (%)
95	68.9±0.62
96	69.6±0.28
97	69.9±0.48
98	71.6±1.05
99	71.6±3.81
100	70.9±0.54
101	72.5±2.59
102	74.1±1.21
103	72.0±1.85
104	71.1±0.53

(±); standart sapma

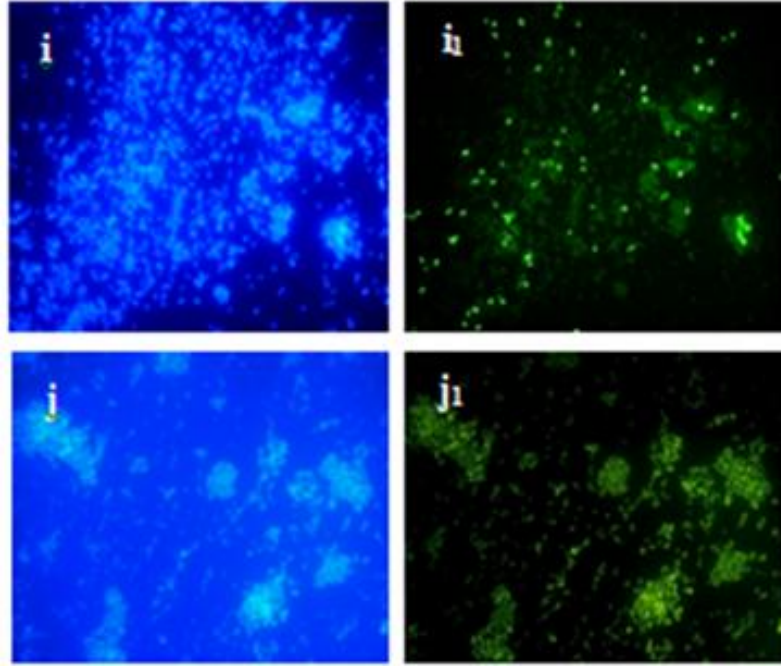


**Şekil 3.58.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 95 mM (a-a<sub>1</sub>), 96 mM (b-b<sub>1</sub>), 97 mM (c-c<sub>1</sub>), 98 mM (d-d<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu



**Şekil 3.59.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 99 mM (e-e<sub>1</sub>), 100 mM (f-f<sub>1</sub>), 101 mM (g-g<sub>1</sub>), 102 mM (h-h<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

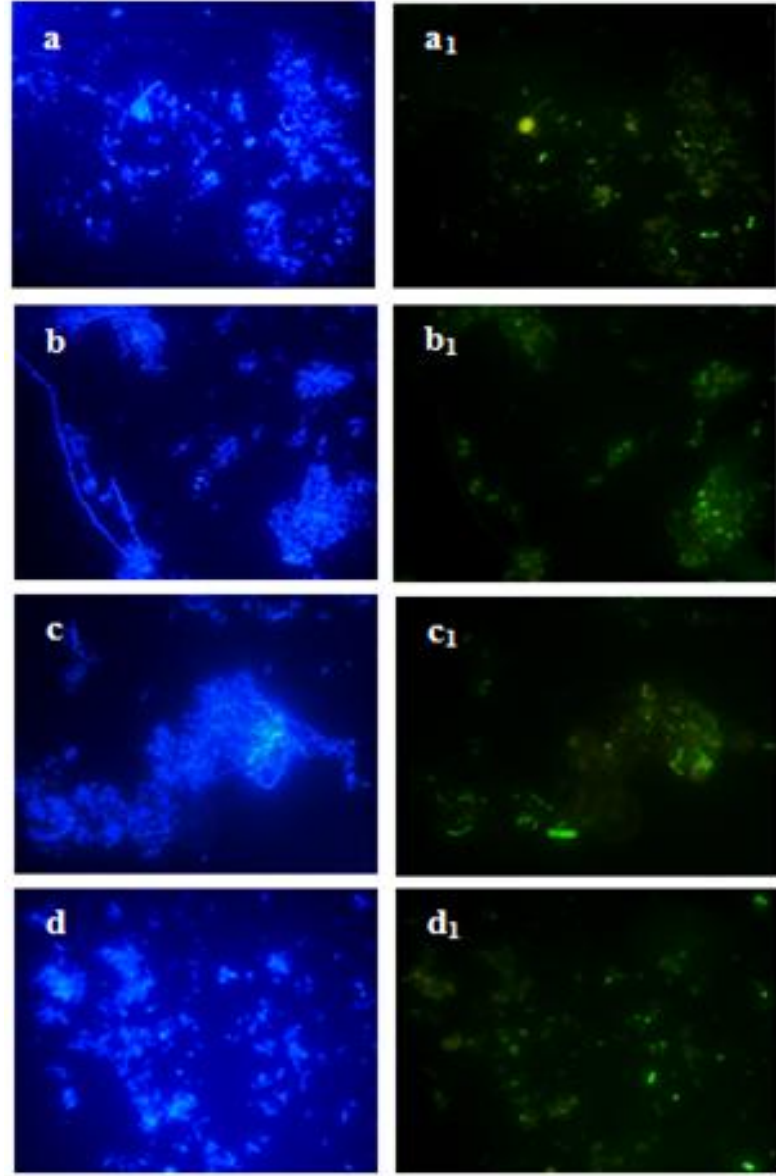




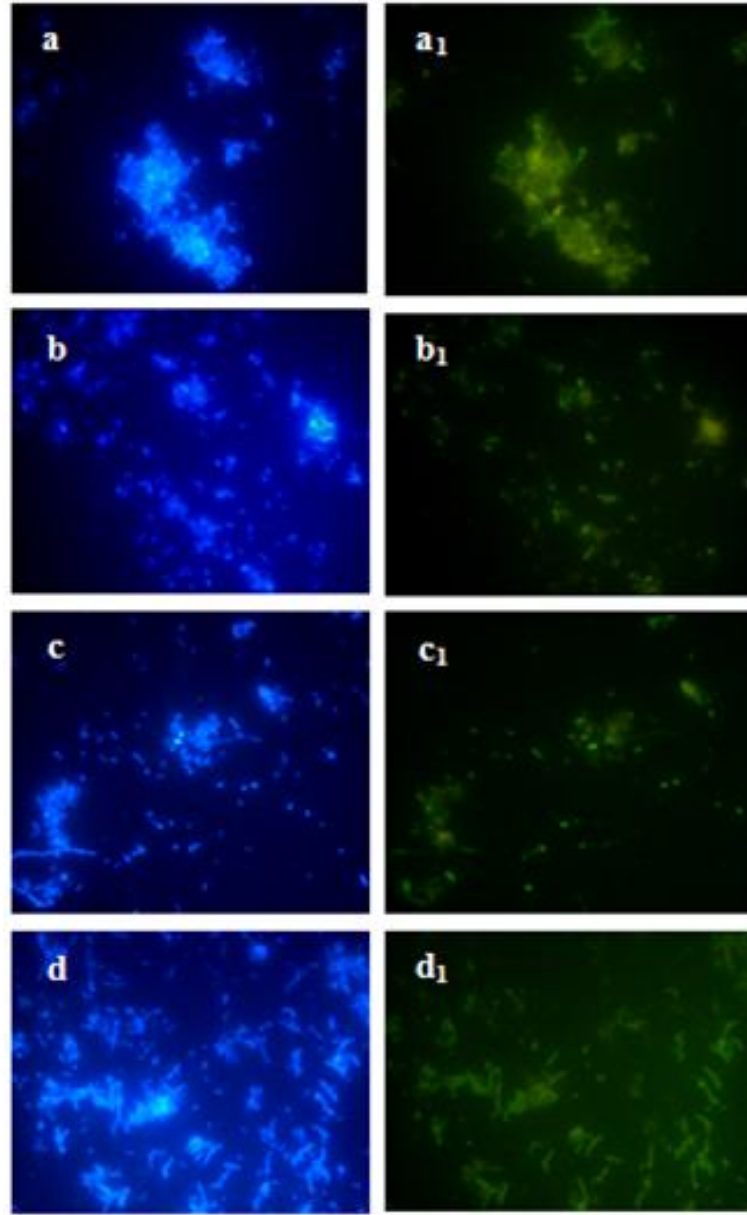
**Şekil 3.60.** Değişen NaCl konsantrasyonlarında 103 mM (i-i<sub>1</sub>), 104 mM (j-j<sub>1</sub>) hibridizasyon koşullarının optimizasyonu

### **3.3.13. Antimon Dirençli *Acinetobacter johnsonii* Suşunun Mevsimsel Populasyon Yayılımı**

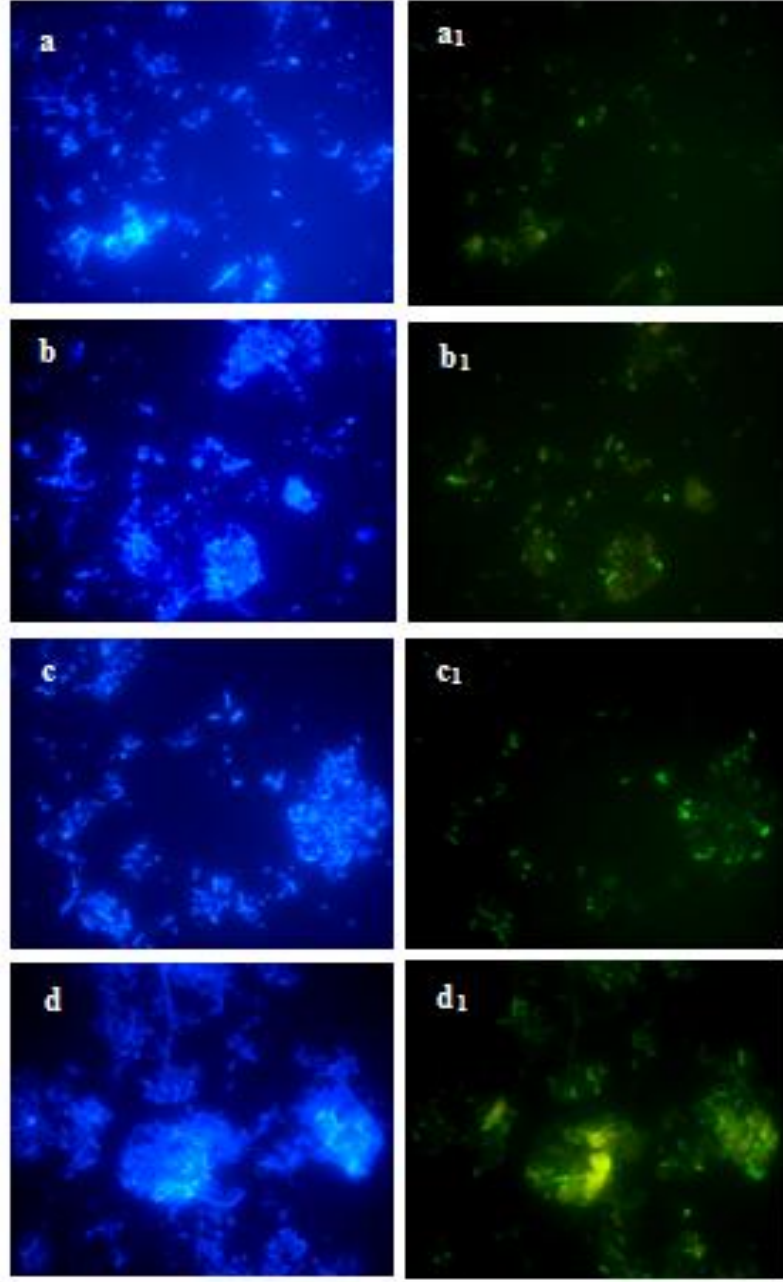
Şekil 3.61, 3.62 ve 3.63.'te görüldüğü gibi ACA652 probu için belirlenen optimum koşullar kullanılarak (%35 formamid ve 102 mM NaCl) 2010 Ocak-2012 Ekim arasında toplanmış olan su örneklerinde Sb dirençli *A. johnsonii* suşu takip edilmiştir. Şekil 3.65.'te verilen piksel alan grafiğine dayanarak çizilen üç yıllık yayılım grafiğinde FITC ile hibridize olan *A. johnsonii* suşunun biyokütle yüzdeleri (%) Şekil 3.3.19'da belirtilmiştir.



**Şekil 3.61.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2010 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

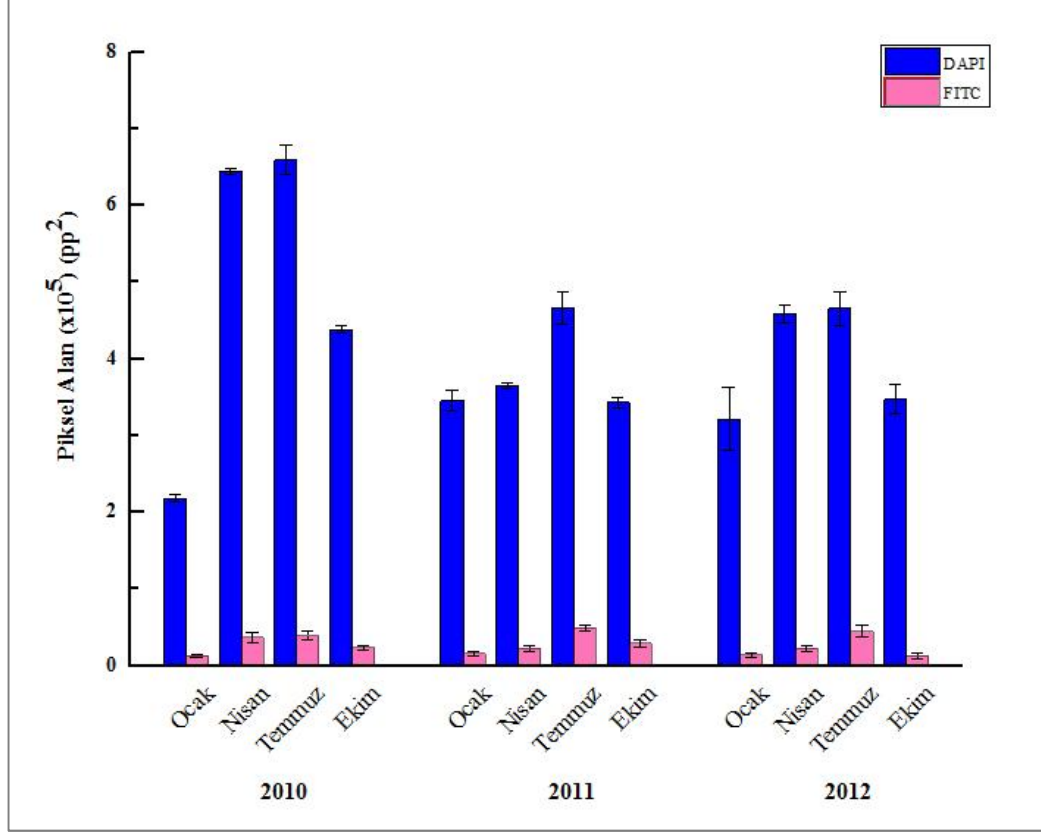


**Şekil 3.62.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2011 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi



**Şekil 3.63.** Ocak (a-a<sub>1</sub>), Nisan (b-b<sub>1</sub>), Temmuz (c-c<sub>1</sub>), Ekim (d-d<sub>1</sub>) 2012 dönemi alınan su örneklerindeki Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yayılımlarının belirlenmesi

Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğu (%) DAPI ve ACA652 probu ile hibridize olan bu suşun FITC görüntülerinin piksel alanları (pp<sup>2</sup>) ve standart sapma değerleri hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 3.64.).



