

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİKEL ve KOBALTI TOLERE EDEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

CEREN KOÇHAN

EKİM 2012

Biyoloji Anabilim Dalında Ceren KOÇHAN tarafından hazırlanan NİKEL VE KOBALTI TOLERE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yusuf MENEMEN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE _____

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN _____

Üye : Doç. Dr. Sema TAN _____

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

NİKEL VE KOBALTI TOLERE EDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KOÇHAN, Ceren

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Ekim 2012, 91 Sayfa

Günümüzde ağır metal içeren endüstriyel atıkların gelişi güzel ve kontrolsüz olarak çevreye salınımı önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Ağır metaller endüstriyel atık sularında bulunan önemli toksik maddelerdir. Bu çalışmada, Kırıkkale il sınırları içerisinde bulunan Kızılırmak'tan kobalt ve nikel ağır metallerini tolere eden bakteriler izole edilerek tanımlanmıştır. Kobalt için minimal inhibitör konsantrasyonu 750 mg/L olan bir suş izole edilmiş ve biyokimyasal testler kullanılarak *Staphylococcus warneri* olarak tanımlanmıştır. *S. warneri* suşunun kadmiyum, alüminyum, lityum, baryum, manganez, kurşun, gümüş, kalay ve nikel gibi ağır metallere karşı çoklu dirence sahip olduğu gösterilmiştir. DNA analiz çalışmaları sonucunda kobalt dirençlilik genlerinin *S. warneri* suşunda kromozom DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşta total protein analizi çalışmaları yapılarak kobalt dirençliliğinde etkili olan proteinler belirlenmiştir. Diğer taraftan nikel için minimal inhibitör konsantrasyonu 395 mg/L olan başka bir suş daha izole edilmiş, yapılan biyokimyasal testler sonucu bu suş *Comamonas testosteroni* olarak

tanımlanmıştır. Çoklu metal ve antibiyotik dirençliliği deneyleri sonucunda *C. testosteroni* suşunun alüminyum, lityum, baryum, gümüş, kalay ve stronsiyum gibi ağır metallere ve penicillin, ampicilin, sulbactam, oxacillin, vancomycin ve gentamicin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Plazmit DNA analizi ve eliminasyonu çalışmaları sonucunda *C. testosteroni* suşunun nikel direnç genlerinin plazmit DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. *C. testosteroni* için yapılan total ve dış membran protein analizleri sonucunda özellikle dış membran proteinlerinin nikel dirençliliğinde etkin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nikel dirençli bakteri, kobalt dirençli bakteri, ağır metal dirençliliği, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus warneri*, Kızılırmak- Kırıkkale

ABSTRACT

ISOLATION and CHARACTERIZATION of BACTERIAL ISOLATES HAVING NICKEL and COBALT TOLERANCE

KOCHAN, Ceren

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Bulent ICGEN

October 2012, 91 Pages

Today indiscriminate and uncontrolled discharge of metal-contaminated industrial effluent in the environment has become an issue of major concern. Heavy metals are the major toxicants found in industrial waste water. In this study, cobalt and nickel-tolerant bacteria were isolated from various locations of Kızılırmak along the city Kırıkkale, Turkey. Cobalt-tolerant isolate with a minimal inhibitory concentration of 750 mg/L was isolated and identified as *Staphylococcus warneri*. Identification of the isolates was carried out by using biochemical test. The isolate was shown to be resistant to other heavy metals like cadmium, aluminum, lithium, barium, manganese, lead, silver, tin and nickel. Plasmid DNA analyses results revealed that the cobalt resistance ability of *S. warneri* was chromosome-encoded. Total protein isolation results descriptively showed the importance of these protein in cobalt resistance. Nickel tolerant isolate with a minimal inhibitory concentration of 395 mg/L was isolated and identified as *Comamonas testosteroni*. Identification of the isolates was carried out using biochemical tests. The nickel-tolerant *C. testosteroni*

was shown to be resistant to other heavy metals like aluminum, lithium, barium, silver, tin and strontium and resistance to the antibiotics like penicillin, ampicilin, sulbactam, oxacillin, vancomycin and gentamicin. Plasmid profile analysis and curing experiments showed that the nickel resistance ability of *C. testosteroni* was plasmid- encoded. Total protein and outer membrane protein profiles revealed that only outer membrane proteins were functional in nickel tolerance of *C. testosteroni*.

Key Words: Nickel-tolerant bacteria, cobalt- tolerant bacteria, heavy metal resistance, *Comamonas testosteroni*, *Staphylococcus warneri*, Kızılırmak- Kırıkkale

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlarken her aşamasında bana destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tez yöneticisi değerli hocam Sayın Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e tesekkürlerimi sunarım.

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

Laboratuvar çalışmalarımnda destek olan doktora öğrencisi Fadime YILMAZ'a ve Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına tesekkür ederim.

Çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen ve her konuda destek olan değerli arkadaşlarım Gamze SERİM ve Sevilay AKBULUT'a tesekkür ederim.