**Şekil 3.64.** 2010-2012 yılları arasında alınan su örneklerinde Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yayılımı (pp<sup>2</sup>) (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

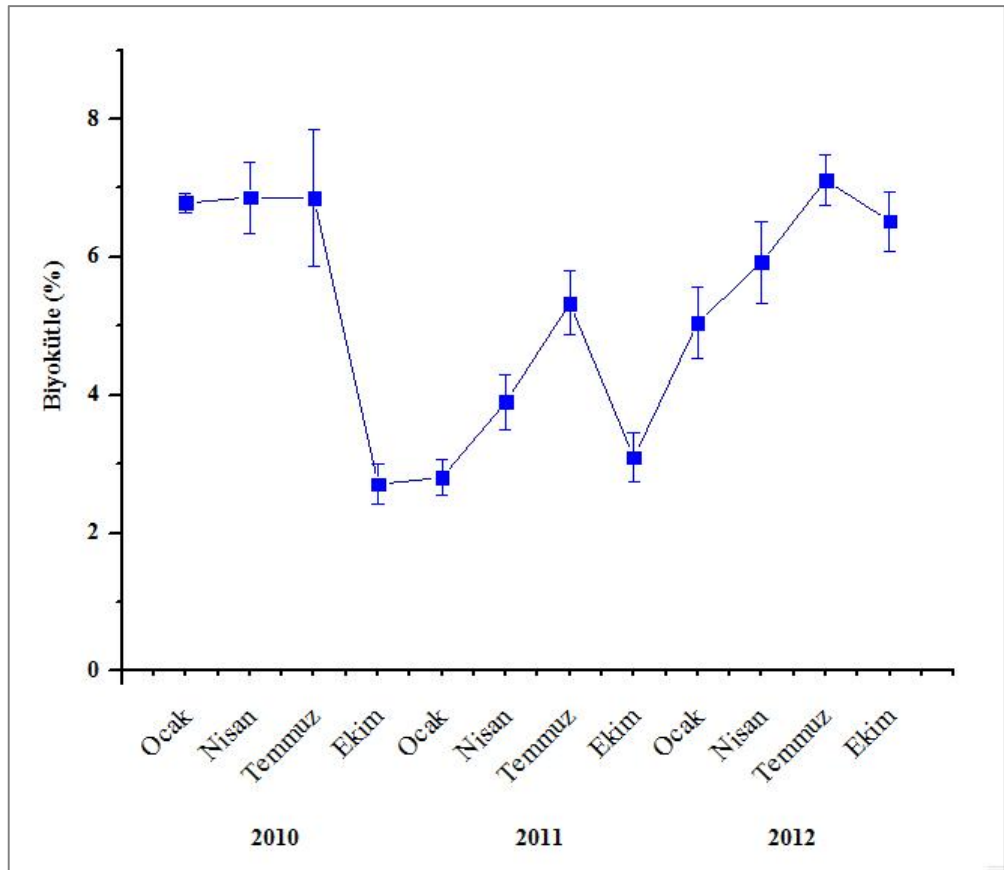
2010 Temmuz ayında toplam bakteri populasyonu ( $6.59 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) ve *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.39 \times 10^5 \pm 0.06 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ancak Ekim ayı *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.13 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

2011 Temmuz ayında toplam bakteri populasyonu ( $4.67 \pm 0.02 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) ve *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.49 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) en yüksek

değerlerde belirlenmiştir. Ancak Ocak ayında *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.16 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

2012 Temmuz ayında toplam bakteri populasyonu ( $4.66 \times 10^5 \pm 0.02 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) ve *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunda ( $0.44 \times 10^5 \pm 0.07 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) artış görülmüştür. Ancak Ekim ayında *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunluğunun ( $0.13 \times 10^5 \pm 0.03 \times 10^5$  pp<sup>2</sup>) diğer aylara göre en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

FITC ile işaretli ACA652 probuyla hibridize olan *A. johnsonii* suşununun toplam biyokütledeki yüzdeleri (%), piksel alan grafiğine dayanarak çizilen 2010-2012 yılı mevsimsel yayılım grafiği Şekil 3.65.'te verilmiştir.



**Şekil 3.65.** Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun 2010-2012 yıllarındaki (%) ortalama mevsimsel yayılımı (hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

2010 yılı Ocak ayında *A. johnsonii* suşunun ortalama yoğunluğu  $5.87 \pm 0.89$ , Nisan ayında  $5.71 \pm 0.98$ , Temmuz ayında  $5.95 \pm 0.23$  ve Ekim ayında  $5.34 \pm 0.55$  olarak belirlenmiştir. Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında populasyon yayılım oranlarında çok fazla değişiklik gözlenmezken, Ekim ayında azalma görülmüştür. Ocak, Nisan, Ekim ve Temmuz aylarında gözlenen ortalama *A. johnsonii* suşunun yoğunlukları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) tespit edilmiştir.

2011 yılı *A. johnsonii* suşunun mevsimsel yayılımına bakıldığında biyokütlerdeki ortalama yoğunluğu Ocak ayında  $4.54 \pm 0.69$ , Nisan ayında  $6.13 \pm 0.84$ , Temmuz ayında  $10.5 \pm 0.87$  ve Ekim ayında  $8.50 \pm 1.36$  olarak belirlenmiştir. Ocak ayından, Nisan ve Temmuz aylarına geçerken gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ), Temmuz ayında gözlenen ortalama Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun yoğunluğundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir.

2012 yılı biyokütlerdeki *A. johnsonii* suşunun ortalama yoğunluğu Ocak ayında  $4.35 \pm 1.03$ , Nisan ayında  $4.89 \pm 0.76$ , Temmuz ayında  $9.59 \pm 1.92$  ve Ekim ayında  $3.72 \pm 0.98$  olarak belirlenmiştir. Ocak ve Nisan aylarında gözlenen ortalama Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun populasyon yoğunlukları arasındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ), Temmuz ayından Ekim ayına geçerken gözlenen yoğunluk azalışının ise anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir.

Yapılan ANOVA testi neticesinde 2010, 2011 ve 2012 yılı içerisinde Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında gözlenen ortalama Sb dirençli *A. johnsonii* yoğunluklarının değişiklik gösterdiği belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Ayrıca bu üç yıl için uygulanan Shapiro-Wilk istatistiksel analiz testine göre gözlenen *A. johnsonii* için verilerin normal dağılım gösterdiği ( $p < 0.05$ ) tespit edilmiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Cd, Hg ve Sb ağır metallerini tolere eden suşların izole edilmesi, biyokimyasal, moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve bu metallerin biyoremediasyonunda kullanılabilecek potansiyel suşların belirlenmesidir.

Kırıkkale-Kızılırmak'ta 2010-2011 yılları arasında mevsimsel periyotlarla alınan su örneklerinin ICP-MS metal analiz sonuçlarına göre Cd için en yüksek değer Ocak ayında Kapulukaya Baraj girişi ve Mezbahane-Makina ve Kimya Endüstrisi (MKE) bölgelerinde 0.078 ve 0.977 ppm olarak ölçülmüştür. Hg için yapılan analiz sonuçlarına göre Akkoşan Merkez ve Kapulukaya Su Tutma Bendi bölgelerinde Ocak ve Nisan aylarında ölçülen Hg değerlerinin  $<0.005$ 'in altında olduğu belirlenmiştir. Diğer bölgelerde ise Hg tespit edilememiştir. Sb konsantrasyonu sadece Ocak ayında Kesikköprü Barajı su tutma bendi, Kapulukaya Baraj girişi ve Mezbahane-Makina ve Kimya Endüstrisi bölgelerinde sırasıyla 0.018, 0.056 ve 0.023 ppm olarak ölçülmüştür. Çok toksik olan bu metaller için Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından içme suyu standartlarında ön görülen maksimum konsantrasyon 0.005 ppm olarak belirlenmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre Cd ve Sb konsantrasyonlarının standart değerlerin çok üzerinde olduğu dikkat çekmektedir.

Cd direnci en yüksek olan suş 11. istasyon olarak tanımlanan Mezbahane-Makina Kimya Endüstrisi bölgesinden izole edilmiştir. Bu suş Cd 11-3 olarak adlandırılmış ve MTK değeri 900 mg/L olarak belirlenerek sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Sharma ve Fulekar (2009) yaptıkları çalışmada metal kontaminasyonu maruz kalmış bir bölgeden izole edip tanımladıkları *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Cloacibacterium normanense*, *Klebsiela pneumoniae*, *Buttiauxella izardii* ve *Citrobacter freundii* adlı suşlardan, *Buttiauxella izardii* DSM 9397 suşunun Cd için 800 mg/L MTK özelliğine sahip olduğunu ve Cd biyoremediasyonunda potansiyel bir suş olabileceğini belirtmişlerdir [57]. Mahvi ve Diels (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada polisülfon membrana *Alcaligenes eutrophus* CH34 bakterileri immobilize edilerek endüstriyel atık sulardan kaynaklanan Cd'nin uzaklaştırılması



amaçlanmıştır. Biyolojik membran içindeki besin maddeleri ile bakterilerin üreme ve ağır metallere karşı dirençliliklerinin geliştirilmesi sağlanırken diğer taraftan 120 mg/L Cd içeren atık su ile teması sağlanmıştır. *Alcaligenes eutrophus* CH34 suşunun kullanılması ile atık sudaki Cd<sup>+2</sup> konsantrasyonu 120 mg/L'den 2 mg/L'ye kadar düşürülebilmştir. Cd uzaklaştırılmasının %99 verimlilikte gerçekleştirildiği bu çalışma sonucuda söz konusu suşun endüstriyel atıksuların biyoremediasyonunda potansiyel oluşturabileceği belirtilmiştir [138]. Puskarova ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada Cd ile kontamine bölgelerden izole Cd dirençli bakteri topluluğu, biyokimyasal ve fizyolojik açısından rDNA restriksiyon enzim analizleri ile karakterize edilmiştir. Baskın bakteriyel topluluk arasında biyokimyasal test (API 20 E, API 20 NE, ENTERO) sistemleri ile tanımlanmıştır. Biyokimyasal testler altı bakteri türlerinin, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Comomonas testosteroni*, *Klebsiella planticola*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Serratia liquefaciens* olduğunu göstermiştir [139]. Bizim yaptığımız çalışmada ise Cd 11-3 suşu ilk etapta yapılan biyokimyasal test sonuçlarına göre *Comomonas testesteroni* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızda Hg direnci en yüksek olan iki suş izole edilmiştir. 10. istasyon olarak tanımlanan Aşağıyazı Kum Ocağı bölgesinden izole edilen suş Hg 10-2, 11. istasyon olarak tanımlanan Mezbahane-Makina Kimya Endüstrisi bölgesinden izole edilen suş Hg 11-4 olarak adlandırılmış ve MTK değerleri 220 mg/L olarak belirlenerek sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmamızda Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarının yapılan biyokimyasal test sonuçlarına göre *Pseudomonas stutzeri* olarak tanımlanmıştır. Keramati ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, Hg için dirençli bakteriler olarak *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Citrobacter* ve *Corynebacterium* cinsine ait bakterileri belirtmişlerdir. Horn ve ark. (1994) 35 ile 65 mg/L HgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında farklı *Pseudomonas putida* suşları arasında Hg dirençliliğini bildirmişlerdir [141]. Sb direnci en yüksek olan suş 1. istasyon olarak tanımlanan Kesikköprü Barajı bölgesinden izole edilmiştir. Bu suş Sb 01-01 olarak adlandırılmış ve MTK değeri 1400 mg/L olarak belirlenerek sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmamızda Sb 01-01 suşu, morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları dikkate alınarak *Acinetobacter junii* olarak tanımlanmıştır. Literatürde Sb dirençliliği ve direnç konsantrasyonları, Sb oksitleyen bakteri türleri ve

mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Sb oksitleyen bakteriler toksik Sb (III)'ü daha az toksik Sb (V)'e dönüştürüp, antimonun biyokimyasal döngüsünde önemli bir rol oynamaktadırlar [142]. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2013), 25 Sb (III) dirençli bakteri Sb madeni çıkarılan topraktan izole edilmiştir. Bu suşlar arasında, Sb (III) oksitleyici *Acinetobacter* sp. JL7, *Comamonas* sp. JL25, *Comamonas* sp. JL40, *Comamonas* sp. S44, *Stenotrophomonas* sp. JL9 ve *Variovorax* sp. JL23 dahil olmak üzere altı bakteri tanımlanmıştır. S44 suşu en fazla oksidasyon oranı ile aerobik koşullarda 50 mM Sb (III)'ü Sb (V)'e oksitlediği belirlenmiştir. Şimdiye kadar sadece 3 bakteri *Stibiobacter senarmontii*, *Thiobacillus ferrooxidans* ve *Agrobacterium tumefaciens* 5A suşu, Sb (III) oksitleyici olarak bildirilmiştir [142].

Günümüzde artık sistematik çalışmalarda morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Bunun sebebi araştırmacıların morfolojik çalışmaları desteklemek, güçlendirmek ve evrimsel açıdan değerlendirmesidir. Bu amaçla biyokimyasal testler sonucu tanımlanan Cd11-3, Hg 10-2, Hg 11-4 ve Sb 01-01 kodlu suşları, aynı zamanda yağ asidi (FAME) ve 16S rRNA sekans analizleri de kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır. FAME analizinin mikrobiyal tanıda, rutin çalışmalar için gerek zaman açısından gerekse de ekonomik olması bakımından çok uygun tanı yöntemi olduğu bilinmektedir [92]. Mikroorganizmaların yağ asidi profillerindeki farklılıklar genetik akrabalıkların dolaylı bir göstergesidir [92, 93]. Bu çalışmada Cd 11-3 suşunda FAME analizi sonucunda %22.82 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. Ancak yağ asidi veri tabanı analizi sonucunda Cd 11-3 suşuna cins düzeyinde dahi karşılık gelen bakteri tespit edilememiştir. Hg 10-2 suşunda 16:0 %23.13 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Hg 10-2 suşunun *Pseudomonas syringae* (0.129) ile eşleştiği tespit edilmiştir. Hg 11-4 suşunda %23.82 oranında 16:0 yağ asidi belirlenmiştir. Yağ asidi profili temel alınarak yapılan veri tabanı analizinde Hg 11-2 suşunun *Pseudomonas putida* (0.320) ile eşleştiği tespit edilmiştir. Her iki Hg dirençli suş için FAME analiz sonuçları ışığında elde edilen verilerin cins (genus) düzeyinde diğer testlerle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Sb 01-01 suşunda ise %16.40 oranında 12:0 yağ asidi tespit edilmiştir. Ancak yağ asidi veri tabanı analizi sonucunda Sb 01-01 suşuna cins düzeyinde dahi karşılık gelen bakteri tespit

edilememiştir. Literatürde FAME kullanılarak bakteri tanımlamasına yönelik değişik çalışmalar bulunmaktadır. Adıgüzel ve arkadaşlarının (2011) yaptığı yağ asidi analizinde, çalışılan 4 bakteri suşunda 14 farklı yağ asidi tespit edilmiştir. 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso ve 17:0 anteiso yağ asitlerini içeren beş yağ asidi ise bütün suşlarda bulunmuştur. Yağ asidi profilleri temel alınarak yapılan analizler sonucunda bakteri suşlarının iki fenotipik gruba ayrıldığı belirlenmiş ve bu verilerin doğruluğunu desteklemek için, 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. *Bacillus licheniformis* olarak tanımlanan ilk grubun 4 suş, *Aeribacillus pallidus* olarak tanımlanan ikinci grubun ise beş suş ile temsil edildiği bildirilmiştir [143]. Markowicz ve arkadaşları (2010) Cd, Ni, Cu ve Zn ağır metalleri ile kontamine olan toprak örneklerinden izole ettikleri MH1d, MH8b, AM12, ve AM15 suşları FAME analizi ile sırasıyla *Pseudomonas putida*, *Enterobacter intermedius*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter intermedius* olarak tanımlamışlardır. MIDI sistemi tarafından hesaplanan benzerlik indekslerinin (SIM), MH1d, MH8b, AM12 ve AM15 için sırasıyla 0.894, 0.633, 0.754 ve 0.782 üzerinde çok iyi eşleşme gösterdiği belirlenmiştir. Bu tanımlanan suşlarda %70 oranında C16:0, C16:1 ω7c ve C18:1 ω7c yağ asitlerinin bulunduğu, tüm suşlarda siklopropan yağ asitlerini toplam yağ asitlerinin %6.2-8.5'i oranında içerdikleri tespit edilmiştir. Buna karşılık, toplamda hidroksillenmiş yağ asitlerinin yüzdesi, *E. intermedius* MH8b, *K. pneumoniae* AM12, *E. intermedius* AM15 ve *P. putida* MH1d için sırasıyla %6.4, 7.7, 8 ve 12.4 olarak belirlenmiştir [144]. Luo ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada Sb dirençli *Skermanella stibioresistens* SB22T suşunu topraktan izole edip FAME analizi ile önemli hücresel yağ asitlerini (>5% oranında) C18:1ω7c (63.5%), (C14:0 3-OH ve/veya iso-C16:1 I, 10.8%) ve C16:0 (9.9%) şeklinde belirlemişlerdir [145].

Bakterilerden 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması ve sekans analizi sonucu tanımlama işlemi moleküler çalışmalarda standart bir yöntem olarak yerini almıştır. Bizim çalışmamız da biyokimyasal testler ve FAME analizi sonucu tanımlanan CD11-3 kodlu suş 16S rRNA sekans analizi kullanılarak da tanımlanmak istenmiştir. Yapılan sekans analizi sonucu Cd 11-3 suşunun %96 oranında *Delftia tsuruhatensis* T7 (AB075017) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Cd 11-3 suşunun 16S rRNA sekans analizine dayalı olarak yapılan filogenetik analiz ile türler arası uzaklık indeksleri belirlenmiştir. Buna göre Cd 11-3 suşuna genetik açıdan en yakın türün

*Delftia tsuruhatensis* T7 olduğu belirlenmiştir. Hg 10-2'nin %96 oranında, Hg11-4'ün ise %98 oranında *Pseudomonas koreensis* (AF468452) ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Türler arası uzaklık indekslerine göre Hg 10-2 ve Hg 11-4 suşlarına en yakın türün *Pseudomonas koreensis* olduğu tespit edilmiştir. Sb 01-01 %97 oranında *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909 (accession number Z93440) homoloji gösterdiği saptanmıştır. Türler arası uzaklık indeksine göre, Sb 01-01'e en yakın tür ise *Acinetobacter johnsonii* olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu indekslere bağlı olarak neighbour-joining metoduyla soy ağacı oluşturulmuştur. Yapılan bu çalışmalar sonucunda Cd11-3, Hg 10-2, Hg 11-4 ve Sb 01-01 kodlu suşlar, FAME ve 16S rRNA sekans analizleri ile *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* olarak tanımlanmıştır.

De Jaysankar ve arkadaşları (2008) toksik olan Hg, Cd ve Pb ağır metallerine karşı direnç gösteren mikroorganizmaları çalışmışlardır. Biyokimyasal ve 16S rDNA sekans analizleri ile izole edilen bakterileri *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* ve *Brevibacterium iodinium* olarak tanımlamışlardır [38]. Zolgharnein ve arkadaşları tarafından endüstriyel alanlardan Cu, Pb, Cd ve Zn ağır metal dirençli toplam 35 bakteri suşu izole edilmiştir. 16S rRNA analizleri sonucu bu izolatların *Pseudomonas*, *Delftia*, *Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* cinsine ait türler olduğu görülmüştür. En sık gözlenen türler  $\gamma$  *Proteobacter* cinsine ait *Pseudomonas* olduğu, 16S rRNA sekansları sonucuna göre 23 izolat %95 ve üzerinde benzerlik gösterdiği belirtilmiştir [4].

Luo ve arkadaşları (2012) Sb dirençli SB22T suşunu, 16S rRNA dizi analizi ve filogenetik analizler ile tanımlayıp bu suşun en yakın *Skermanella aerolata* 5416T-32T (%97.3), *Skermanella parooensis* ACM 2042T (%95.8) ve *Skermanella xinjiangensis* 10-1-101T (% 92.9) ile homoloji gösterdiğini belirlemişlerdir [145].

Bu tez kapsamında yapılan diğer çalışmalarda ise Cd, Hg ve Sb biyoremediasyonunda potansiyel oluşturabileceği düşünülen *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının metal direnç mekanizmalarının moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. *D. tsuruhatensis* suşunun karakterizasyonu

için çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik, DNA, total ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. *D. tsuruhatensis* suşunun Cd direncine ek olarak Al, Li, Mn, Pb, Ag, Sn, Ni, Zn ve Sr gibi metallere karşı da çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde söz konusu suşun ampisilin, oksasilin, penisilin, netilmisin, tobramisin, pefloksasin, eritromisin, rifampin, trimethoprim-sülfametoksazol gibi antibiyotiklere karşı da çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Abosereh ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarında çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini belirlemişlerdir. Gümüş dirençliliği olan suşların Cu, Ni, Fe, Hg, Zn, Cd ve Pb metallerine de ortak direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca gümüş dirençli *Pseudomonas* suşlarının kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine de ortak direnç gösterdikleri saptanmıştır [77]. Yapılan bir diğer çalışmada Rajbanshi ve arkadaşları (2008), Cr metali direnç gösteren *Klebsiella pneumoniae* suşunun antibiyotik dirençliliğini incelemişlerdir. Bu suşun gentamisin, kotrimoksazol antibiyotiklerine duyarlı olduğu tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu görülmüştür [10]. Çoklu metal direnci konusunda Gilotra ve Srivastava [1997] yaptıkları bir çalışmada, topraktan izole ettikleri *Pseudomonas pickettii* US321 suşunun, ampisilin, eritromisin gibi antibiyotiklerle, 2 mM Cd, 25 mM Zn ve 2 mM Cu ağır metallerine direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir [76].

Zhang ve arkadaşları (2012) denizden izole ettikleri *Pseudomonas putida* SP1 suşunun 280 µM konsantrasyonunda HgCl<sub>2</sub> dirençli olduğu belirlemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> ağır metallerine, ampisilin, kanamisin, kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç gösteren suşun Hg dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde kodlandığı belirlenmiştir [146].

Ağır metallerin varlıkları bakterilerin yaşam ortamında seçilimine baskı oluşturmaktadır. Bakteriler ağır metallerin varlığında anahtar mekanizma olarak yatay gen aktarımı ile yaşamını yöneten stratejiler dizisi oluşturarak seçilir [147]. Yapılan çalışmalarda uzun ve kısa vadeli ağır metal stresine maruz kalındığında yüksek sıcaklık, pH veya kimyasal kirlilik gibi etkenlerde, suda yaşayan bakteri popülasyonlarının tür çeşitliliğinde ve plazmit insidansında farklılıklar görülmektedir

[148]. Bazı bakteriler direnç için genetik belirleyicilere sahiptir. Bakterilerde bu belirleyiciler sıklıkla plazmitler üzerinde bulunur. Toksik kimyasal atıkların olduğu bölgeden izole edilen bakteriler, temiz sulardan izole edilen bakterilere göre daha sıklıkla plazmit DNA içerirler ve antibiyotik dirençliliği de gösterirler. Aynı zamanda bakterilerin birçoğunda ağır metal dirençlilik genlerinin plazmitler üzerinde kodlandığı bilinmektedir. Bakteriler, yeni antibiyotiklere ve kimyasallara dirençli duruma geldikçe, değişik ortam şartlarına kolayca uyum sağlayabilmekte ve bu olayda plazmitlerin taşıdıkları dirençlilik genleri önemli rol oynamaktadır. Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü her iki tip dirençte organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmit kökenli olabilmektedir [149]. Bu durumu belirlemek için tez kapsamında *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının DNA analiz çalışmaları yapılmıştır. Cd direnç genlerinin *D. tsuruhatensis* suşunda kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. *P. koreensis* suşlarında Hg ve *A. johnsonii* suşunda Sb dirençlilik genlerinin plazmitler üzerinde kodlandığı belirlenmiştir. Bakterilerin ağır metal ve antibiyotik dirençlilik genlerinin kökeni araştırmaya yönelik literatürde birçok çalışma yer almaktadır. Raja ve Selvam (2011) yaptıkları çalışmada Cd direnci çevre ve hastane izolatlarında yaygın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Cd direnç geni (*cadR*) çevresel izolat olan *P. aeruginosa* BC15 ile karakterize edilmiştir. Direncin kromozomal DNA aracılı olduğu ve bu direncin *P. aeruginosa*'dan daha önce *P. putida* ve *P. aeruginosa* PAO1 suşlarında karakterize edildiği belirlenmiştir. [150]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Zolgharnein ve arkadaşları (2010) Persian Körfezi'nden 35 Cu, Pb, Cd ve Zn dirençli bakteri izole etmiş ve suşlarda plazmit varlığı araştırılmıştır. Birçok ağır metal dirençli suşun plazmit taşıdığı ve bunlardan *Delftia acidovorans* 30V3 (60 Kb), *Delftia tsuruhatensis* (60 kb), *Delftia* sp. AN3 (52 kb, 2 kb ve <2 kb), *Delftia tsuruhatensis* (2 kb ve <2 kb) suşlarının farklı büyüklüklerde metal direnciyle ilgili plazmitler bulundurduğu tespit edilmiştir [78].

Zeng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2010) topraktan izole edilen ve 60 mg/L konsantrasyonunda HgCl<sub>2</sub>'yi tolere edebilen *Pseudomonas aeruginosa* D2 olarak

tanımlanan suşun Cu (220 mg/L), Co (180 mg/L), Mn (240 mg/L), Zn (200 mg/L) Cd (240 mg/L) ve Pb (140 mg/L) metalleri de tolere edebildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte penisilin, ampisilin, amikasin, streptomisin, neomisin, tetrasiklin, eritromisin, kitasamisin, polimiksin, novobiosin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *mer* operonuna yönelik kullanılan primerler ile gerçekleştirilen PZR çalışmaları sonucu Hg direncinin kromozomal DNA üzerinde kodlandığı tespit edilmiştir [151]. Birçok çalışmada belirtildiği gibi, çoğunlukla bakteriyel Hg direnç belirleyicileri plazmit kaynaklıdır. Birçok Hg direnci taşıyan plazmitler çevresel suşlardan izole edilerek yatay gen transferi ile çeşitli suşlar ve diğer türler arasında aktarılabilmektedir. Örneğin plazmitler *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia* çeşitli bakteri gruplarında tespit edilmiştir. Çeşitli *Acinetobacter* suşlarında büyük ve küçük iki tür Hg direnci taşıyan plazmit olup Hg direnç belirleyicilerinin plazmit aracılı transferi bu suşların karakteristik özelliğidir. Gram pozitif bakterilerde özellikle *Bacillus* türlerinde Hg direnç belirleyicilerinin çoğunlukla plazmit yerine kromozom üzerinde olduğu düşünülmektedir. Bizim son çalışmalar bir test suşu olarak kullanılan Amerikan *B. cereus* RC607 dahil olmak üzere birçok *Bacillus* suşlarında, Hg direnç belirleyicilerinin lokasyonunun plazmit üzerinde yer aldığını ortaya koymuştur [152]. Ogunseitan (2002) yaptığı çalışmada 100 mg/L konsantrasyonunda çevresel bir izolat *P. aeruginosa*'dan 142.5 kb ağırlığındaki Rip64 plazmitinde Hg direnç genlerinin taşındığını göstermiştir [153].

Sb direncinden sorumlu *ars* operonu plazmit ya da kromozom üzerinde yer almaktadır [142]. Cervantes ve Chavez (1992), *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşunda pUM310 100 kb plazmitinin bulunduğunu ve bu plazmit üzerinde arsenat, arsenit ve antimonat tuzlarına karşı direnç genlerinin kodlandığını belirtmişlerdir [154]. Arsenat, arsenit ve antimonat için direnç genlerinin plazmit üzerinde kodlandığı, *Staphylococcus aureus*'ta Novick ve Roth tarafından ilk kez tanımlanmıştır. PSX267 bölgesinin arsenik direnç genleri pC194 kullanılarak *Staphylococcus carnosus* klonlanarak elde edilen plazmitin pCA43, kloramfenikol, arsenat, arsenik ve antimona karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir [155]. Çoklu metal ve antibiyotik dirençliliğinin bir arada bulunmasına yönelik olan bu çalışmalar bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçları destekler niteliktedir.

Tez kapsamında ayrıca izole edilen *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının Cd, Hg ve Sb direnç mekanizmalarının protein seviyesinde belirlenebilmesi için metal içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Cd içeren ortamda total proteinlerin ekstraksiyonu sonucunda 84, 68, 33, 26, 17 ve 15 kDa boyutlarındaki bantlarda sırasıyla 1.9, 1.32, 1.06, 1.21, 1.24 ve 1.43 kat artış olduğu, dış membran proteinlerinin ekstraksiyonu sonucu ise 68 ve 18 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla 1.32 ve 2.2 kat artış olduğu belirlenmiştir. Ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmalar bu toksik kirleticilere, bazı proteinlerinin ekspresyonunu artırarak ya da azaltarak cevap vermektedir [156]. Bu sonuçlar doğrultusunda *D. tsuruhatensis* suşunun Cd dirençliliğinde total ve dış membran proteinlerinin birlikte etkin olduğu belirlenmiştir.

Metal direnç yollarında stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir. Metal iyonları, dış membrana ve hücre duvarına non-spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu bağlanma, dış membranda yer alan -NH<sub>2</sub>, -SH, -OH, -SO<sub>3</sub>H, -COOH ve -PO<sub>3</sub>H grupları ile metal iyonları arasında spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir. Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki bu gruplara bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler [149].

Ağır metal direnç durumunda hücrede yeni sentezlenen proteinlerin metale bağlı adaptif hücre koruması gelişir [139]. *E. coli*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa* gibi bazı gram negatif bakteri türleri ile metalin hücrede akümüle edilmesi, Cd hücre içi bağlayıcı proteinlerin üretimine bağlıdır. Cd içeren ve içermeyen ortamda izolatların total hücre hücre protein profilleri analiz edilmiştir. Dirençli suşlar arasında protein profillerinin benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Cd uzaklaştırma kapasitesi ile suşların metal bağlayan protein senteziyle doğrudan bağlantılı olduğunu söylemek mümkündür [139]. Laplace ve arkadaşları (2000) Cd'nin bulunduğu ortamda *E. faecalis* kültürlerinin çeşitli proteinlerinin sentezinde artış



olduğunu belirtmişlerdir. *E. faecalis*'in *csrA* geninin moleküler klonlama ve karakterizasyonu Cd eklendikten sonra yapılmıştır. Buna ek olarak, düşük Cd konsantrasyonunun bile *csrA* ekspresyonuna sebep olduğu belirlenmiştir [157].

*P. koreensis* suşlarının Hg direnç mekanizmalarının protein seviyesinde belirlenebilmesi için Hg metali içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Hg 10-2 olarak kodlanan *P. koreensis* için Hg içeren ortamda total protein ekspresyonunda 97.7, 63.5 ve 53.4 kDa boyutlarındaki bantlarda sırasıyla 1.71, 1.72, 2.07 kat artış olduğu tespit edilmiştir. 39.6, 37.1 ve 27.8 kDa boyutlarındaki bantlarda ise sırasıyla 1.4, 1.3 ve 1.5 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Dış membran protein ekstraksiyon sonucu 56.9, 45.8, 43.2, 39.6 35.3 ve 27.3 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 1.34, 1.08, 1.01, 1.5, 1.1 ve 2.47 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Hg 11-4 olarak kodlanan *P. koreensis* için Hg civa içeren ortamda 70.6, 40.2, 28.2,15.7 ve 14.2 kDa boyutlarındaki bantlarda sırasıyla 1.71, 1.46, 1.22 ve 1.07 kat artış olduğu görülmüştür. Hg 11-4 suşunun dış membran protein profili incelendiğinde Hg içeren ortamda 25.8 ve 19.5 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla 2.38 ve 1.11 kat artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *P. koreensis* suşlarının Hg dirençliliklerinde her iki tip proteinlerin de etkin rol aldığı düşünülmektedir. Wang ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmaya göre, Hg dirençli *P. putida*'nın yüksek konsantrasyonda Hg'ye maruz kaldığında hücre proteomunda çok az bir değişim belirlerken, özellikle hücre zarına ait taşıyıcı proteinlerde değişiklik gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre, yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda katyon akışını sağlayan taşıyıcı proteinlerin sentezi 45 kez daha fazla olurken, bir dış zar proteini olan porinin sentezi 106 kat azalmıştır [158].

*A. johnsonii* suşunun Sb direnç mekanizmasının protein seviyesinde belirlenebilmesi için Sb metali içeren ve içermeyen ortamlarda total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Total protein ekstraksiyonu sonucunda Sb içeren ortamda 89, 63.8, 44.2, ve 36 boyutlarında olan bantların ekspresyonunda sırasıyla 8.1, 13.6, 11 ve 2.9 kat azalma belirlenirken 28.5 kDa boyutunda olan bantın ekspresyonunda 2.3 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Dış membran protein ekstraksiyonu sonucu Sb içeren ortamda 86.5, 83.2 ve 81 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonunda sırasıyla

1.08, 1.1 ve 2.45 kat artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *A. johnsonii* suşunun Sb dirençliliğinde her iki proteinin de etkin rol aldığı düşünülmektedir. Arsenik ve antimon oksianyonlarının kimyasal özellikleri benzer olduğundan, aynı yol ile taşınmaktadır. Arsenik gibi antimon direncinde de hücre içine alınan bu metaller detoksifiye edilip hücre dışına atılırlar [70, 71]. As ve Sb, arasındaki benzerlik göz önüne alındığında As (III)/Sb (V) atım mekanizması proteinlerini kodlayan *arsRDABC* operon üyesi *arsB* geni, hem As (III) hem de Sb (V) dirençliliğini doğrulamaktadır [157].  $Sb^{+3}$ 'ün transportu *arsB* taşıyıcı protein ile katalize edilir.  $Sb^{+3}$ 'ün inorganik formlarının *E. coli* hücrelerine gliseroporin GlpF kanalı ile alımı kolaylaştırılır [68].

Çalışmanın son aşamasında ise Cd dirençli *D. tsuruhatensis* suşunun 2010-2012 dönemlerindeki mevsimsel populasyon yayılımı FISH yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *D. tsuruhatensis* suşunun 2010 yılı verilerine göre ortalama populasyon yoğunluğu en fazla Ocak ayında en az ise Ekim ayında tespit edilmiştir. 2011 yılı verilerine göre ise populasyon yoğunluğunun en fazla Temmuz ayında en az ise Ocak ayında olduğu dikkat çekmektedir. 2012 yılında ise yoğunluğun en fazla olduğu ay yine Temmuz, en az olduğu ay ise yine Ocak olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artışının en fazla olduğu Temmuz aylarında populasyon yoğunluğu artarken Ekim ayında sıcaklıkların azalmasıyla birlikte populasyon oranında azalış görülmektedir. Sıcaklıkların en düşük olduğu Ocak aylarında ise populasyon yoğunluğunun en düşük oranlarda olduğu dikkat çekicidir.