Son olarak çalışmalarım boyunca maddi manevi beni her konuda destekleyen, sabır gösteren ve her zaman yanımda olan babam İsmail KOÇHAN, annem Birsen KOÇHAN ve kardeşim Ceyhun KOÇHAN'a sonsuz tesekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kaynak özetleri.....	2
1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları.....	2
1.1.1.1. Ni'nin Fonksiyonları.....	6
1.1.1.2. Co'nun Fonksiyonları.....	6
1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri.....	7
1.1.2.1. Ni'nin Çevresel Etkileri.....	8
1.1.2.2. Co'nun Çevresel Etkileri.....	9
1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları.....	10
1.1.3.1. Ni'nin Kullanım Alanları.....	12
1.1.3.2. Co'nun Kullanım Alanları.....	12
1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	13
1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	13
1.1.4.1.1. İndirgeme-Çöktürme Yöntemi.....	13
1.1.4.1.2. Yükseltgeme- Çöktürme Yöntemi.....	14
1.1.4.1.3. Nötralizasyon- Çöktürme yöntemi.....	14
1.1.4.1.4. İyon Değişimi.....	14
1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	15
1.1.4.2.1. Biyoremediasyon.....	16
1.1.4.2.1.1. Biyosorpsiyon.....	19
1.1.4.2.1.2. Biyoakümülyasyon.....	21
1.1.4.2.1.3. Biyodegradasyon.....	21
1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	22

1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Dışarıda Tutulması.....	23
1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Transportu (Efflux).....	24
1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması Yolu ile Hücre İçinde Alınması 26	
1.1.5.4. Ekstrasellüler Alınması.....	26
1.1.5.5. Metallerin Daha Az Toksik Formlara Dönüştürüldüğü Enzimatik Detoksifikasyon.....	27
1.1.6. Ni Direnç Mekanizması.....	28
1.1.7. Co Direnç Mekanizması.....	32
1.1.8. Çalışmanın Amacı.....	34
2. MATERYAL VE YÖNTEM	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	35
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	35
2.1.1.2. Nutrient Broth.....	35
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	36
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar	36
2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler	37
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	37
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	37
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)	37
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit)	37
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama	37
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	38
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	38
2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu	38
2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	38
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu	38
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	38
2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu	39
2.1.3.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu.....	39
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol.....	39

2.1.3.2.2.9. %70'lik etanol	39
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....	39
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....	39
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	40
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄).....	40
2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	40
2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon	40
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon	40
2.1.3.2.5. SDS PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı	41
2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı	42
2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....	42
2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)	43
2.1.3.2.6.3. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	43
2.2. Yöntem.....	43
2.2.1. Çalışma Alanı	43
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	44
2.2.3. Ni ve Co'ya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu	45
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	46
2.2.5. Ni ve Co'ya Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi	46
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	46
2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik	47
2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	47
2.2.9. Plazmit DNA İzolasyonu.....	48
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu	48
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	49
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması	49
2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	50
2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmid Curing).....	50
2.2.15. Total Protein İzolasyonu.....	50
2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu	51
2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	51

2.2.18. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	51
2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı	52
2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	52
2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	52
2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerin Boyanması	52
2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intencity) Ölçümü	53
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
3.1. Ni ve Co Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi	54
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu	55
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri	56
3.3.1. Ni Dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri	56
3.3.2. Co Dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri	58
3.4. Bakteri Üreme Eğrileri.....	61
3.4.1. Ni Dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> Suşunun Üreme Eğrisi	61
3.4.2. Co Dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> Suşunun Üreme Eğrisi.....	62
3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu.....	63
3.5.1. Ni Dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> Suşunun Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu	63
3.5.2. Co Dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> Suşunun Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu	65
3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili.....	66
3.6.1. Ni Dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> Suşunun Dış Membran ve Total Protein Profili.....	66
3.6.2. Co Dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> Suşunun Total Protein Profili	67
4. TARTIŞMA-SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	79

SEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Yararlı ve toksik metal ve metalloidlerin periyodik tabloda gösterimi.....	3
1.2. Metalin su ortamında izlediği yol.....	4
1.3. Biyoremediasyon uygulamaları için metal- mikrop ilişkili mekanizmalar.....	20
1.4. Bakteriyel ağır metal metabolizmasında protein aileleri.....	24
1.5. Kadmiyum, kobalt ve çinko için Czc modeli	25
1.6. <i>Synechococcus</i> 'ta <i>smtA</i> ve <i>smtB</i> genleri ve Zn'yi bağlaması	26
1.7. Dar ve geniş spektrumlu bakteriyel Hg direnç mekanizması	28
1.8. Bakterilerde seçilen Ni giderim yollarının temsili	29
1.9. <i>E. coli</i> bakterisinde Ni transfer operonu ve regülasyonu	30
1.10. TonB bağımlı Ni giderimi	32
1.11. Bakterilerde kobalt giderim ve toksisite özeti	33
2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu	44
3.1. <i>Comamonas testosteroni</i> suşunun nikel içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	61
3.2. <i>Staphylococcus warneri</i> suşunun kobalt içeren ve içermeyen ordamdaki üreme eğrisi.....	62
3.3. <i>Comamonas testosteroni</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu	64
3.4. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi	64
3.5. <i>Staphylococcus warneri</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu	65
3.6. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	66
3.7. Ni dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri	67
3.8. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi	67
3.9. Co dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> 'nin total protein profili	68
3.10. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ağır metaller ve insan vücudunda sebep olduğu toksik etki	8
1.2. Temel endüstrilerden atılan metal türleri	11
1.3. Kirli sulardan klasik metal giderim yolları	15
1.4. Biyoremediasyon çeşitleri	18
2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları	36
2.2. SDS PAGE stok solüsyonları hazırlanışı	41
2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları	42
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması	42
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması	43
2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları	45
3.1. Ni ve Co dirençli suşların bölgelere göre yayılımı	54
3.2. Nive Co dirençli suşlarının biyokimyasal özellikleri	55
3.3. Ni dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili ...	57
3.4. Ni dirençli <i>Comamonas testosteroni</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili	58
3.5. Co dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili	59
3.6. Co dirençli <i>Staphylococcus warneri</i> suşunun çoklu metal dirençlilik profili	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
Cd	Kadmiyum
Co	Kobalt
Fe	Demir
Li	Lityum
Ni	Nikel
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
Al	Alüminyum
Hg	Civa
Mn	Mangan
Sb	Antimon
Cr	Krom
Cu	Bakır
Pt	Platin
Pd	Palladyum
U	Uranyum
Ru	Rutenyum
Am	Amerikyum
Ra	Radyum
Th	Toryum
NiSO ₄	Nikel Sülfat
CoNO ₃	Kobalt Nitrat