Hg dirençli *P. koreensis* suşunun mevsimsel populasyon yayılımı da FISH yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *P. koreensis* suşunun 2010 yılı verilerine göre ortalama populasyon yoğunluğu en fazla Temmuz ayında en az ise Ekim ayında tespit edilmiştir. 2011 yılı verilerine göre populasyon yoğunluğu en fazla yine Temmuz ayında ve en az Ekim ayında olduğu belirlenmiştir. 2012 yılı verilerine bakıldığında ortalama populasyon yoğunluğu en fazla yine Temmuz ayında ve en az Ocak ayında tespit edilmiştir. Hg dirençli suşun sıcaklık artışının en fazla olduğu Temmuz aylarında populasyon yoğunluğu artarken Ekim ayında sıcaklıkların azalmasıyla birlikte populasyon yoğunluğunda azalış görülmektedir. Sıcaklıkların en

düşük olduğu Ocak aylarında ise populasyon yoğunluğunun en düşük oranlarda olduğu belirlenmiştir.

Tez kapsamında ayrıca Sb dirençli *A. johnsonii* suşunun mevsimsel populasyon yayılımı FISH yöntemi ile belirlenmiştir. *A. johnsonii* suşunun 2010 yılı verilerine göre ortalama populasyon yoğunluğu en fazla Temmuz ayında ve en az Ekim ayında tespit edilmiştir. 2011 yılı verilerine göre ortalama populasyon yoğunluğu en fazla Temmuz ayında en az Ocak ayında belirlenmiştir. 2012 yılı *A. johnsonii* suşunun ortalama verilerine göre ortalama populasyon yoğunluğu en fazla Temmuz ayında ve en az Ekim ayında belirlenmiştir. *A. johnsonii* suşunun sıcaklık artışının en fazla olduğu Temmuz aylarında populasyon yoğunluğu artarken Ekim ayında sıcaklıkların azalmasıyla birlikte populasyon yoğunluğunda da azalma görülmektedir. 2012 yılı dışında sıcaklıkların en düşük olduğu Ocak aylarında ise populasyon yoğunluğunun en düşük oranlarda olduğu belirlenmiştir. *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının üç yıllık ortalama populasyon yayılım oranlarına bakıldığında mevsimsel koşulların yanı sıra çevresel faktörlere bağlı olarak da değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Kızılırmak'ın Kırıkkale il sınırına ulaştığı ilk nokta Kesikköprü Barajı'dır. Barajda toplanan Kızılırmak suyu belirli periyotlarla baraj kapakları kapatılarak, diğer 11 bölgede su seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Özellikle yaz aylarında sıcaklık artışı ve buharlaşma su seviyesini azaltmaktadır. Ayrıca Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşları ve diğer işletmelerin faaliyetleri sonucu Cd, Hg ve Sb dirençli bakterilerin mevsimsel populasyon yayılımlarının etkilendiği düşünülmektedir.

Literatürde ağır metal ile kontamine sularda FISH yöntemiyle dirençli suşların populasyon yayılımlarına yönelik çalışmaya rastlanılmamıştır. Nicomrat ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada, maden drenaj sularının karıştığı sediment örneklerinde bulunan mikrobiyal populasyonları 16S rRNA ile karakterize etmiş ve FISH tekniği ile sayılarını belirlemişlerdir. Bu amaçla ayrıca Fe ve S oksitleyen *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferrooxidans* ve *Acidiphilium* spp. gibi asidofilik bakteriler ve *Ferroplasma acidarmanus* ve *Sulfolobus* spp. gibi asidofilik arkelerin oligonukleotid problemlerini dizayn etmişlerdir. Alınan yüzey sediment

örneğinde total mikrobiyal komünitenin %0,01'inde Arkeler tespit edilmiştir. Bakteriyel popülasyonun %37'sini *Acidithiobacillus ferrooxidans* oluşturduğu belirtilmiştir. *Acidiphilium* cinsine ait heterotroflar bakteriyel popülasyonda %20 oranında bulunmuştur. *Leptospirillum ferrooxidans*'ın miktarı ise belirlenme düzeyinin altında olması nedeniyle tespit edilememiştir [115]. Cavalca ve arkadaşları (2010) arsenik ile kontamine olan toprakta yetişen *Cirsium arvense* (L.) devedikeni bitkisinin köklerinde As dirençli rizobakteriyel toplulukları FISH yöntemiyle belirlemek için 16S rRNA hedefli 5' ucu Cy3 floresan boya ile işaretli proplar kullanılmıştır. Arsenik dirençli izolatlar 13 cinse ait olup, en yaygın cinsler *Bacillus*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Microbacterium* ve *Ochrobactrum*'dur. Birçok bakteri en yüksek As konsantrasyonlarında (100 mM arsenat ve 10 mM arsenit) yaşayabilmektedir. FISH analizi ile bakteri gruplarını, ağırlıklı olarak  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria, ve  $\gamma$ -Proteobacteria oluşturduğu görülmüştür. Kök-toprak sisteminde FISH analizi ile hedef bakteri grubuna göre kullanılan proplar ve toplam bakteri yoğunluğunda hibridizasyon oranları Bet42a %24.2, Gam42a %55.7, Pse227 %50.0, Alf968 %13.3, CF319a %0.6, HGC354b %0.9 ve LGC354b %1.1 olarak belirtilmiştir [159].

Farklı çevrelerde, mikrobiyal çeşitliliğin identifikasyonunda moleküler tekniklerin hızlı ve güvenilirliğinin yüksek olduğu görülmektedir. Organizmaların tanımlanmasında, takip edilmesinde FISH yöntemi kullanılmaktadır [160]. Bu teknik ile bakteriler doğal habitatlarında kültüre edilmelerine gerek kalmaksızın floresan mikroskopu kullanılarak saptanabilmektedir. Böylece kültüre edilemeyen bakterilerin tanısına ve takibine de olanak sağlamaktadır. Nükleik asit amplifikasyon ve FISH yöntemleri hızlı ve güvenilir testler olup, duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir. 16S rRNA hedefli floresan işaretli oligonükleotid proplar kullanılarak FISH yöntemi ile Cd, Hg ve Sb dirençli *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının yüzey sularında takip edilmesine yönelik çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar FISH yönteminin kolaylıkla nehir sularında uygulanabildiğini göstermiştir.

Yapılan bu çalışma ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli suşlar, biyokimyasal ve genetiksel özellikleri bakımından incelenmiştir. Moleküler

özellikler esas alınarak bu suşlar tanımlanmıştır. Tanımlanan bu suşların çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında DNA ve protein profilleri belirlenerek, bu profillerin metal dirençlilik mekanizması ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda çalışmada *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis*, ve *A. johnsonii* nehir izolatlarının Cd, Hg ve Sb biyoremediasyonu için potansiyel suşlar olabileceği belirlenmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda karakteriize edilen bu suşların metal uzaklaştırma kapasiteleri belirlenmelidir. Literatürde Kırıkkale-Kızılırmak'tan metal dirençli bakterilerin izole edilmesi, karakterizasyonları ile ilgili sınırlı sayıda kaynak mevcuttur [142, 161]. Ayrıca Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Cd, Hg ve Sb dirençli *D. tsuruhatensis*, *P. koreensis* ve *A. johnsonii* suşlarının FISH yöntemiyle populasyon yayılımlarının belirlenmesi ile biyoremediasyonda etkin olabilecek suşların doğa şartlarında tespitinin yapılabilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Taylan Z.S., Özkoç H.B, Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biyokullanılabilirliği. BAÜ FBE Derg., 9 (2), 17-33, 2007.
- [2] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., Microbial resistance to metals in the enviroment, Ecotoxicol Environ Saf., 45 (3): 198-207, 2000.
- [3] Rainbow, P.S., Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment, Mar Pollut Bull., 31: 183-192, 1995.
- [4] De Jaysankar, Ramaiah, N. and L. Vardanyan, Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury, Mar Biotech., 10: 471-477, 2008.
- [5] Kılıç, N. K., Dönmez, G., Mikroorganizmalarda ağır metal stresine yanıtın proteom analizi ile araştırılması, Elekt Mikrobiyol Derg., 6: 27-33, 2008.
- [6] Çavuşoğlu, K., Gündoğan Y., Çakır Arıca Ş., Kırındı T., *Mytilus* sp. (midye), *Gammarus* sp. (nehir tırnağı) ve *Cladophora* sp. (yeşil alg) örnekleri kullanılarak Kızılırmak Nehri'ndeki ağır metal kirliliğın araştırılması, BAÜ FBE Derg., 9 (1): 52-60, 2007.
- [7] Watanabe, K., Microorganisms relevant to bioremediation, Current Opin Biotechnol., 12: 237-241, 2001.
- [8] A. K. Halkman, M. Atamer, A.H. Ertaş, Endüstri ve çevre ilişkileri, TMMOB ZMO Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, 2: 1029-1047, 2000.
- [9] Yiğit, N., Peyniraltı Suyundan Sürekli Sistemde Biyogaz Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2007.

- [10] Rajbansshi, A., Study on heavy metal resistant bacteria in Guheswori Sewage treatment plant, *Our Nature*, 6: 52-57, 2008.
- [11] Kabaş, N. G., Modifiye Edilmiş Pomza ile Ağır Metal Uzaklaştırılması Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2007.
- [12] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I, *Metalurji*, 136, 2009.
- [13] Gadd, G.M., Heavy metal pollutants: Environmental and biotechnological aspects. *In: Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press Inc, California, 1992.
- [14] Davis, B., Identification and Characterization of Bacterial Genes Associated with Resistance to and/or Degradation of Environmental Pollutants, A Thesis of Doctor Of Philosophy, School of Engineering and Science Victoria University, Australia, 2011.
- [15] McKay, G., Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters, CRC Press, USA, 1996.
- [16] Siegel, F. R., Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals, Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2002.
- [17] Gültekin, A. H., Nadir metal yatakları jeolojisi, LT.Ü. Maden Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği, Sayı: 52, 1998.
- [18] Çicek, A. ve Koparal, A.S., Porsuk Baraj Gölü'nde yaşayan *Cyprinus carpio* ve *Barbus plebejus*'da kurşun, krom ve kadmiyum seviyeleri, *Ekoloji Çevre Derg.*, 39: 3-6, 2001.
- [19] Jarup, L., and Akesson, A., Current status of cadmium as an environmental health problem., *Toxicol Appl Pharmacol.*, 238 (3), 201-208, 2009.

- [20] Narita, M., Chiba, K., Nishizawa, H., Ishii, H., Huang, C.C., Kawabata, Z., Silver, S. and Endo, G., Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay, FEMS Microbiol. Lett., 223: 73-82, 2003.
- [21] Bingham, Eula; Cohrssen, Barbara.; Powell, Charles H., "Patty's Toxicology (5th Edition) Toxicological Issues Related to Metals: Neurotoxicolgy and Radiation Metals and Metal Compounds", Vol II, ISBN: 0-471-31943-0, John Wiley & Sons, 2001.
- [22] Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu Metal Madenler Alt Komisyonu Kurşun-Çinko-Kadmiyum Çalışma Grubu Raporu, Yayın No: DPT: 2412-ÖİK: 473, Ankara, 2001.
- [23] Shotyk, W., Krachler, M., Chen, B., Anthropogenic impacts on the biogeochemistry and cycling of antimony, Met Ions Biol Syst., 44: 171-203, 2005.
- [24] Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X. and Matis, K.A., Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils, Process Biochem., 39: 909-916, 2004.
- [25] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M. and Van Til, M., Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameters, Biol Fertil Soils, 17: 177-184, 1994.
- [26] Yıldız, N., Toprak ve Bitki Ekosistemindeki Ağır Metaller. ZT-531. Yüksek Lisans Ders Notları, Erzurum, 2004.
- [27] Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M, Pehlivan, M., Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri, Alınteri Zirai Bilimer Derg., 17(2), 14-26, 2009.



- [28] Goyer, R. A., Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York, 1032, 1991.
- [29] Schmidt, J.P., Understanding phytotoxicity threshold for trace elements in land applied sewage sludge, *J. Environmental Qual.*, 26: 4-10, 1997.
- [30] Pinto, E., Teresa, C.S.S., Maria, A.S.L., Oswaldo, K.O., David, M. and Pio, C., Heavy metal induced oxidative stress in algae, *J. Phycol.*, 39: 1008-1018, 2003.
- [31] Meagher, R.B., Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants, C. Op. In *Plant Biol.*, 3: 153-162, 2000.
- [32] Silver, S., Phung, L.T., Bacterial heavy metal resistance: new surprises, *Annu Rev Microbiol.*, 50: 753-789, 1996.
- [33] Nies, D.H., Microbial heavy metal resistance, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 51: 730-750, 1999.
- [34] Nies, D.H. and Silver, S., Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances, *J Ind Microbiol*, 14: 186-199, 1995.
- [35] Crupper, S. S., Worrell, V., Stewart, G. C. and Iandolo, J. J., Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol*, 181: 4071-4075, 1999.
- [36] Acevedo, F., The use of bioreactors in biomining processes, *Electron. J. Biotechnol.*, 3: 184-194, 2000.
- [37] Kachur, A.V., Koch, C.J. and Biaglow, J.E., Mechanism of coppercatalyzed oxidation of glutathione, *Free Radic Res.*, 28: 259-269, 1998.

- [38] Katalay, S., ve Parlak, H., Su Kirliliğinin, *Gobius niger* Linn., 1758 (Pisces: Gobiidae)'in kan parametreleri üzerine etkileri. E.Ü. Su Ürünleri Derg., 19 (1-2): 115-121, 2002.
- [39] Aydoğdu, N., Erbaş, H., Kaymak, K., Taurin, melatonin ve N-asetil sisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri, Trakya Üni. Tıp Fak. Derg., 24 (1): 43-48, 2007.
- [40] Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejcova, L., Trnkova, L., Adam, V., Hubalek, J., Kynicky, J., Vrba, R., Kizek, R., Bio-Sensing of cadmium (II) ions using *Staphylococcus aureus*, Sensors, 11: 10638-10663, 2011.
- [41] Wagner-Dobler, I., Von Canstein, H. F. , Li, Y., Timmis, K. N. and Deckwater, W.-D., Removal of mercury from chemical wastewater by microorganism in technical scale, Environ. Sci. Technol., 34: 4628-4634, 2000.
- [42] Broussard, LA., The Toxicology of Mercury, Laboratory Medicine, 8 (33): 614-625, 2002.
- [43] Giri, S., Isolation and Biochemical Characterization of Mercury Resistant Bacteria (Mrb) from Soil Samples of Industrially Contaminated Area of Rourkela, Orissa, MSc Thesis, Department of Life Science National Institute of Technology, Orissa, 2011.
- [44] Barkay, T., Miller, S. M., and Summers, A. O., Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, FEMS Microbiol. Rev., 27, 355–384, 2003.
- [45] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), U.S. Public Health Service, Toxicological Profile for Antimony and Compounds, 1992.
- [46] Bosecker, K., Microbial leaching in environmental clean-up programmes. Hydrometallurgy, 59: 245-248, 2001.

- [47] Nuhoglu, Y. and Oguz, E., Removal of copper (II) from aqueous solutions by biosorption on the cone biomass of *Thuja orientalis*, *Process Biochem.*, 38: 1627-1631, 2003.
- [48] Gupta, A., Morby, A.P., Turner, J.S., Whitton, B.A., Robinson, N.J., Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1), *Mol Microbiol.*, 7: 189-195, 1993.
- [49] Iqbal, M. and Edyvean, R.G.J., Biosorption of lead, copper and zinc on loof a sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*, *Miner Eng.*, 17: 217-223, 2004.
- [50] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells, *Environ Int.*, 30: 261-278, 2004.
- [51] Ozturk, A., Artan, T. and Ayar, A., Biosorption of nickel (II) and copper (II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Colloids Surf B Biointerfaces*, 34: 105-111, 2004.
- [52] Ji, G., Silver, S., Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern, *J Ind Microbiol.*, 14 (2): 61-75, 1995.
- [53] Spain, A. and Alm, E., Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment, *Reviews in Undergraduate Research*, 2: 1-6, 2003.
- [54] Gadd, G.M., Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation, *Mycol Res.*, 111 (1): 3-49, 2007.
- [55] Li, Z., Yuan, H., Hu, X., Cadmium-Resistance in Growing *Rhodotorula* sp. Y11, *Bioresour Technol.*, 99: 1339-1344, 2008.