KISALTMALAR DİZİNİ

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

1. GİRİŞ

Nüfustaki hızlı artış, kentleşme, sanayileşme, yetersiz alt yapı ve sanayi tesislerinin büyük bir bölümünde arıtım tesisinin bulunmayışı çevreyi olumsuz etkilemektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde evsel ve endüstriyel atıkların nehir, göl ve denizlere arıtılmadan deşarjı ekosistem için ciddi sorunlar oluşturmakta ve insan kaynaklı kirlilik boyutlarını arttırmaktadır [1].Günümüzde dünya ölçeğinde ya da uluslararası boyutlarda dikkati çeken başlıca çevre sorunu örnekleri; hava kirlenmesi, su kirlenmesi, toprak kirlenmesi, ses ve gürültü kirlenmesi, yeşil alan kaybı, sera etkisi, ozon tabakasının delinmesi, biyolojik çeşitliliğin azalması, nükleer kirlilik, asit yağmurları, çölleşme, ağır metaller başta olmak üzere zehirli atıkların yayılması şeklinde sıralanabilir [2].

Çevre kirliliği ve sebep olduğu zararların azaltılması uzun zamandır çalışılan konuların başında gelmektedir. Ülke sanayimizin de mevcut su kaynaklarını kirletmesi, zaten bulunan susuzluk sorununu iyice artırmış ve son yıllarda ülkemiz için en büyük sorunlardan biri haline getirmiştir. Çevre kirliliğinin artmasına ve ekolojik dengenin bozulmasına en büyük sebeplerden biri atık sularında ağır metal içeren kuruluşların endüstriyel faaliyetleridir. Endüstri kuruluşlarının atıklarındaki Zn, Hg, Cu, Fe, Pb, Cr, Ag, Cd, Ni gibi metal iyonları kalıcı etkilerinden dolayı belirli bir sınırı aşınca çevreye toksik etki göstermektedir. Bu ağır metaller özellikle sucul ortamlarda ayrışmazlar ve insana kadar ulaşabilecek zararlı etki gösterirler. Bu problemlerin çözülmesi için yapılan teknolojik gelişmeler, insanlığın yararına yeni ve değişik ürünler ortaya çıkarırken diğer yandan da farklı ve arıtımı gereken sıvı ve katı atıklar oluştururlar. Bu atıkların arıtımında ekonomik ve pratik olan yöntemlere yönelik çeşitli bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Ağır metal içeren atık suların arıtımında biyolojik yöntemler son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Biyolojik yöntemler; az enerji ve ekipman ihtiyacı, etkili, pratik ve ekonomik olmaları gibi diğer geleneksel fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine göre birçok avantaja sahiptir. Bu sebeple bilimsel araştırmalar biyolojik arıtım yöntemlerine ağırlık vererek devam etmektedir [3].

1.1. Kaynak Özetleri

1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Ağır metal tanımı, fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ' ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Hg ve Zn olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar [4].

Biyosorpsiyon prosesi alanında incelenen ağır metaller genellikle üç kategoride toplanır: Zehirli metaller (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn gibi), değerli metaller (Pd, Pt, Ag, Au, Ru gibi) ve özgül ağırlıkları genellikle $5,0 \text{ g/cm}^3$ 'ten büyük olan radyonüklitler (U, Th, Ra, Am gibi). Ağır metallerin zehirli karakterleri şu şekilde görülmektedir: 1) Zehirlilik, doğada uzun bir süre devam edebilir. 2) Bazı ağır metaller, bazı ortamlarda düşük zehirli türlerden daha yüksek zehirli türlere dönüşebilirler. 3) Ağır metallerin besin zinciri tarafından biyoakümüasyonu normal fizyolojik aktiviteye zarar verebilir ve sonunda insan yaşamını tehlikeye sokabilir. 4) Metaller yalnızca farklı türlere dönüşebilirler, ancak biyoişlemler dahil hiçbir yöntemle bozunamazlar. 5) Ağır metallerin zehirlilikleri $1.0\text{--}10 \text{ mg/L}$ gibi çok düşük derişimlerde olabilir. Hg ve Cd gibi bazı kuvvetli zehirli metal iyonları, $0.001\text{--}0.1 \text{ mg/L}$ gibi çok düşük derişimlerde olsalar bile yine de çok zehirlidirler [5]. Şekil 1.1'de yararlı ve toksik olan metal ve metalloidler periyodik tablo üzerinde gösterilmiştir.

Metaller ve bileşikleri yer kabuğunda değişik konsantrasyonlarda bulunurlar. İz metaller çevre kirlenmesi bakımından yüksek konsantrasyonlu metallere oranla çok daha tehlikelidirler. Tabii minerallerdeki metaller normal olarak çözünmeyen bileşikler halinde olup canlı organizmalara zararsızdırlar. Buna karşılık bunların çözünen türevleri, genellikle organizmalar için toksiktirler. Ağır metaller çevrede özellikle biyosferde geniş bir yayılım gösterirler, bu sebeple zararlı formdaki konsantrasyonları önemli boyutlara ulaşır [6].

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

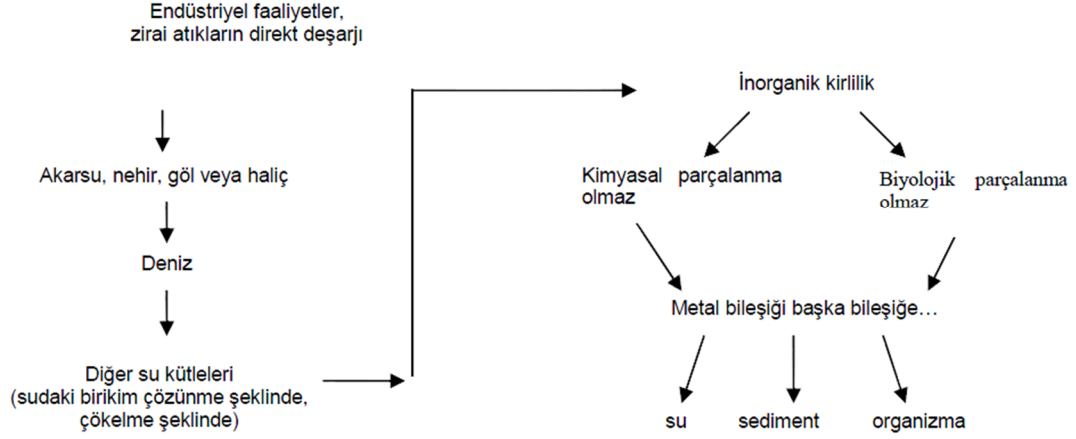
Şekil 1.1. Yararlı ve toksik metal ve metalloidlerin periyodik tabloda gösterimi.

Mavi yararlı elementleri gösterir; mor yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilecek yararlı elementleri gösterir. Kırmızı toksik veya organizmaların çoğunda yararı olmayan elementleri gösterir [7].

Kirleticiler, genelde iki ana kaynaktan sucul ortama ulaşırlar. Noktasal deşarjlar; atık su deşarjları, endüstriyel kaynaklardan gelen atık sular; noktasal olmayan deşarjlar; tehlikeli atık bertaraf bölgeleri ve kaza sonucu sızmalardan salınan maddeler şeklinde olmaktadır. Noktasal kaynakların tiplerini karakterize etmek genelde kolaydır. Aksine noktasal olmayan deşarjlar, zirai alanlardan gelen pestisitler, kontamine olmuş topraklar, ve akuatik sedimentlerden, atmosferik birikimlerden ve yerleşim alanlarından gelen sızıntı kaçaklarını karakterize etmek daha zordur. Çoğu durumda noktasal olmayan kaynaklardan gelen deşarjlar kompleks karışımlardır, toksik maddelerin miktarını, deşarjların miktarını ve zamanlamasını tahmin etmek zordur. Noktasal olmayan deşarjlardaki en zor görüşlerden biri bileşenlerin toksik karakterlerini değiştirebilmesidir [6,8].

Ağır metallerin çevreye yayılımının da etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin

olurlar [4]. Şekil 1.2’de endüstriyel ve zirai atıkların sucul ortamdan canlılara geçişi şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Metalin su ortamında izlediği yol [9]

Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması derişime bağlı olarak değişir. Örneğin, Cr başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine ve oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metallerin derişimi dikkate alınmalıdır. Hücre için en önemli olan metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesinde rol alırlar. Bazıları proteinlerin yapısına katılır, bazıları da bakteri duvarında yer alarak ozmotik balansın korunmasında görev yapar. Fe, Cu ve Ni gibi metaller redoks prosesinde görev yaparlar. Bunun dışında Mg ve Zn gibileri çeşitli enzimleri ve DNA’yı stabilize eder. Fe, Mg, Ni ve Co çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. Na ve K, intraselüler ozmotik basıncın düzenlenmesi için gereklidir [2].

En toksik ağır metallerin başında gelen Cd, düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları için son derece zararlı etkilere sahiptir. Cd’nin, çevre kirliliği görülen denizlerdeki canlılarda biriktiği ve değişik seviyelerde toksik etkiler meydana getirdiği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Organizmanın bünyesinde Cu ve Zn eksikliği büyümeyi sınırlandırırken, yüksek miktarı toksik olabilmektedir. Dokularda

biriken ağır metaller, metabolik olaylarda toksik potansiyellerine ve faydalarına bağlı olarak kullanılabilir, elemine edilebilir veya dışarıya atılabilirler [10]. Örneğin uzun süre Ni'ye maruz kalınması durumunda dermatif ve alerjik hassasiyet oluşumu gözlenmiştir [11].

Mikroorganizmalarda ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır. Örneğin Ca^{2+} , Co^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} ve Zn^{2+} gibi metaller esansiyeldir ve besiyelerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobesein olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar [12,13].

Fakat Ag^+ , Al^+ , Au^{2+} , Cd^+ , Pb^{2+} ve Hg^{2+} gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi yoktur ve bu metaller esansiyel değildirler. Aynı zamanda besinsel değerleri de yoktur. Bununla birlikte, mikroorganizmalara oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenlerle kovalan ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir [13,14].

Metaller, mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedenleriyle toksiktir. Önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki yaparlar. Çevrede çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler [15,16].