- [56] Zhang, Y., Zhang, H., Li, X., Su, Z., Zhang, C., The *cadA* gene in cadmium-resistant bacteria from cadmium-polluted soil in the Zhangshi area of Northeast China, *Curr Microbiol.*, 56: 236-239, 2008.
- [57] Sharma, J. and Fulekar, M.H., Identification of potential strain –*Buttiauxella izardii* DSM 9397 for remediation of cadmium, *Innovative Romania Food Biotech.*, 4: 16-23, 2009.
- [58] Endo, G. and Silver, S., CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258, *J Bacteriol.*, 177 (15): 4437-4441, 1995.
- [59] Schmidt, T. and Schlegel, H.G., Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *Ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A, *J Bacteriol.*, 176: 7045-7054, 1994.
- [60] Liebert, C.A., Hall, R.M. and Summers, A.O., Transposon Tn21, flagship of the floating genome, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 507-522, 1999.
- [61] Wagner-Döbler, I., Lünsdorf, H., Lübbehüsen, T., Von Canstein, H.F. and Li, Y., Structure and species composition of mercury-reducing biofilms, *Appl Environ Microbiol.*, 66: 4559-4569, 2000.
- [62] Lin, C.C., Yee, N. and Barkay, T., Microbial transformations in the mercury cycle, *Environ Chem and Toxicol of Mercury*, 155-191, 2012.
- [63] Deckwer, W.D., Becker, F.U., Ledakowicz, S. and Dobler, I.W., Microbial removal of ionic mercury in a three phase fluidized bed reactor, *Environ. Sci. Technol.*, 38: 1858-1865, 2004.
- [64] Hamlett, N.V., Landale, E.C., Davis, B.H. and Summer, A.O., Roles of the Tn21 *merT*, *merP*, and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding, *J. Bacteriol.*, 174: 6377-6385, 1992.

- [65] Rojas, LA., Yáñez, C., González, M., Lobos, S., Smalla, K., Seeger, M., Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 Generated for mercury bioremediation, Plos One 6 (3): 1-10, 2011.
- [66] Nascimento, AM., Chartone-Souza, E., Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments, Genet Mol Res., 31; 2 (1): 92-101, 2003.
- [67] Carlin, A., Shi, W., Dey, S. and Rosen, B. P., The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance, J. Bacteriol., 177 (4): 981-986, 1995.
- [68] Rosen, B.P., Biochemistry of arsenic detoxification, FEBS Letter, 529: 86-92, 2002.
- [69] Rosen, P.B., Bacterial resistance to heavy metals and metalloids, J Biol Chem., 1 (4): 273-277, 1996.
- [70] Silver, S., Bacterial resistances to toxic metals, Gene, 179: 9-19, 1996.
- [71] Butcher, BG., Deane, SM., Rawlings, DE., The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol., 66: 1826-1833, 2000.
- [72] Meng, Y., Rosen, BP., As (III) and Sb (III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*, J Biol Chem., 279: 18334-18341, 2004.
- [73] Matyar, F., Eraslan, B., Akkan, T., Kaya, A., Dinçer, S., İskenderun Körfezi balıklarından izole edilen bakterilerde antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin araştırılması, Biyoloji Bil Araştırma Derg., 2 (2): 1-5, 2009.

- [74] Matyar, F., Dinçer, S., Doğu Akdeniz'den izole edilen *Enterococcus faecalis* bakterilerinin antibiyotik ve ağır metal dirençliliği, SDÜ Fen Derg., 5 (2), 2010.
- [75] Ersoy S., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal Katyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğinin Plazmidlerle Olan İlişkinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin, 2007.
- [76] Gilotra, U., Srivastava, S., Plasmid-encoded sequestration of copper by *pseudomonas pickettii* strain US321, Curr Microbiol., 34 (6): 378-381, 1997.
- [77] Salam, A., Abosereh, N. A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M., Resistance plasmids of indigenous *Pseudomonas* in Egypt, J Appl Sci Res., 3: 873-878, 2007.
- [78] 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, Biotech., 9: 1-8, 2010.
- [79] Elsayed, E.H. and Elbestawy, E., Molecular characterization of soil microorganisms: Effect of industrial pollution on distribution and biodiversity, World J. Microbiol. Biotech., 2: 215-224, 2008.
- [80] Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. and Naidu, R., The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water, Environ. Int., 34: 265-276, 2008.
- [81] Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. and Liu, H. W., PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells, Appl Environ Microbiol., 69 (8): 4502-4510, 2003.

- [82] Öztürk, F., Ankara'daki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara, 2007.
- [83] Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane D. J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, J Bacteriol., 91: 697-703, 1991.
- [84] Çetinkaya, E., Ayhan, K., Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler, Karaelmas Fen ve Mühendislik Derg., 2 (1): 53-62, 2012.
- [85] Cole, JR., Chai, B., Marsh TL, Farris RJ., Wang, Q., Kulam, SA., Chandra, S., McGarrell, DM., Schmidt, TM., Garrity, GM., Tiedje, JM., The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy, Nucleic Acids Res., 31: 442-443, 2003.
- [86] Şahin, N., Türkiye'de Yetişen *Serratula* L. (*Asteraceae*) Cinsine Ait Taksonların ITS nrDNA ve *TrnL*-F CpDNA Dizileriyle Moleküler Sistemantik Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 2011.
- [87] Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/ tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Ün. Fen Bil. Enst. Derg., 27(1): 62-74, 2011.
- [88] Freeman, S. and Herron, J. C. 1999. Evrimsel Analiz. (8. Baskıdan çeviri) Çıplak, B., Başıbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 838 s. 2009.
- [89] Mount, D., Bioinformatics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 7, Phylogenetic prediction, 281, 2001.
- [90] Koban, E., Türkhaygen-I Projesi, Populasyon Genomiği Çalıştay-II, Ankara, 2008.

- [91] Moter, A., Göbel, UB., Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, J Microbiol Methods, 41 (2): 85-112, 2000.
- [92] Slabbinck, B ., From learning taxonomies to phylogenetic learning: Integration of 16S rRNA gene data into FAME-based bacterial classification, PhD Thesis, Ghent University, Ghent, Belgium, 2010.
- [93] Microbial Identification System, MIDI Sherlock, USA.
- [94] Rock, C. O. and Jackowski, S., Forty years of bacterial fatty acid synthesis, Biochem Biophys Res Commun., 292: 1155-1166, 2002.
- [95] Welch, D. F., Applications of cellular fatty acid analysis, Clin Microbiol Rev., 4 (4): 422-438, 1991.
- [96] Kampfer, P. and Kroppenstedt, R. M., Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa, Canadian Microbiol., 42: 989-1005, 1996.
- [97] Sasser, M., Bacterial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC FAME)-MIDI Technical Note, 1990.
- [98] Davoodian, M., Polistiren ile Alifatik Esterlerin Ters Gaz Kromatografisi Yöntemi ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 1994.
- [99] Hışıl, Y., Enstrümental Gıda Analizleri-2 (Gaz, İnce Tabaka, Kolon, Kağıt Kromatografisi ve Elektroforez), Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 4. Baskı, 2004.
- [100] 127. Uygulamalı Gaz Kromatografisi, Dolunay Eğitim Merkezi Laboratuvar Cihazları Eğitimi Kimya Seminerleri, K-Q TSE-ISO-EN 9000.



- [101] Temizkan, G., Arda, N, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, s: 72. İstanbul Üniversitesi BIYOGEM Yayın No. 1, İstanbul, 1999.
- [102] Demiray, E., Yılmaz, O., *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler, Mikrobiyol Bült., 39: 399-408, 2005.
- [103] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol Rev., 59 (1): 143-169, 1995.
- [104] Hoshino, T., Yılmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M., Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH, Appl Environ Microbiol., 74: 5068-5077, 2008.
- [105] Teau, N., Rogers, M., J. D., Bartholomany, C. T., Reardon K. F., Species specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. strain JS150 and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments, Appl Environ Microbiol., 64: 4994-4999, 1998.
- [106] Rogers, S.W., Moorman, T. B., Ong, S.K., Fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil, Soil Science Society of America J., 71 (2): 620-631, 2007.
- [107] Hugenholtz, P., Tyson, GW., Blackall, LL., Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization, Methods Mol Biol., 179: 29-42, 2002.
- [108] Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W., and Schleifer, K.-H., *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*, FEMS Microbiol Lett., 160: 159-168, 1998.

- [109] Cullander, C., Fluorescent probes for confocal microscopy, *Methods in Mol. Biol.*, 122, 59-73, 1999.
- [110] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169, 1995.
- [111] Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, KH., *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides, *Microbiol.*, 140, 2849-58, 1994.
- [112] Amann, RI., Fuchs, BM., Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques, *Nat Rev Microbiol.*, 6: 339-348, 2008.
- [113] Gillan, D. C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., Dubois, P., Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment, *Appl Environ Microbiol.*, 71: 679-690, 2005.
- [114] Simbahan, J., Kurth, E., Schelert, J., Dillman, A., Moriyama, E., Jovanovich, S., Blum, P., Community analysis of a mercury hot spring supports occurrence of domain-specific forms of mercuric reductase, *Appl Environ Microbiol.*, 71: 8836-8845, 2005.
- [115] Nicomrat, D., Dick, WA., Tuovinen, OH., Microbial populations identified by fluorescence *in situ* hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage, *J Environ Qual.*, 35: 1329-1337, 2006.
- [116] Britschgi, T.B., Giovannoni, S.J., Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing, *Appl Environ Microbiol.*, 57, 1707-1713, 1991.

- [117] Edgcomb, V. P., Kysela, D. T., Tekse, A., Gomez, A. V., Sogin, M. L., Benthic eukaryotik diversity in the Guaymas Basin Hydrothermal vent environment, PNAS, 11, 7658-7662, 2002.
- [118] Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, Appl Environ Microbiol., 56: 1919-1925, 1990.
- [119] Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. and Wagner, M., The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, Syst Appl Microbiol., 22, 434-444, 1999.
- [120] Wallner, G., Amann, R., and Beisker, W., Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms, Cytometry, 14: 136-143, 1993.
- [121] Bathe, S., Hausner, M., Design and evaluation of 16S rRNA sequence based oligonucleotide probes for the detection and quantification of *Comamonas testosteroni* in mixed microbial communities, BMC Microbiol., 13, 6: 54, 2006.
- [122] Schmidt-Eisenlohr H., Rittig, M., Preithner, S. and Baron, C., Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trp protein-specific antisera, Environ Microbiol., 3: 720-730, 2001.
- [123] Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K. H., Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring win activated sludge, Appl Environ Microbiol., 60: 792-800, 1994.

- [124] Lo, W., Chua, H., Lam, K.H. and Bi, S.P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass, *Chemosphere*, 39 (15), 2723-2736, 1999.
- [125] Cutting, S.M. and Horn, P.B., Genetic analysis in *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, UK; 27-74, 1990.
- [126] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol.*, 28: 2731-2739, 2011.
- [127] Feliciello, I., Chinali, G., A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*, *Anal Biochem.*, 212 (2): 394-401, 1993.
- [128] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L. R., Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates, *Microbios.*, 86: 143-156, 1996.
- [129] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., Silver R.P., Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K isolates, *Infect Immun.*, 39: 315-335, 1983.
- [130] Laemli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-684, 1970.
- [131] Demiralp, H., Celik, S., Koksel, H., Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing, *European Food Res Tech.*, 211: 322-325, 2000.

- [132] Mukhallad, A. M., Malcolm, P. S., The distribution of heavy-chain isoforms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans, *Biochem J.*, 260: 421-426, 1989.
- [133] Amann, R.I., *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1-15, 1995.
- [134] Içgen, B. and Harrison, S.T.L., Exposure to sulphide causes populations shifts in sulphate-reducing consortia, *Res in Microbiol*, 157 (8), 784-791, 2006.
- [135] Içgen, B., Moosa, S. and Harrison, S.T.L., A study of the relative dominance of selected anaerobic sulphate-reducing bacteria in a continuous bioreactor by fluorescence *in situ* hybridization, *Microbial Ecol.*, 53 (1), 43-52, 2007.
- [136] Içgen, B. and Harrison, S.T.L., Identification of population dynamics in sulphate-reducing consortia on exposure to sulphate by 16S rRNA probing, *Res in Microbiol.*, 157 (10), 922-927, 2006.
- [137] Li, B., Irvin, S., Baker, B., The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low/mid/high concentrated wastewater, *J Environ Engin Science*, 6, 651-663, 2007.
- [138] Mahvi, A. H. and Diels, L., Biological removal of cadmium by *Alcaligenes eutrophus* CH34, *Int J Environ Sci and Tech.*, 1: 3, 199-204, 2004.
- [139] Puskarova A., Polek B., Ferienc P., Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge, *Biologia, Bratislava*, 59: 6, 817-827, 2004.

- [140] Keramati, P., Hoodaji, M., Tahmourespour, A., Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent, *Afr. J. of Microbiol. Res.*, 5 (7): 831-837, 2011.
- [141] Horn, JM., Brunke, M., Deckwer., WD., Timmis, KN., *Pseudomonas putida* strains which constitutively overexpress mercury resistance for ioremediation of organomercurials pollutants, *Appl Environ Microbiol.*, 60: 357-362, 1994.
- [142] Li, J., Wang, Q., Zhang, S., Qin, D., Wang, G., Phylogenetic and genome analyses of antimony-oxidizing bacteria isolated from antimony mined soil, *Int Biodeter and Biodeg.*, 76,76-80, 2013.
- [143] Adıguzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Gulluce,M., Belduz, A. O., Barış. Ö., Molecular diversity of thermophilic bacteria solated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey), *Turk J Biol.*, 35, 267-274, 2011.
- [144] Markowicz, A., Płociniczak,T., Piotrowska-Seget, Z., Response of Bacteria to Heavy Metals Measured as Changes in FAME Profiles, *Polish J Environ Stud.*, 19: 5, 957-965, 2010.
- [145] Luo, G., Shi, Z., Wang, H., Wang, G., *Skermanella stibiirensistens* sp. nov., a highly antimony resistant bacterium isolated from coal mining soil, and emended description of the genus of *Skermanella*, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 62: 6, 1271-1276, 2012.
- [146] Zhang, W., Chen, L. and Liu, D., Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction, *Appl Microbiol Biotech.*, 93: 1305-1314, 2012.

- [147] Mondragon, V.A., Damaris-Perez, F., Gladis L.E., Gonzalez-Guzman, Antonio, R., Marquez-Gonzalez, R., Padilla-Noriega, Avelar, J.D., Franco, B., Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico, *Environ Monit Assess*, 183: 329-340, 2011.
- [148] Silvestry-Rodriguez,, N., Ruleas-Sicairos, E.E., Gerba, C.P., Bright, K.K., Silver as a disinfectant, *Rev Environ Contam Toxicol.*, 191: 23-45, 2007.
- [149] Turalı, G., Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.
- [150] Edward Raja, C., Selvam, G.S., Characterization of chromosomal mediated cadmium resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strain BC15, *J Basic Microbiol.*, 51, 1-9, 2011.
- [151] Zeng X., et al., Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg<sup>+2</sup> Resisting Strain D<sub>2</sub>, *Trans Nonferrous Met Soc.*, 20, 507-512, 2010.
- [152] Mindlin, SZ., et al., Horizontal transfer of mercury resistance genes in natural bacterial populations, *Mol Biol (Mosk.)*, 36(2):216-227, 2002.
- [153] Ogunseitan OA., Episodic bioavailability of environmental mercury: Implications for the biotechnological control of mercury pollution. *Afr. J. Biotech.*, 1: 1-9, 2002.
- [154] Cervantes, C., Chávez, J., Plasmid-determined resistance to arsenic and antimony in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 61: 333-337, 1992.

- [155] Rosenstein, R., Peschel, A., Wieland, B. and Götz, F., Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid psx267, J Bacteriol., 174: 11, 3676-3683, 1992.
- [156] Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., Gade, W.N., Role of Proteins in Resistance Mechanism of *Pseudomonas fluorescens* Against HeavyMetal Induced Stress with Proteomics, Approach J Biotech., 126: 374-382, 2006.
- [157] Laplace, J.M., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y., Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals, Appl Microbiol Biotechnol., 53: 685-689, 2000.
- [158] Wang, W.J., Deckwer, W., Wagner-Dobler, I., Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis, J Biotech., 132: 469-480, 2007.
- [159] Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., Andreoni, V., Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics, Syst Appl Microbiol., 33: 3, 154-164, 2010.
- [160] Elsayed, E.H., Elbestawy, E., Molecular characterization of soil microorganisms: Effect of industrial pollution on distribution and biodiversity, World J. Microbiol. Biot., 2: 215-224, 2008.
- [161] Aktan, Y., Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.