1.1.1.1. Ni'nin Fonksiyonları

Toprakta eser element olarak bulunan Ni, Fe ve Al silikatların latisinde yer almaktadır. Çoğunlukla sülfat ve oksitler halinde bulunur. Ni'nin büyük bir çoğunluğu (%80), korozyon ve ısı direncinin yüksek, sertliğinin ve dayanımının iyi olması sebebiyle alaşım üretiminde kullanılmaktadır [17]. Bugüne kadar Ni bazı enzimlerin komponenti ve önemli biyolojik reaksiyonların bileşeni olarak tanımlanmıştır. Ni üreaz dahil olmak üzere birkaç iyi karakterize mikrobiyal enzimler tarafından bir kofaktör olarak kullanılır, [NiFe] hidrojenaz, Ni-süperoksit dismutaz, karbon monoksit dehidrojenaz, asetil CoA sentetaz/ dekarboksilaz ve bunun yanı sıra bazı glioksalaz formları [18]. Ni'nin omurgalılarda eksikliğinin semptomlara yol açtığı, bakteri ve bitkilerde enzimler üzerine etki ettiği tam anlamıyla belirlenmiştir. Ni konsantrasyonları ile ilgili olarak eksikliğinde bitki ve siyanobakterilerde üreaz ve hidrojenaz metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir. Alglerde de yüksek derecede toksik etki yaptığı belirlenmiştir [19]. Bazı bakterilerde, karbondiyoksiti metana indirgemede olduğu gibi Ni'ye ihtiyaç duyarlar. Demir-kükürt kümeleriyle birlikte Ni içeren pek çok dehidrojenaz enziminin Ni'ye ihtiyaç duyduğu bilinmektedir [20].

1.1.1.2. Co'nun Fonksiyonları

Yeryüzünde 25 mg/ton ortalama ile Co en az sıklıkla bulunan elementler grubundadır [21]. Hayvanlarda yapılan deneylerde ince partiküllerin (20 nm) yarım saatte, kaba partiküllerin (11 µm) 3-4 günde yarı yarıya çözüldüğü ortaya konulmuştur. Suda çözünürlüğü olmayan kobaltoksit (Co₃O₄) solunum yolu ile alındığında vücut tarafından çok iyi emilmekte ve hücrelerde bir kaç günde çözünerek kana karışmaktadır. Suda çözünür Co bileşikleri ağız yolu ile alındığında % 75' i tekrar atılırken geriye kalan Co kan, karaciğer, akciğer, böbrek, testisler ve bağırsaklarda toplanmaktadır [17]. Co insanlarda ve kronik kanser vakalarında nörotoksikolojik bozukluklara ve genotoksisiteye neden olur [22]. Co, tüm organizma için gerekli bir elementtir [7]. Co B₁₂ bağımlı enzimler için önemli bir kofaktördür ve bir dizi enzimde vazgeçilmez bileşendir. Özellikle de nitril hidratazda. Ayrıca

klostridiopeptidaz-A gibi bazı mikrobiyal enzimlerin etkinliğini uyarmak için Co'nun rol oynadığı bulunmuştur [23].

1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Ağır metaller, su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir. Ülkemizde de başta tuz ihtiyacımızı karşıladığımız tuz gölü olmak üzere kapalı göllerimizde yeterli çevresel önlem almadığımız ve su havzalarında kontrolsüz sanayileşmeye izin verdiğimizden dolayı ağır metal konsantrasyonu sürekli yükselmektedir. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayınımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayınımları söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayınımları önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin Cu hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve bir çok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [4].

Metaller sadece uzun endüstri mirasımızın bir parçası olmakla kalmayıp; tıp, elektronik, nükleer enerji üretimi gibi farklı alanlarda da kullanımı artmaktadır. Metallerle uzun ve sıkı ilişki göz önüne alındığında ve bu önemli doğal kaynaklar üzerine devam eden güven , onların kullanımının (istismarının) ele alınması gereken önemli çevre sorunlarına yol açabilecek olması şaşırtıcı değildir [24].

Ağır metal ve bileşiklerinin üretimi, kullanımı esnasında oluşan atık sular, yüksek konsantrasyonda toksik ağır metal ve bileşiklerini içerir. Bu toksik ağır metaller, Cu, Pb, Cr, Zn, Cd, Co, Mo ve Hg'dir. Bunlardan Cu, Zn, Ni, Mn, Co ve Mo yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Hg, Cd, Pb ve Cr⁶⁺ çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksiktir. Ağır metallerin ve bileşiklerinin bazıları kanser yapıcıdır. Çizelge 1.1'de ağır metallerin insan vücudunda sebep olduğu toksik etkiler tablo halinde verilmiştir. Toksik ağır metal içeren atık sular arıtılmadan alıcı ortama verilmesi çok zararlı ve kalıcı çevresel etkiler meydana getirir. Alıcı ortama verilen ağır metaller ve bileşikleri doğada bozunmadan kalır ve gıda zinciri yolu ile insana kadar ulaşır. Bu kirleticiler havadan suya ve toprağa, atık sudan da toprağa ve suya geçer. Doğada (toprakta ve suda) kontrolsüz olarak dağılmış ağır metal ve bileşiklerini bertaraf etmek çok zor ve pahalıdır. Dolayısıyla bu tür atıklar dağılmadan kontrol etmek daha ekonomiktir [25].