# EKLER

## EK-1

**Çizelge 1. Cd 11-3 suşu ve diğer bakterilerin 16S rRNA bölgelerinin hizalama sonuçları**

6-C. odontotermitis	-----TGGCGGCATGCTTTAC-CATGCAAGTCGAA	29
8-C. composti	-----GCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	45
1-Cd 11-3	-----AAGTCGTACGAGAGTAGAC--AG	21
2-D. tsuruhatensis	-----ATTG-AACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	40
3-D. acidovorans	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	59
4-Delftia sp.	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	59
5-D. acidovorans	--AGTTTGATCCTGGCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	57
9-G. kuznetsovii	-----GGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	26
10-G. anulus	-----TCCTGGCTCAGATTAGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	51
11-A. ebreus	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	59
7-C. delicatus	-----TTCATGGCTCAGATT-GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAA	51
	* * * * *	
6-C. odontotermitis	CGGCAGCAT---GGGCTTCGGCCTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	85
8-C. composti	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-TGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	99
1-Cd 11-3	CGCTG-----CTTAGGA-CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAAGTAATACATCGG	70
2-D. tsuruhatensis	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	94
3-D. acidovorans	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	113
4-Delftia sp.	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	113
5-D. acidovorans	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	111
9-G. kuznetsovii	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-TGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	80
10-G. anulus	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-TGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	105
11-A. ebreus	CGGTAACA----GGTCTTCGGA-TGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGG	113
7-C. delicatus	CGGCAGCAGGGGAGTAATC--C-TGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATATATCGG	107
	** * * * * *	
6-C. odontotermitis	AACGTGCCTGGTAGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGATCTA	145
8-C. composti	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGAAGTC	159
1-Cd 11-3	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTCAGCATAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTG	130
2-D. tsuruhatensis	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTG	154
3-D. acidovorans	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTG	173
4-Delftia sp.	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTG	173
5-D. acidovorans	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTG	171
9-G. kuznetsovii	AACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGATCTA	140
10-G. anulus	AACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACGATCTA	165
11-A. ebreus	AACGTGCCGATCGTGGGGGATAACGAGCGAAAGCTTTGCTAATACCGCATACGATCTA	173
7-C. delicatus	AACGTGCCAGTGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGCTACGCTAATACCGCATACGATCTA	167
	***** * * * * * *	
6-C. odontotermitis	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCCTACTAGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	205
8-C. composti	AGGTTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	219
1-Cd 11-3	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGGGCCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	190
2-D. tsuruhatensis	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGGGCCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	214
3-D. acidovorans	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGGGCCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	233
4-Delftia sp.	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGGGCCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	233
5-D. acidovorans	AGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGGGCCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	231
9-G. kuznetsovii	CGGATGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTCGGCGAATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	200
10-G. anulus	CGGATGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTCGGCGAATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	225
11-A. ebreus	CGGATGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTCGGCGAATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGG	233
7-C. delicatus	TGGATGAAAGCAGGGGATCGAAGACCTTCGGCGGATGGAGCGGCCGATATCAGATTAGG	227
	** * * * * *	
6-C. odontotermitis	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	265
8-C. composti	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	279
1-Cd 11-3	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	250
2-D. tsuruhatensis	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	274
3-D. acidovorans	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	293
4-Delftia sp.	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	293
5-D. acidovorans	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	291
9-G. kuznetsovii	TAGTTGGTAGGGTAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	260
10-G. anulus	TAGTTGGTAGGGTAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	285
11-A. ebreus	TAGTTGGTAGGGTAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC	293
7-C. delicatus	TAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACC	287
	***** * * * * *	

6-C. odontotermis AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 325  
8-C. composti AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 339  
1-Cd 11-3 AGCCACACTGGGGAACGTACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 310  
2-D. tsuruhatensis AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 334  
3-D. acidovorans AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 353  
4-Delftia sp. AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 353  
5-D. acidovorans AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 351  
9-G. kuznetsovii AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 320  
10-G. anulus AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 345  
11-A. ebreus AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 353  
7-C. delicatus AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT 347  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 385  
8-C. composti GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 399  
1-Cd 11-3 GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCG-CGAGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 369  
2-D. tsuruhatensis GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 394  
3-D. acidovorans GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 413  
4-Delftia sp. GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 413  
5-D. acidovorans GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 411  
9-G. kuznetsovii GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 380  
10-G. anulus GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 405  
11-A. ebreus GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 413  
7-C. delicatus GGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTG 407  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAA-GCTTCTGGTTAATACCTGGGAGTGCATGACGGTA 444  
8-C. composti TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAA-GCTTCTCTAATACAGAAGGGTGCATGACGGTA 458  
1-Cd 11-3 TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCT-TCTAATACAGGGGCCATGACGGTA 428  
2-D. tsuruhatensis TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCT-TCTAATACAGGGGCCATGACGGTA 453  
3-D. acidovorans TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-CCTAATACAGAGGCCATGACGGTA 472  
4-Delftia sp. TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-CCTAATACAGAGGCCATGACGGTA 472  
5-D. acidovorans TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-CCTAATACAGAGGCCATGACGGTA 470  
9-G. kuznetsovii TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-TCTAATACAGAGGCCATGACGGTA 439  
10-G. anulus TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-TCTAATACAGAGGCCATGACGGTA 464  
11-A. ebreus TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-TCTAATAAGAGGGGTGCATGACGGTA 472  
7-C. delicatus TAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTTCT-TCTAATACAGGGGCCATGACGGTA 466  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 504  
8-C. composti CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 518  
1-Cd 11-3 CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 488  
2-D. tsuruhatensis CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 513  
3-D. acidovorans CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 532  
4-Delftia sp. CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 532  
5-D. acidovorans CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 530  
9-G. kuznetsovii CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 499  
10-G. anulus CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 524  
11-A. ebreus CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 532  
7-C. delicatus CCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAA 526  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGAGGTGA 564  
8-C. composti GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTGTAAGACAGTGGTGA 578  
1-Cd 11-3 GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGA 548  
2-D. tsuruhatensis GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGA 573  
3-D. acidovorans GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGA 592  
4-Delftia sp. GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGA 592  
5-D. acidovorans GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGAGGTGA 590  
9-G. kuznetsovii GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGAGGTGA 559  
10-G. anulus GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGAGGTGA 584  
11-A. ebreus GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTGTAAGACAGAGGTGA 592  
7-C. delicatus GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGA 586  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCATGGCTAGAGTACGGCAGAG 623  
8-C. composti AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCAAGGCTGGAGTACGGCAGAG 637  
1-Cd 11-3 AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGT-TGTCGATTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAG 607  
2-D. tsuruhatensis AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAG 632  
3-D. acidovorans AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGT-GACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAG 651  
4-Delftia sp. AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGT-GACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAG 651  
5-D. acidovorans AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTNT-ACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAG 649  
9-G. kuznetsovii AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCAACGCTAGAGTACGGCAGAG 618  
10-G. anulus AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCAACGCTAGAGTACGGCAGAG 643  
11-A. ebreus AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGT-GACTGCAAGGCTGGAGTACGGCAGAG 651  
7-C. delicatus AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGT-GACTGCATAGCTAGAGTACGGCAGAA 645  
\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 682  
8-C. composti GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 696  
1-Cd 11-3 GGGGATGGTACACTGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGGAGGAACACCCGATGG 667  
2-D. tsuruhatensis GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 691  
3-D. acidovorans GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 710  
4-Delftia sp. GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 710  
5-D. acidovorans GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 708  
9-G. kuznetsovii GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 677  
10-G. anulus GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 702  
11-A. ebreus GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 710  
7-C. delicatus GGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGG-AGGAACACCCGATGG 704  
\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 740  
8-C. composti CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 754  
1-Cd 11-3 CGAAGGCAATCCCCTGGGACCTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGGAGCAAAAC 727  
2-D. tsuruhatensis CGAAGGCAATCCCCTGG-ACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 749  
3-D. acidovorans CGAAGGCAATCCCCTGG-ACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 768  
4-Delftia sp. CGAAGGCAATCCCCTGG-ACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 768  
5-D. acidovorans CGAAGGCAATCCCCTGG-ACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 766  
9-G. kuznetsovii CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 735  
10-G. anulus CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 760  
11-A. ebreus CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 768  
7-C. delicatus CGAAGGCAATCCCCTGG-GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG-AGCAAAC 762  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 799  
8-C. composti AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 813  
1-Cd 11-3 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 786  
2-D. tsuruhatensis AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 808  
3-D. acidovorans AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 827  
4-Delftia sp. AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 827  
5-D. acidovorans AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGAATTA 825  
9-G. kuznetsovii AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGCTTTC 794  
10-G. anulus AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGCTTTC 819  
11-A. ebreus AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGCTTTC 827  
7-C. delicatus AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTG-GTTGTTGGGCTTTC 821  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis ACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 859  
8-C. composti ACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 873  
1-Cd 11-3 GTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 845  
2-D. tsuruhatensis GTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 868  
3-D. acidovorans GTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 887  
4-Delftia sp. GTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 887  
5-D. acidovorans GTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 885  
9-G. kuznetsovii ACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 854  
10-G. anulus ACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 879  
11-A. ebreus ACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 887  
7-C. delicatus ACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG 881  
\* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 917  
8-C. composti TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 931  
1-Cd 11-3 TTGAAACTCAAAGGTGAAT--CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 902  
2-D. tsuruhatensis TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 926  
3-D. acidovorans TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 945  
4-Delftia sp. TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 945  
5-D. acidovorans TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 943  
9-G. kuznetsovii TTAAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 912  
10-G. anulus TTAAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 937  
11-A. ebreus TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 945  
7-C. delicatus TTGAAACTCAAAGG--AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATT 939  
\*\* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 977  
8-C. composti CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAATCCTTTAGAGATAGAG 991  
1-Cd 11-3 CGATGCAACGCGAAAAACCTATCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 962  
2-D. tsuruhatensis CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGGAGTTTCCAGAGATGGAT 986  
3-D. acidovorans CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 1005  
4-Delftia sp. CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 1005  
5-D. acidovorans CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 1003  
9-G. kuznetsovii CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGAAATCCTTTAGAGATAGAG 972  
10-G. anulus CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGAAATCCTTTAGAGATAGAG 997  
11-A. ebreus CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGAT 1005  
7-C. delicatus CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAAGTTTCCAGAGATGGTT 999  
\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*

6-C. odontotermis TGGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTG 1037  
8-C. composti GAGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTG 1051

1-Cd 11-3 TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1022

2-D. tsuruhatensis TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1046

3-D. acidovorans TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1065

4-Delftia sp. TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1065

5-D. acidovorans TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1063

9-G. kuznetsovii GAGTGTCTCGAAAGAGAATCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1032

10-G. anulus GAGTGTCTCGAAAGAGAATCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1057

11-A. ebreus TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1065

7-C. delicatus TCGTGTCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTG 1059

\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-C. odontotermis AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACG---AAA 1093

8-C. composti AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1111

1-Cd 11-3 AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1082

2-D. tsuruhatensis AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1106

3-D. acidovorans AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1125

4-Delftia sp. AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1125

5-D. acidovorans AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1123

9-G. kuznetsovii AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1092

10-G. anulus AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1117

11-A. ebreus AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTAC---GAAA 1121

7-C. delicatus AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAAGTT 1119

\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1153

8-C. composti GAGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1171

1-Cd 11-3 GAGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1142

2-D. tsuruhatensis GAGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1166

3-D. acidovorans GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1185

4-Delftia sp. GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1185

5-D. acidovorans GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1183

9-G. kuznetsovii GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1152

10-G. anulus GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1177

11-A. ebreus GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1181

7-C. delicatus GGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC 1179

\* \* \* \* \*

6-C. odontotermis TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1213

8-C. composti TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1231

1-Cd 11-3 TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1202

2-D. tsuruhatensis TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA 1226

3-D. acidovorans TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA 1245

4-Delftia sp. TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA 1245

5-D. acidovorans TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA 1243

9-G. kuznetsovii TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1212

10-G. anulus TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1237

11-A. ebreus TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA 1241

7-C. delicatus TCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGGGTTGCCA 1239

\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1273

8-C. composti ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1291

1-Cd 11-3 ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1262

2-D. tsuruhatensis ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1286

3-D. acidovorans ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1305

4-Delftia sp. ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1305

5-D. acidovorans ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGTTCGCAGTCTGCAACT 1303

9-G. kuznetsovii ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1272

10-G. anulus ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1297

11-A. ebreus ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1301

7-C. delicatus ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT 1299

\*\*\*\*\*

6-C. odontotermis CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1333

8-C. composti CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1351

1-Cd 11-3 CGACTGCGTGAAGTCGCGAGACTTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGCT 1322

2-D. tsuruhatensis CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTT 1346

3-D. acidovorans CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTT 1365

4-Delftia sp. CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTT 1365

5-D. acidovorans CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTT 1363

9-G. kuznetsovii CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1332

10-G. anulus CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1357

11-A. ebreus CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1361

7-C. delicatus CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT 1359

\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-C. odontotermis CCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTA 1393

8-C. composti CCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTA 1411

1-Cd 11-3 CTCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTA 1382

2-D. tsuruhatensis CCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTA 1406



2-P. koreensis CCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAG 157  
3-P. moraviensis CCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAG 178  
1-Hg 10-2 CCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAG 131  
\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 221  
7-P. cedrina AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 234  
9-P. libanensis AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 234  
10-P. gessardii AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 234  
11-P. migulae AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 234  
5-P. vancouverensis AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 221  
8-P. jessenii AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 221  
4-P. reinekei AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 234  
2-P. koreensis AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 217  
3-P. moraviensis AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 238  
1-Hg 10-2 AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGAIAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG 191  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 281  
7-P. cedrina GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 294  
9-P. libanensis GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 294  
10-P. gessardii GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 294  
11-P. migulae GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 294  
5-P. vancouverensis GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 281  
8-P. jessenii GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 294  
4-P. reinekei GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 281  
2-P. koreensis GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 277  
3-P. moraviensis GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 298  
1-Hg 10-2 GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC 251  
\*\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 341  
7-P. cedrina ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 354  
9-P. libanensis ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 354  
10-P. gessardii ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 354  
11-P. migulae ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 354  
5-P. vancouverensis ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 341  
8-P. jessenii ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 354  
4-P. reinekei ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 341  
2-P. koreensis ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 337  
3-P. moraviensis ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 358  
1-Hg 10-2 ACCTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 310  
\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 401  
7-P. cedrina TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 414  
9-P. libanensis TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 414  
10-P. gessardii TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 414  
11-P. migulae TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 414  
5-P. vancouverensis TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 401  
8-P. jessenii TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 414  
4-P. reinekei TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 401  
2-P. koreensis TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 397  
3-P. moraviensis TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 418  
1-Hg 10-2 TGGGCGAAAGCCTGACTAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCCGATTGTAAGC 370  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 460  
7-P. cedrina ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 473  
9-P. libanensis ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 473  
10-P. gessardii ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 473  
11-P. migulae ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 473  
5-P. vancouverensis ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 460  
8-P. jessenii ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGNNTAGNTAATACTN-TGCNNTTTTGACGTTACCGACA 473  
4-P. reinekei ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 460  
2-P. koreensis ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 456  
3-P. moraviensis ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTAATGCA-TTTTGACGTTACCGACA 477  
1-Hg 10-2 ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTC-TGCAATTTTGACGTTACCGACA 429  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

6-P. cedrina GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 520  
7-P. cedrina GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 533  
9-P. libanensis GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 533  
10-P. gessardii GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 533  
11-P. migulae GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 533  
5-P. vancouverensis GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 520  
8-P. jessenii GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 533  
4-P. reinekei GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 520  
2-P. koreensis GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 516  
3-P. moraviensis GAATAAGCACCCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA 537

1-Hg 10-2 GAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGGTCAAGCGT-A 488  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 580  
 7-P. cedrina ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 593  
 9-P. libanensis ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 593  
 10-P. gessardii ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTAGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 593  
 11-P. migulae ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 593  
 5-P. vancouverensis ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCC 580  
 8-P. jessenii ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCC 593  
 4-P. reinekei ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 580  
 2-P. koreensis ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 576  
 3-P. moraviensis ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC 597  
 1-Hg 10-2 ATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGTGGTTTAAAGTTGGATGTGAAATCCC 548  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 640  
 7-P. cedrina CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 653  
 9-P. libanensis CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 653  
 10-P. gessardii CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 653  
 11-P. migulae CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 653  
 5-P. vancouverensis CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 640  
 8-P. jessenii CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 653  
 4-P. reinekei CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 640  
 2-P. koreensis CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 636  
 3-P. moraviensis CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 657  
 1-Hg 10-2 CGGGCTCAACCTGGGAAGCTATCCAAAGTACTGACTGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGTG 608  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 698  
 7-P. cedrina GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 711  
 9-P. libanensis GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 711  
 10-P. gessardii GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 711  
 11-P. migulae GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 711  
 5-P. vancouverensis GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 698  
 8-P. jessenii GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 711  
 4-P. reinekei GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 698  
 2-P. koreensis GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 694  
 3-P. moraviensis GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGG-AACACCAGTGG-CGAAGG 715  
 1-Hg 10-2 GAATTTCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGGAACACCAGTGGCGGAAGG 668  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina CGACCACCTGG-ACCAACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 755  
 7-P. cedrina CGACCACCTGG-ACCAACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 768  
 9-P. libanensis CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 768  
 10-P. gessardii CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 768  
 11-P. migulae CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 768  
 5-P. vancouverensis CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 755  
 8-P. jessenii CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 768  
 4-P. reinekei CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 755  
 2-P. koreensis CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 751  
 3-P. moraviensis CGACCACCTGG-ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG-AGCAAA-CAGGAT 772  
 1-Hg 10-2 CGACCACCTGGGAATCAT-CTGACACCTAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGAT 727  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 814  
 7-P. cedrina TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 827  
 9-P. libanensis TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 827  
 10-P. gessardii TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 827  
 11-P. migulae TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 827  
 5-P. vancouverensis TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 814  
 8-P. jessenii TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 827  
 4-P. reinekei TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 814  
 2-P. koreensis TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 810  
 3-P. moraviensis TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 832  
 1-Hg 10-2 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCC-TTGAGC 787  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 874  
 7-P. cedrina TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 887  
 9-P. libanensis TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 887  
 10-P. gessardii TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 887  
 11-P. migulae TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 887  
 5-P. vancouverensis TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 874  
 8-P. jessenii TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 887  
 4-P. reinekei TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 874  
 2-P. koreensis TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 870  
 3-P. moraviensis TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA 892  
 1-Hg 10-2 TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGTGATA 847  
 \*\*\*\*\*

6-P. cedrina AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 934  
7-P. cedrina AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 947  
9-P. libanensis AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 947  
10-P. gessardii AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 947  
11-P. migulae AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 947  
5-P. vancouverensis AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 934  
8-P. jessenii AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 947  
4-P. reinekei AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 934  
2-P. koreensis AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 930  
3-P. moraviensis AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 952  
1-Hg 10-2 AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC 907  
\*\*\*\*\*

6-P. cedrina AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 994  
7-P. cedrina AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 1007  
9-P. libanensis AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGC 1007  
10-P. gessardii AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCTAGAGATAGATTGGTGC 1007  
11-P. migulae AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 1007  
5-P. vancouverensis AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 994  
8-P. jessenii AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 1007  
4-P. reinekei AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 994  
2-P. koreensis AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 990  
3-P. moraviensis AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 1012  
1-Hg 10-2 AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC 967  
\*\*\*\*\*

6-P. cedrina CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1054  
7-P. cedrina CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1067  
9-P. libanensis CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1067  
10-P. gessardii CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1067  
11-P. migulae CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1067  
5-P. vancouverensis CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1054  
8-P. jessenii CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1067  
4-P. reinekei CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1054  
2-P. koreensis CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1050  
3-P. moraviensis CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1072  
1-Hg 10-2 CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1027  
\*\*\*\*\*

6-P. cedrina GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1114  
7-P. cedrina GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1127  
9-P. libanensis GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1127  
10-P. gessardii GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1127  
11-P. migulae GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1127  
5-P. vancouverensis GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1114  
8-P. jessenii GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1127  
4-P. reinekei GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1114  
2-P. koreensis GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1110  
3-P. moraviensis GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1132  
1-Hg 10-2 GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCA 1087  
\*\*\*\*\*

6-P. cedrina CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1174  
7-P. cedrina CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1187  
9-P. libanensis CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1187  
10-P. gessardii CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1187  
11-P. migulae CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1187  
5-P. vancouverensis CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1174  
8-P. jessenii CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1187  
4-P. reinekei CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1174  
2-P. koreensis CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1170  
3-P. moraviensis CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1192  
1-Hg 10-2 CTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG 1147  
\* \*\*\*\*\*

6-P. cedrina GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1234  
7-P. cedrina GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1247  
9-P. libanensis GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1247  
10-P. gessardii GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1247  
11-P. migulae GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1247  
5-P. vancouverensis GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1234  
8-P. jessenii GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1247  
4-P. reinekei GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1234  
2-P. koreensis GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG 1230  
3-P. moraviensis GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCG 1252  
1-Hg 10-2 GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCG 1207  
\*\*\*\*\*



6-P. cedrina	CGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1294
7-P. cedrina	CGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1307
9-P. libanensis	CGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1307
10-P. gessardii	CGAGGTGGAGCTAATCCCANAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1307
11-P. migulae	CGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1307
5-P.vancouverensis	CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1294
8-P. jessenii	CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1307
4-P. reinekei	CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1294
2-P. korensis	CGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1290
3-P. moraviensis	CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1312
1-Hg 10-2	CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT	1267
	*****	
6-P. cedrina	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1354
7-P. cedrina	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1367
9-P. libanensis	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1367
10-P. gessardii	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1367
11-P. migulae	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1367
5-P.vancouverensis	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1354
8-P. jessenii	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1367
4-P. reinekei	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1354
2-P. korensis	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1350
3-P. moraviensis	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1372
1-Hg 10-2	GCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG	1327
	*****	
6-P. cedrina	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1414
7-P. cedrina	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1427
9-P. libanensis	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1427
10-P. gessardii	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1427
11-P. migulae	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1427
5-P.vancouverensis	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1414
8-P. jessenii	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1427
4-P. reinekei	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1414
2-P. korensis	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1410
3-P. moraviensis	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGTCTA	1432
1-Hg 10-2	GCCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACACCAGAAGTAGCTAGT---	1384
	*****	
6-P. cedrina	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1474
7-P. cedrina	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1487
9-P. libanensis	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1487
10-P. gessardii	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1487
11-P. migulae	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1487
5-P.vancouverensis	ACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1474
8-P. jessenii	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1487
4-P. reinekei	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1474
2-P. korensis	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGT-----	1455
3-P. moraviensis	ACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT	1492
1-Hg 10-2	-----GCTA-----T	1389
	* **	
6-P. cedrina	AGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
7-P. cedrina	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC---	1516
9-P. libanensis	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC---	1516
10-P. gessardii	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC---	1516
11-P. migulae	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC---	1516
5-P.vancouverensis	AGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
8-P. jessenii	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCA----	1515
4-P. reinekei	AGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
2-P. korensis	-----	
3-P. moraviensis	AGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTC	1524
1-Hg 10-2	AGC-----	1392

### Çizelge 3. Hg 11-4 suşu ve diğer bakterilerin 16S rRNA bölgelerinin hizalama sonuçları

7-P. umsongensis	-----AACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA	39
8-P. mohnii	-----ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA	43
10-P. chlororaphis	-----ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGT	43
11-P. mandelii	----GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGC	56
6-P. jessenii	----GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA	56
4-P. reinekei	-----ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA	43
5-P. vancouverensis	-----ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA	43

2-P. koreensis -----AACGCTGGCGGACGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA 39  
9-P. fulva -----ATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA 55  
3-P. moraviensis GTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA 60  
1-Hg 11-4 -----CCTCCCAGAGTT--AGACTAGCTACTT---CTGG 30  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis TG-AAGAGAGCTTGC-TCTCTGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 96  
8-P. mohnii TG-AAGAGAGCTTGC-TCTCTGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 100  
10-P. chlororaphis AG-AGAGTGTCCACCTTGA-GAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 100  
11-P. mandelii AGCACGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 115  
6-P. jessenii TG-ACAGGAGCTTGC-TCCTGAATTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 113  
4-P. reinekei TG-ACAGGAGCTTGC-TCCTGAATTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 100  
5-P. vancouverensis TG-AAGAGAGCTTGC-TCTCTGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 100  
2-P. koreensis TG-AAAGGAGCTTGC-TCCTGGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 96  
9-P. fulva TG-ACGGGAGCTTGC-TCCTGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 112  
3-P. moraviensis TG-AAAGGAGCTTGC-TCCTGGATTTCAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCCTAGGAATCT 117  
1-Hg 11-4 TG-----CAACCCACTCCCATGGT---GTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGAAACGT 82  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis GCCTGGTAGTGGGGGACAACGCTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 155  
8-P. mohnii GCCTGGTAGTGGGGGACAACGCTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 159  
10-P. chlororaphis GCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 159  
11-P. mandelii GCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 174  
6-P. jessenii GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 172  
4-P. reinekei GCCTGRTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 159  
5-P. vancouverensis GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 159  
2-P. koreensis GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 155  
9-P. fulva GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 171  
3-P. moraviensis GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACTGCTT-ACGGG 176  
1-Hg 11-4 ---TACTACCG----CGACATTCGTTCGCG-ATTACTAGCGATTCCAGCA 133  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 215  
8-P. mohnii AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 219  
10-P. chlororaphis AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 219  
11-P. mandelii AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 234  
6-P. jessenii AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 232  
4-P. reinekei AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 219  
5-P. vancouverensis AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 219  
2-P. koreensis AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 215  
9-P. fulva AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTTGT 231  
3-P. moraviensis AGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT 236  
1-Hg 11-4 GTCGAGTTGCAGAC-TGCGATCC--GGACTAC--GATCGGTTTTA-TGGGATTAGCT--- 184  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 275  
8-P. mohnii TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 279  
10-P. chlororaphis TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 279  
11-P. mandelii TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 294  
6-P. jessenii TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 292  
4-P. reinekei TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 279  
5-P. vancouverensis TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 279  
2-P. koreensis TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 275  
9-P. fulva TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 291  
3-P. moraviensis TGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC 296  
1-Hg 11-4 ---CCACCTCGCGGCTT----GGCAACCCTTTGTA-----CCGAC----- 217  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 335  
8-P. mohnii ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 339  
10-P. chlororaphis ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 339  
11-P. mandelii ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 354  
6-P. jessenii ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 352  
4-P. reinekei ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 339  
5-P. vancouverensis ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 339  
2-P. koreensis ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 335  
9-P. fulva ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 351  
3-P. moraviensis ACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC 356  
1-Hg 11-4 -CATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGC-----CGTAAGG--GCCATGATG---ACTTGAC 266  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongsensis AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 390  
8-P. mohnii AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 394  
10-P. chlororaphis AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 394  
11-P. mandelii AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 409  
6-P. jessenii AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 407  
4-P. reinekei AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 394  
5-P. vancouverensis AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 394  
2-P. koreensis AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 390  
9-P. fulva AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC-----GTGTGTGAAGAAGGCTTCCGGATT 406





7-P. umsongensis TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1108
8-P. mohnii TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1112
10-P. chlororaphis TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1112
11-P. mandelii TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1127
6-P. jessenii TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1125
4-P. reinekei TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1112
5-P. vancouverensis TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1112
2-P. koreensis TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1108
9-P. fulva TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1124
3-P. moraviensis TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGT----GGG 1130
1-Hg 11-4 TTAATTTCTA-----CAACCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGA 1046
\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1164
8-P. mohnii CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1168
10-P. chlororaphis CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1168
11-P. mandelii CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1183
6-P. jessenii CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1181
4-P. reinekei CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1168
5-P. vancouverensis CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1168
2-P. koreensis CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1164
9-P. fulva CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1180
3-P. moraviensis CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA--CGTCAAG--TC 1186
1-Hg 11-4 CCTTCTTACACACGCCCATGGC----TGGATCAGGCTTTCGCCATTTCCAATATTC 1102
\* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1208
8-P. mohnii ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1212
10-P. chlororaphis ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1212
11-P. mandelii ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1227
6-P. jessenii ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1225
4-P. reinekei ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1212
5-P. vancouverensis ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1212
2-P. koreensis ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1208
9-P. fulva ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1224
3-P. moraviensis ATCATGGC-----CCTTACG-GCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG-----GTC 1230
1-Hg 11-4 CCCACTGCTGCCTCCCCTAGGACTGACCGTGTCTCAGTTCAGTTCAGTTGACTGATCATC 1162
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1265
8-P. mohnii GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1269
10-P. chlororaphis GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1269
11-P. mandelii GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1284
6-P. jessenii GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1282
4-P. reinekei GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1269
5-P. vancouverensis GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1269
2-P. koreensis GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1265
9-P. fulva GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1281
3-P. moraviensis GGTACAGAG-GGTTGCCAA--GCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1287
1-Hg 11-4 CTCTCAGACCAGTTACGGATCGTGCCTGGTG-AGCCATTACCTCACCAATAGC-TAAT 1220
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1323
8-P. mohnii CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1327
10-P. chlororaphis CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1327
11-P. mandelii CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1342
6-P. jessenii CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1340
4-P. reinekei CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1327
5-P. vancouverensis CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1327
2-P. koreensis CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1323
9-P. fulva CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1339
3-P. moraviensis CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA--TCGCTAGTAATCGCGAATC 1345
1-Hg 11-4 CCGA--CCTAGGCT-CATCT-GATAGCGCAAGGCCGAAGGTCCTGCTTTCTCCCGT- 1275
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1381
8-P. mohnii AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1385
10-P. chlororaphis AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1385
11-P. mandelii AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1400
6-P. jessenii AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1398
4-P. reinekei AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1385
5-P. vancouverensis AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1385
2-P. koreensis AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1381
9-P. fulva AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1397
3-P. moraviensis AGAATGT-CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC-ACCATGGG 1403
1-Hg 11-4 AGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCC-----TTTCGAACGTTGTCCTCCCACTACCA---- 1326
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

7-P. umsongensis AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT 1441
8-P. mohnii AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT 1445

10-P. chlororaphis	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1445
11-P. mandelii	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1460
6-P. jessenii	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1458
4-P. reinekei	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1445
5-P. vancouverensis	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1445
2-P. koreensis	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1441
9-P. fulva	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1457
3-P. moraviensis	AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGAT	1463
1-Hg 11-4	GGCAGATT----CCTAGGCA--TIIACTCACC-----CGTCCGCCGC----TGAA	1366
	* *	
7-P. umsongensis	TCATGACTGGGGTG-----	1455
8-P. mohnii	TCATGACTGGGGTG-----	1459
10-P. chlororaphis	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
11-P. mandelii	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1518
6-P. jessenii	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1515
4-P. reinekei	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
5-P. vancouverensis	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1492
2-P. koreensis	TCATGACTGGGGTG-----	1455
9-P. fulva	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG-----	1484
3-P. moraviensis	TCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC-----	1523
1-Hg 11-4	TC----CAGGAGCAAGCTCCCTC-----TATCC-----	1390
	** * * * *	
7-P. umsongensis	-	
8-P. mohnii	-	
10-P. chlororaphis	-	
11-P. mandelii	-	
6-P. jessenii	-	
4-P. reinekei	-	
5-P. vancouverensis	-	
2-P. koreensis	-	
9-P. fulva	-	
3-P. moraviensis	C 1524	
1-Hg 11-4	-	

#### Cizelge 4.Sb 01-01 süşunun ve diğer bakterilerin 16S rRNA bölgelerinin hizalama sonuçları

6-A. lwoffii	-----AACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAATG	45
10-A. calcoaceticus	TCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGAGAGG	60
3-A. haemolyticus	-----AACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAAGG	45
4-A. beijerinckii	-----CGGCAGGCTTACCA--TGCAAGTCGAGCGGGGAAAGG-	34
2-A. johnsonii	-CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAGAGG	59
11-A. bouvetii	-----	
5-A. gyllenbergii	-----GGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAAGG	39
7-A. schindleri	-----GGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAAGG	39
9-A. junii	-----AACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAG	45
8-A. parvus	-----GGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGATGG	39
1-Sb 01-01	-----TCCCTCTGCGGTTAGACTACC-----TACTTCTGGTGCAACAAAT	41

6-A. lwoffii	TAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	104
10-A. calcoaceticus	TAGCTTGCTACTGATCTTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	119
3-A. haemolyticus	TAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	104
4-A. beijerinckii	TA-CTTGCT-CCTA-CCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	90
2-A. johnsonii	TAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	118
11-A. bouvetii	-----TACTT--CTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	48
5-A. gyllenbergii	TAGCTTGCTACCTAACCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	98
7-A. schindleri	TACCTTGCTACCTGACCTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	98
9-A. junii	GTGCTTGACCTTATCTTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	104
8-A. parvus	GTGCTTGACCTTATCTTAGCGGCGGACGG-GTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTA	98
1-Sb 01-01	TCCCATGGT-----GTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCG	91
	* *	