Çizelge 1.1 Ağır metaller ve insan vücudunda sebep olduğu toksik etkileri [25]

Ağır Metaller	Toksik Etkileri
Cr ⁶⁺	Baş ağrısı, mide bulantısı, ishal, kusma, kanser yapıcı
Zn ²⁺	Depresyon, uyusukluk (uyuklama), felç ve adalelerde uyum bozukluğu gibi nörolojik belirtiler, artan susuzluk
Cu ²⁺	Karaciğer tahribatı, Wilson hastalığı, uykusuzluk
Cd ²⁺	Böbrek tahribatı, böbrek bozukluğu, Kansorejen, İtai-İtai hastalığı
Ni ²⁺	İltihap, mide bulantısı, kronik astım, öksürme, kanser yapıcı
Hg ²⁺ ve Pb ²⁺	Böbreklerde tahribat, kansorejen, nörolojik sorunlar

1.1.2.1. Ni'nin Çevresel Etkileri

Ni'nin bilinen biyolojik fonksiyonu olmamakla birlikte orta seviyede zehirleyici özelliği vardır. Doğal yayılımı yanında insan aktivitelerine bağlı olarak doğada bulunmaktadır. Ni'nin organik formu, inorganik formundan daha zehirleyicidir. Deriyi tahriş etmesinin yanında kalp-damar sistemine çok zararlı ve kanserojen bir metaldir. Zararlı etkilerine rağmen nikel ve tuzlarıyla zehirlenme nadir rastlanan bir

vakadır. Bazı bitki türleri, örneğin; baklagiller, için yararlı bir element olan nikel, belli bir doz aşımında (0.18-5 ppm) zehirleyici olmaktadır [17, 26].

Kompakt Ni ve Ni alaşımları, düşük oranda zehirli olmalarına rağmen metalik toz halindeki Ni ve Ni'nin kimyasal bileşikleri kanser yapıcı maddeler sınıflandırılmasında A1 (kanserojen) kategorisinde yer almaktadırlar. Solunabilir boyuttaki Ni tozları için değeri 0.5 mg/m³ olarak kanserojen etki, solunum sistemine etki ve dermatolojik (alerjik) etki altında 3 grupta incelenebilmektedir [27].

Besin olarak toplam nikel alınımı, hayvan yiyecekleri veya bitkilerin tükettikleri miktarlara bağlıdır. Günlük nikel alınımının yaklaşık yarısı ekmek, içecek ve tahılların tüketilmesiyle olmaktadır. Besinlerin günlük 150 µg' dan az nikel içermesi tavsiye edilmektedir [17].

1.1.2.2. Co'nun Çevresel Etkileri

Co kompleks bileşiklerde sadece Co²⁺ ve Co³⁺ formlarında kararlı olarak bulunur [14]. Havada bulunan toz halindeki Co'nun solunması ve Co tuzlarına deri teması neticesinde Co zehirlenmesi gerçekleşir. Toz halinde alınan Co akciğerlerde çözünerek kana ve idrara karışır. Suda çözünürlüğü olmayan kobaltoksit (Co₃O₄) solunum yolu ile alındığında vücut tarafından çok iyi emilmekte ve hücrelerde bir kaç günde çözünerek kana karışmaktadır. Suda çözünür Co bileşikleri ağız yolu ile alındığında %75' i tekrar atılırken geriye kalan Co kan, karaciğer, akciğer, böbrek, testisler ve bağırsaklarda toplanmaktadır [17]. Uzun süre Co tozuna maruz kalındığında, alerjik tepkilere ve kronik bronşite neden olmasına rağmen Co kaynaklı deri tahrişi ve hastalıklar çok nadir gözlenir ve etki iki ayrı gruba ayrılabilir. Birinci grup; vücudun bazı bölgelerinde meydana gelen kızarıklıklar şeklinde; özellikle sıcak havalarda, ellerde Co temasından kısa süre sonra oluşur. İkinci grup; uzun yıllar Co bileşikleri ile temas sonucunda ortaya çıkan egzamadır [28]. Co ve Co bileşiklerinin insanlar üzerinde kansere neden olduğuna dair henüz kesin bulgular olmamasına rağmen, Co bileşikleri risk teşkil etmektedirler ve kanserojen madde gibi muamele görürler. Co içeren implant takılan bölgelerde tümör oluşumuna da rastlanmış ve

hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, Co metalinin, suda çözünür Co bileşiklerinin kansere yol açtığı kanıtlanmıştır [17]. Günlük besin ihtiyacımızda çok küçük bir yer teşkil eden Co, kırmızı kan hücrelerini üretiminin ve sinir düzenlenmesinde kullanılan B12 vitaminin bileşenidir [14]. Co'nun vücuttaki normal miktarı 80-300 µg' dır ve kırmızı kan hücrelerinde, karaciğerde, dalakta, böbrekte, pankreasta depolanır . Co vücutta yapı taşı olarak bulunur ve anemiyi engeller, ayrıca B12 vitaminin yorgunluk, sindirim kolaylığı ve kas problemlerinin giderilmesine faydası vardır. Yetersiz Co alınımında pernisiyöz (zararlı) anemi ve sinirlerde bozukluk gibi pek çok problemler ve semptomlar ortaya çıkar [17, 26].

1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları

Ağır metallerin çevreye yayılımının da etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Çizelge 1.2'de temel endüstrilerden atılan metal türleri genel olarak gösterilmiştir. Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşır ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar [4].

Çizelge 1.2 Temel endüstrilerden atılan metal türleri [29]

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

Atık suda bulunan ağır metallerin önemli bir miktarı arıtma çamurlarında bulunurlar. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ve denizlere ulaşarak bu bölgelerde kalırlar. Buralardan ağır metaller tekrar mobilize olarak içme sularına ve besin zincirine ulaşabilirler. Besin zincirine ulaşan ağır metaller kimyasal veya biyolojik olarak bünyeden atılamazlar ve akümüle olurlar. Buna rağmen canlı organizmalarda her ne kadar taban, hava veya sularda rastlanılan konsantrasyonlardan çok daha yüksek oranda ağır metal konsantrasyon değerlerine ulaşılsa dahi, çok nadir olarak hayvan ve insanlarda sağlık riski doğuracak ağır metal akümülyasyon sınırına ulaşılır [4].Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, Hg ve Cr gibi ağır metallerin ve bileşiklerinin kaynakları; metal kaplama, para basımı, metal yüzeyi temizleme, madencilik aktiviteleri, ergitme, çöp depolama alanlarından sızan sızıntı suları otomotiv sanayi, pil üretimi ve akü üretimi, deri sanayi, petrol rafinerileri, kimya ve çevre laboratuvarları, boya üretimi, pestisitler ve pigment üretimi, foto grafik gibi endüstrilerdir [25].

İnsan etkisiyle oluşan ağır metal kirliliğinin sebepleri ise; endüstri (yanan kömür ve diğer yakıtlardan, araba egzozundan ve fabrika bacalarından çıkan dumanların atmosfer yoluyla yüzey sularına karışması), evsel atıklar, tarım faaliyetleri sonucunda topraktan suya ağır metal girişi, liman içi çalışmaları (gemi tamiri, boyanması, vb.) ve tanker kazaları olarak sıralanabilir [1].

1.1.3.1. Ni'nin Kullanım Alanları

İlk bulunuşundan sonra uzun bir süre boyunca Ni içeren alaşımlar üretilmiştir. 1830'larda "Alman Gümüşü" olarak bilinen bakır-nikel-çinko alaşımları İngiltere ve Almanya'da büyük miktarlarda üretilmiştir. 1870'de çelik alaşımlandırma elementi olarak önem kazanan nikel daha sonra elektrolitik olarak kaplama teknolojisinin geliştirilmesiyle geniş bir kullanım alanı bulmuştur [26]. Ni'nin ana kullanım alanı paslanmaz çelik, bakır-nikel alaşımları ve diğer korozyona dayanıklı alaşım üretimleridir. Saf Ni kimyasal katalizör olarak elektrolitik kaplamada ve alkali pillerde, pigmentler, madeni para, kaynak ürünleri, mıknatıslar, elektrotlarda, elektrik fişlerinde, makine parçaları ve tıbbi protezlerde kullanılmaktadır [17,26,30]. Ni yakıtların yanması, madencilik ve rafinasyon işlemleri ve kentsel atıkların küllleştirilmesi ile atmosfere yayılmaktadır. Bunun yanı sıra lağım çamuru karışmış toprakta ve sigarada (0-0.51 µg/sigara) bulunmaktadır. Derideki etkileşim Ni içeren takı kullanımında ortaya çıkabilmektedir. Ni madenciliği ve ergitme endüstrisinde mesleki maruziyet görülmektedir. Kimyasal endüstride ise Ni elektrolitik olarak kaplamada kullanılmaktadır [30].

1.1.3.2. Co'nun Kullanım Alanları

Co stratejik ve endüstriyel uygulamalarda ve askeri alanda önemli kullanım alanlarına sahiptir. Co, en çok süper alaşım olarak jet motor türbinlerinde kullanılırken, malzemelere manyetiklik özelliği kazandırma, korozyondan korunma ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla alaşımlarda, yüksek hız çeliklerinde, takım çeliklerinde, elmas takımlarında ve kesici uçlarda alaşım elementi olarak da kullanılır. Bileşikleri ise petrol ve seramik endüstrisinde katalizör ve boyalarda pigment, mürekkep ve verniklerde kurutma maddesi olarak kullanılır. Ayrıca pil elektrotlarında, her tip manyetik malzemelerde ve kayıt cihazlarında kullanılmaktadır. Günümüzde Co'nun en büyük maden üretici ülke Zaire (%52) ve en büyük metal kullanıcısı ise Amerika Bileşik Devletleri' dir [17,21,31].

1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

Sanayi faaliyetlerinin artmasıyla, toksik metaller gibi pek çok kirletici birikmesiyle çeşitli ekosistemlerin bozulmasında artış görülmüştür. Sucul ortamlarda ağır metallerin varlığı sudaki yaşam için ciddi hasara neden olduğu bilinmektedir. Birçok ağır metal tuzu, su ve sulu çözeltileri içinde çözünür ve klasik fiziksel metotlarla ayrılamaz. Ağır metal kirliliği genellikle plastik imalatı, gübre, madencilik, metalurji süreçlerinden kaynaklanmaktadır [32,33]. Endüstriyel atıksularından toksik ağır metallerin uzaklaştırılması, son birkaç yıldır yaygın olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler, oksidasyon- redüksiyon, kimyasal çöktürme, filtrasyon, elektro-kimyasal muamele, buharlaştırma, iyon değişim ve ters ozmoz gibi yöntemlerdir. Bu tekniklerin yüksek reaktif gereksinimi ve öngörülemeyen metal iyon giderimi ve pahalı olması gibi dezavantajları vardır. Çizelge 1.3'te Kirli sulardan geleneksel yöntemlerle metal giderimin avantaj ve dezavantajları gösterilmiştir. Ayrıca, güçlü ve kirletici reaktifler toksik çamur ve çevre kirliliğine neden olan desorpsiyon için kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yaklaşımlar bu alanlarda başarılı olabilecek ve bu ihtiyaçları karşılayabilecek şekilde tasarlanmıştır [34].