6-A. lwoffii	GTGGGGACAACATCTCGAAAGGATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	163
10-A. calcoaceticus	GTGGGGACAACATTTTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	178
3-A. haemolyticus	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	163
4-A. beijerinckii	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	149
2-A. johnsonii	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	177
11-A. bouvetii	GTGGGGACAACATTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGGGAAAGCA	107
5-A. gyllenbergii	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	157
7-A. schindleri	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGGGAAAGCA	157
9-A. junii	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGAGAAAGCA	163
8-A. parvus	GTGGGGACAACATTTCCGAAAGGATGCTAATACCGCATAACGTCCT-ACGGGGGAAAGCA	157

```

1-Sb 01-01 -----CGGCATTCTGATCCGCG-ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTT 142
* * * * *
6-A. lwoffii GGGGACCTTCGGGCCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 221
10-A. calcoaceticus GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 236
3-A. haemolyticus GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 221
4-A. beijerinckii GGGGACCTTCGGGCCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 207
2-A. johnsonii GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCAGATTAGCTAGTTGGTG--G 235
11-A. bouvetii GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCAGATTAGCTAGTTGGTG--G 164
5-A. gyllenbergii GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 215
7-A. schindleri GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 215
9-A. junii GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 221
8-A. parvus GGGGATCTTCGGACCTTGGCGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTG--G 215
1-Sb 01-01 GCAGA-CTCCAATCC--GGACTA--CGATCGGTCTT-GTATGATTAGCATCCTATCGCTA 196
* * * * *

6-A. lwoffii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 276
10-A. calcoaceticus GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 291
3-A. haemolyticus GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 276
4-A. beijerinckii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 262
2-A. johnsonii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 290
11-A. bouvetii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 219
5-A. gyllenbergii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 270
7-A. schindleri GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 270
9-A. junii GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 276
8-A. parvus GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCC----GCCA 270
1-Sb 01-01 GGTAGCAACCCTTTGTACCACCAT-TGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCA 255
**** *

6-A. lwoffii CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 333
10-A. calcoaceticus CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 348
3-A. haemolyticus CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 333
4-A. beijerinckii CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 319
2-A. johnsonii CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 347
11-A. bouvetii CACTGGGACTGAGACA-CGGCC-AGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATAT-GG 274
5-A. gyllenbergii CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 327
7-A. schindleri CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 327
9-A. junii CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 333
8-A. parvus CACTGGGACTGAGACA-CGGCCAGACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGG-GGAATATTGG 327
1-Sb 01-01 TGAT--ACTT-GACGTCGTCGCCCTTCCAGTTTGT--CACTGGGACTATCCTTA 310
* * * * *

6-A. lwoffii ACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 393
10-A. calcoaceticus ACAATGGGGGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTA 408
3-A. haemolyticus ACAATGGGGGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 393
4-A. beijerinckii ACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 379
2-A. johnsonii ACAATGGGGGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 407
11-A. bouvetii ACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 334
5-A. gyllenbergii ACAATGGGGGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 387
7-A. schindleri ACAATGGGGGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 387
9-A. junii ACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTA 393
8-A. parvus ACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTA 387
1-Sb 01-01 A-AGTTCCCGG---CTTAACCC-GC--TGGCAAATAAGGAAAAGTGGGCTGCTCGTTGCC 363
* * * * *

6-A. lwoffii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCGAGATTAAT-ACTCTGGATAG----TGGACG 448
10-A. calcoaceticus AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTGTAGTTAAT-ACCTAGAGATAG----TGGACG 463
3-A. haemolyticus AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTCTAGTTAAT-ACCTAGAGATAG----TGGACG 448
4-A. beijerinckii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTATTAAT-ACTACTGGATAG----TGGACG 434
2-A. johnsonii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTGGATTAAT-ACTTAGGATAG----TGGACG 462
11-A. bouvetii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT-ATACTAAT-ACTCTGGTAT-----GGACG 385
5-A. gyllenbergii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTACTAAT-ACTACTGGATAG----TGGACG 442
7-A. schindleri AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCCTTGTAGTTAAT-ACCTAAAGAGAG----TGGACG 442
9-A. junii AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAAT-ACTCTGGATAG----TGGACG 448
8-A. parvus AAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTGGATTAAT-ACTTAGGATAG----TGGACG 442
1-Sb 01-01 GGAC---TTAACCCAACATCTCAGCACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATG 420
**** *

6-A. lwoffii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 508
10-A. calcoaceticus TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 523
3-A. haemolyticus TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 508
4-A. beijerinckii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 494
2-A. johnsonii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 522
11-A. bouvetii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 445
5-A. gyllenbergii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 502
7-A. schindleri TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 502
9-A. junii TTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 508
8-A. parvus TTACTCGMAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTG 502
1-Sb 01-01 TAAGTTCCCGAA--GGCACCATCCA-TCTG-GAAAGTCTTACTATGTCA-AGACCAGG 475
* * * * *

```

6-A. lwoffii CAAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGC-GCGTAGGTGGCCAATTAAGTCAAA 566  
10-A. calcoaceticus CAAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGC-GCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAA 581  
3-A. haemolyticus CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTGATTAAGTCCGA 566  
4-A. beijerinckii CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTGATTAAGTCCGA 552  
2-A. johnsonii CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGA 580  
11-A. bouvetii CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-ACGTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGA 503  
5-A. gyllenbergii CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGA 560  
7-A. schindleri CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGA 560  
9-A. junii CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCCGA 566  
8-A. parvus CGAGCGTTAATCGGATT-TACTGGGCGTAAAGCGT-GCGTAGGCGGCTGATTAAGTCCGA 560  
1-Sb 01-01 TAAG-GTTCCTTCGCGTTGCATCGAAT-TAAACCACAGTCTCCACCCTTTGTCGGGCC 533  
\* \* \* \* \*

6-A. lwoffii TGTGAAATC-CCCAGCCTT-AACTTGGGAATTGCATTCGATA--CTGGTTGGCTAGAGTA 622  
10-A. calcoaceticus TGTGAAATC-CCCAGCCTT-AACTTGGGAATTGCATTCGATA--CTGGTTAGCTAGAGTG 637  
3-A. haemolyticus TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGTCAGCTAGAGTA 622  
4-A. beijerinckii TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGTCAGCTAGAGTA 608  
2-A. johnsonii TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGGAAGCTAGAGTA 636  
11-A. bouvetii TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGGAAGCTAGAGTA 559  
5-A. gyllenbergii TGTGAAATC-CCCAGCCTT-AACTTGGGAATTGCATTCGATA--CTGGGAAGCTAGAGTA 616  
7-A. schindleri TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGGAAGCTAGAGTA 616  
9-A. junii TGTGAAATC-CCCAGCCTT-AACTTGGGAATTGCATTCGATA--CTGGGAAGCTAGAGTA 622  
8-A. parvus TGTGAAATC-CCTGAGCCTT-AACTTAGGAATTGCATTCGATA--CTGGTCAGCTAGAGTA 616  
1-Sb 01-01 CGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTTCGCGCCGTAACCCAGCCGCTACTTCTATCCGG 593  
\* \* \* \* \*

6-A. lwoffii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 679  
10-A. calcoaceticus TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 694  
3-A. haemolyticus TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 679  
4-A. beijerinckii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 665  
2-A. johnsonii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 693  
11-A. bouvetii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 615  
5-A. gyllenbergii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 673  
7-A. schindleri TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 673  
9-A. junii TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 679  
8-A. parvus TGGGAGAGGATGGTAGAATTC-CAGG--TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA 673  
1-Sb 01-01 TTAGCTGCGCCACTAAAGCCATAAGGCCCAACCGGCTA----GTAGACATCTTGATCG 648  
\* \* \* \* \*

6-A. lwoffii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACACTGAGGTGCGAAAGCATG 737  
10-A. calcoaceticus ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTGCGAAAGCATG 752  
3-A. haemolyticus ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 737  
4-A. beijerinckii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 723  
2-A. johnsonii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 751  
11-A. bouvetii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 673  
5-A. gyllenbergii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 731  
7-A. schindleri ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 731  
9-A. junii ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 737  
8-A. parvus ATACCGATGGCGAAGGCAGCCA-TCTGGCCTAATACTG-ACGCTGAGGTACGAAAGCATG 731  
1-Sb 01-01 GCATGGACTACCGGATCTAATCTGTTGCTCCCCATGCTTTGCTACCTCAGCGTC 708  
\* \* \* \* \*

6-A. lwoffii GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 790  
10-A. calcoaceticus GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 805  
3-A. haemolyticus GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTNNNTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 790  
4-A. beijerinckii GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 776  
2-A. johnsonii GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 804  
11-A. bouvetii GGGG---AAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 724  
5-A. gyllenbergii GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 784  
7-A. schindleri GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 784  
9-A. junii GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 790  
8-A. parvus GGGAGCAAACA-GGATTAGATACCCCTGGTAGTC---CATGCCGTAACCGATGCTCTAC--- 784  
1-Sb 01-01 AGTATTAGGCCAGATGGGCTGCTCCGATCGGGTATTCTCCCA-GATCTCTACGCA 767  
\* \* \* \* \*

6-A. lwoffii --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 848  
10-A. calcoaceticus --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 863  
3-A. haemolyticus --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 848  
4-A. beijerinckii --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 834  
2-A. johnsonii --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 862  
11-A. bouvetii --TAACCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAAACCCGCT 782  
5-A. gyllenbergii --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 842  
7-A. schindleri --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 842  
9-A. junii --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 848  
8-A. parvus --TAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCCGCT 842  
1-Sb 01-01 TTTCACCGCT---ACACTGGAATTTCTACCATCCTCTCCCATACTAGCTTCCAGTAT 824  
\* \* \* \* \*



6-A. lwoffii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 898  
10-A. calcoaceticus GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 913  
3-A. haemolyticus GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 898  
4-A. beijerinckii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 884  
2-A. johnsonii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 912  
11-A. bouvetii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 831  
5-A. gyllenbergii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 892  
7-A. schindleri GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 892  
9-A. junii GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 898  
8-A. parvus GGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA-----AACTCAAAT--GAATTGACGGGGGCCCGC 892  
1-Sb 01-01 C--GAATGCAATTCTAAGTTAAGCTCAGGGATTTCACACTCGACTTAAAGCCGCTAC 882  
\* \*

6-A. lwoffii ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGTCTTG 957  
10-A. calcoaceticus ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGCCTTG 972  
3-A. haemolyticus ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGTCTTG 957  
4-A. beijerinckii ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGTCTTG 943  
2-A. johnsonii ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGTCTTG 971  
11-A. bouvetii ACAAGCG-TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGA-CCT-TACCTGGTCTTG 888  
5-A. gyllenbergii ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGTCTTG 951  
7-A. schindleri ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGCCTTG 951  
9-A. junii ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGCCTTG 957  
8-A. parvus ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT-TACCTGGCCTTG 951  
1-Sb 01-01 GCACGCTTACGCCAGTA---AATCCGAT-TAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCG 937  
\* \*

6-A. lwoffii ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1015  
10-A. calcoaceticus ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1030  
3-A. haemolyticus ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1015  
4-A. beijerinckii ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1001  
2-A. johnsonii ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1029  
11-A. bouvetii ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 944  
5-A. gyllenbergii ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1009  
7-A. schindleri ACATACTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTAGATACAGGTGC 1009  
9-A. junii ACATACTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTAGATACAGGTGC 1015  
8-A. parvus ACATAGTAAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCT--TCGGGAACCTACATACAGGTGC 1009  
1-Sb 01-01 GC-TGCTGGCA-----CAGATTTAG-CCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACTCCAC-TA- 987  
\* \*

6-A. lwoffii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1075  
10-A. calcoaceticus TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1090  
3-A. haemolyticus TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1075  
4-A. beijerinckii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1061  
2-A. johnsonii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1089  
11-A. bouvetii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1000  
5-A. gyllenbergii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1069  
7-A. schindleri TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1069  
9-A. junii TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1075  
8-A. parvus TGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA 1069  
1-Sb 01-01 TCCAAGAGTATTA--ATCTCG-GTAGCCTCCCTCTCGCTTAAAGTGCTTACAACAAA 1044  
\* \*

6-A. lwoffii CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-GGTTAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1132  
10-A. calcoaceticus CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-AGTAATGTCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1147  
3-A. haemolyticus CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-GGTTAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1132  
4-A. beijerinckii CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-GGTTAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1118  
2-A. johnsonii CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-GGTTAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1146  
11-A. bouvetii CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-G-TTAAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1056  
5-A. gyllenbergii CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-AGTAATGTCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1126  
7-A. schindleri CCCTTTTCCTTATTTGC-CAGCG-AGTAATGTCCGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1126  
9-A. junii CCCTTTTCCTTACTTGC-CAGC--ATTTCCGGATGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1131  
8-A. parvus CCCTTTTCCTTACTTGC-CAGC--ATTTCCGGATGGGAACCTTAAAGGATACTG-CCAGTGA 1125  
1-Sb 01-01 GGCTTTTCCT-ACACACGCGGATGGCTGGATCAGG--CTTTC-GCCCATTGTCCAATAT 1100  
\* \*

6-A. lwoffii --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1178  
10-A. calcoaceticus --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1193  
3-A. haemolyticus --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1178  
4-A. beijerinckii --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1164  
2-A. johnsonii --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1192  
11-A. bouvetii --CAAACCTG-----GAGGAAG-CGGGACGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1101  
5-A. gyllenbergii --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1172  
7-A. schindleri --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1172  
9-A. junii --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1177  
8-A. parvus --CAAACCTG-----GAGGAAGCGGGGACGACGTCA-AGTC--ATCATGGCCCTTA 1171  
1-Sb 01-01 TCCCACTGCTGCCCTCCGTTAGGAGTCTGGGCCG-TGTCTCAGTCCAGTGTGGCG---- 1155  
\* \*

6-A. lwoffii CGACCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAG 1237  
10-A. calcoaceticus CGGCCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG 1252

3-A. haemolyticus	CGACCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1237
4-A. beijerinckii	CGACCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1223
2-A. johnsonii	CGACCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1251
11-A. bouvetii	CGAC-AGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1159
5-A. gyllenbergii	CGACCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1231
7-A. schindleri	CGGCCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAG	1231
9-A. junii	CGGCCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATGT	1236
8-A. parvus	CGGCCAGGGCTACACACGTGCTACA-ATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG	1230
1-Sb 01-01	-GATCATCCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTTCGCCTTGGTAGCCCTTACCCCACCA-AC	1213
	* * * * *	
6-A. lwoffii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1291
10-A. calcoaceticus	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1306
3-A. haemolyticus	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1291
4-A. beijerinckii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1277
2-A. johnsonii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1305
11-A. bouvetii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1213
5-A. gyllenbergii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1285
7-A. schindleri	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1285
9-A. junii	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1290
8-A. parvus	GATGCTAATCTCAAA-AAGCCGATCG--TAGTCC--GGATTGGAG-TCTGCAACTCGACT	1284
1-Sb 01-01	TA-GCTAATCTGACTTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCCC	1272
	* * * * *	
6-A. lwoffii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1342
10-A. calcoaceticus	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1357
3-A. haemolyticus	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1342
4-A. beijerinckii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1328
2-A. johnsonii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1356
11-A. bouvetii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1264
5-A. gyllenbergii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1336
7-A. schindleri	CGGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1336
9-A. junii	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1341
8-A. parvus	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT-CGCGGATCAGAATGCCGC-----GGTGAATA	1335
1-Sb 01-01	CCGTAGGG-CGTATGCGGTATTAGCATTCCTTTGCGAATGTTGTCCCCACTAATAGGCA	1331
	* * * * *	
6-A. lwoffii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1402
10-A. calcoaceticus	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1417
3-A. haemolyticus	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1402
4-A. beijerinckii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1374
2-A. johnsonii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1416
11-A. bouvetii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1324
5-A. gyllenbergii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1396
7-A. schindleri	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1396
9-A. junii	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1401
8-A. parvus	CGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTA	1395
1-Sb 01-01	GATTCTTAAGCATTACTCAC-CCGTCCCGCGC----TAGG-----TCAG--GTA	1373
	* * * * *	
6-A. lwoffii	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGT--	1460
10-A. calcoaceticus	GCTAGCCTAACTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCG	1477
3-A. haemolyticus	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGT--	1460
4-A. beijerinckii	-----	-----
2-A. johnsonii	G-----	1417
11-A. bouvetii	G-----	1325
5-A. gyllenbergii	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGACGAAGTCG	1456
7-A. schindleri	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGACGAAGTCG	1456
9-A. junii	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGT--	1459
8-A. parvus	GGTAGTCTAACCNGAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGACGAAGTCG	1455
1-Sb 01-01	GCAAGCT-----	1380
	-----	-----
6-A. lwoffii	-----	-----
10-A. calcoaceticus	TAACAAGGTAGCCGTAGGGAACTCGGGCTGGATCACC	1516
3-A. haemolyticus	-----	-----
4-A. beijerinckii	-----	-----
2-A. johnsonii	-----	-----
11-A. bouvetii	-----	-----
5-A. gyllenbergii	-----	-----
7-A. schindleri	TAACAAGGTA-----	1466
9-A. junii	-----	-----
8-A. parvus	TAACAAGGTA-----	1465
1-Sb 01-01	-----	-----

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fadime YILMAZ

Doğum Tarihi : 27/01/1983

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu : (Kurum ve Yıl)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, 2002-2006

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, 2006-2008

Doktora : Kırıkkale Üniversitesi, 2009- 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar: -

Yayımları (SCI) : **Yılmaz F.**, Ergene A., Yalçın E., Tan S., Production and Characterization of Biosurfactant Produced By Microorganisms Isolated From Milk Factory Wastewaters, *Environmental Technology*, 30 (13), 1397-1404, 2009.

Çavuşoğlu K., Kaya A., **Yılmaz F.**, Yalçın E., Effects of cypermethrin on *Allium cepa*, *Environmental Toxicology*, 27 (10), 583-589, 2012.

Ergene A, Arslanoglu İ., **Yılmaz F.**, Tan S., Yırtıcı U., Genotoxic Effects and Enzymatic Adaptations of Basudin 60 EM in *Allium cepa*, *Parlar Scientific Publications*, 21 (12), 3743-3749, 2012.

Araştırma Alanları : Endüstriyel Mikrobiyoloji

Çevre Mikrobiyolojisi ve Biyoteknoloji

Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) ve Biyoremediasyon

Hücre Kültürü