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

1.1.4.1.1. İndirme-Çökeltme Yöntemi

Bu yöntemle yüksek değerlikli metal, çökebilene indirildikten sonra, nötrale edilir, reaktifin aşırısı metali çökeltir. Çöktürmede karıştırma, yumaklaşma (flokülasyon), koyulaştırma ve süzme işlemleri yapılır. Bu yöntem özellikle kromlu atıkların arıtımında kullanılır [35].

1.1.4.1.2. Yükseltgeme-Çökeltme Yöntemi

Bu yöntemde indirgenmiş metal, kararlı, yükseltgenmiş ve çözünmeyen şekillerine dönüştürülür. Bu tür bir atık arıtma prosesinde, havalandırma – çökeltme – süzme olmak üzere ardışık üç basamak vardır. Kolayca yükseltgenmeyen metaller için söz konusu prosese kimyasal yükseltgeme basamağını da eklemek gerekir. Bu yöntem özellikle Fe ve Mn içeren atıkların arıtımında kullanılır [35].

1.1.4.1.3. Nötralizasyon-Çöktürme Yöntemi

Cr^{4+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} gibi ağır metal iyonları ortama kireç, soda ve/veya sodyum hidroksit katılarak nötralize edilir, hidroksitleri şeklinde çöktürülerek atık sudan uzaklaştırılır [35].

1.1.4.1.4. İyon Değişimi

Bu süreçte, seyreltik çözeltilerinden metal iyonları değişim reçinesi üzerine elektrostatik kuvvetleri tarafından tutulan iyonları ile değiştirilir. Dezavantajları ise yüksek maliyet ve belli iyonların kısmen kaldırılması [5,35,36,37].

Çizelge 1.3. Kirli sulardan klasik metal giderim yolları[5, 33]

Yöntem	Dezavantajları	Avantajları
Kimyasal Ayırım	(a) ayırım zor (b) çıkan toksik kalıntının giderimi (c) etkili olmaması	Basit Nispeten ucuz
Elektro-kimyasal Ayırım	(a) yüksek metal konsantrasyonları için geçerli (b) spesifik koşullara duyarlı	Metal giderimi sağlar
Ters Ozmoz	(a) yüksek basınç uygulaması (b) pahalı (c) membran boyutu önemli	Saf atık (geri dönüşüm için kullanılabilir)
İyon Değişim	(a) parçacıkların varlığına duyarlı (b) pahalı resin	Etkili Metal giderimi sağlar
Adsorbsiyon	(a) bazı metaller için çok etkili değil	Geleneksel sorbent kullanımı(karbon), Metal giderimi sağlar
Buharlaştırma	(a) fazla enerji (b) pahalı (c) artık çamur oluşturması	Saf atık (geri dönüşüm için)

1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

Metaller, toprak erozyonu, madencilik , endüstriyel kirlilik, kentleşme, kanalizasyon atıkları, hava kirliliği gibi yer kabuğunun ayrışımı sonucu çevreye salınmaktadır [38].Toksik metallerin klasik yöntemlerle giderimi, eksik metal giderimi, yüksek reaktif ve enerji gereksinimi, toksik atık veya dikkatli imha gerektiren atık ürünleri oluşumu, pahalı olması gibi dezavantajları vardır. Atıksulardan toksik metallerin giderimine yönelik yeni teknoloji arayışı, çeşitli biyolojik meteryallerin metal bağlama kapasitelerine dayalı biyosorpsiyona dikkat çekmiştir [36].

Artık maddelerin arıtılmaları için biyolojik arıtma teknikleri en çok başvurulan yöntemlerdir. Başta sıvı atıkların arıtılması için kullanılan biyolojik sistemler olmak üzere katı atıkların kompost yapılarak yok edilmesinde, kömürün ve diğer fosil

yakıtların içindeki kükürtün yakılmadan önce azaltılarak hava kirliliğinin önlenmesi gibi çevre kirlenmesini önleyici bir çok uygulamada mikroorganizmalardan çok geniş oranda yararlanılmaktadır [35].

İlk olarak Polikarpov [35], radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorplanabildiğine dikkat çekerek, bu özelliğin mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerinden bağımsız olduğunu iddia etmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada , aktif çamur bakterisinin tersinir flukasyonunun, negatif yüklü hücre yüzeyleri ile çözeltideki Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi iki değerlikli kanyonlar arasında kurulan iyonik bağ köprülerinin bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür [35].

Su ve atıksulardan toksik ağır metallerin giderilmesinde mikrobiyal biyokütlelerin kullanılması var olan metotlara, düşük maliyeti ile yeni bir alternatif oluşturmaktadır. Biyosorpsiyon teknolojisinin en önemli avantajları atık sulardaki ağır metal konsantrasyonlarını çok düşük seviyelere indirgemekteki etkinliği ve bol miktarda kolayca üretilen, ekonomik biyosorbent materyallerinin kullanılmasıdır. Bu biyosorbentler metal iyonlarının giderilmesinde yüksek seçiciliğe sahiptirler. Ayrıca bu yöntem ile çok seyreltik sulardan bile kirleticiler etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Biyosorpsiyon yönteminin diğer avantajları ise bu yöntemin yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir [39].

1.1.4.2.1. Biyoremediasyon

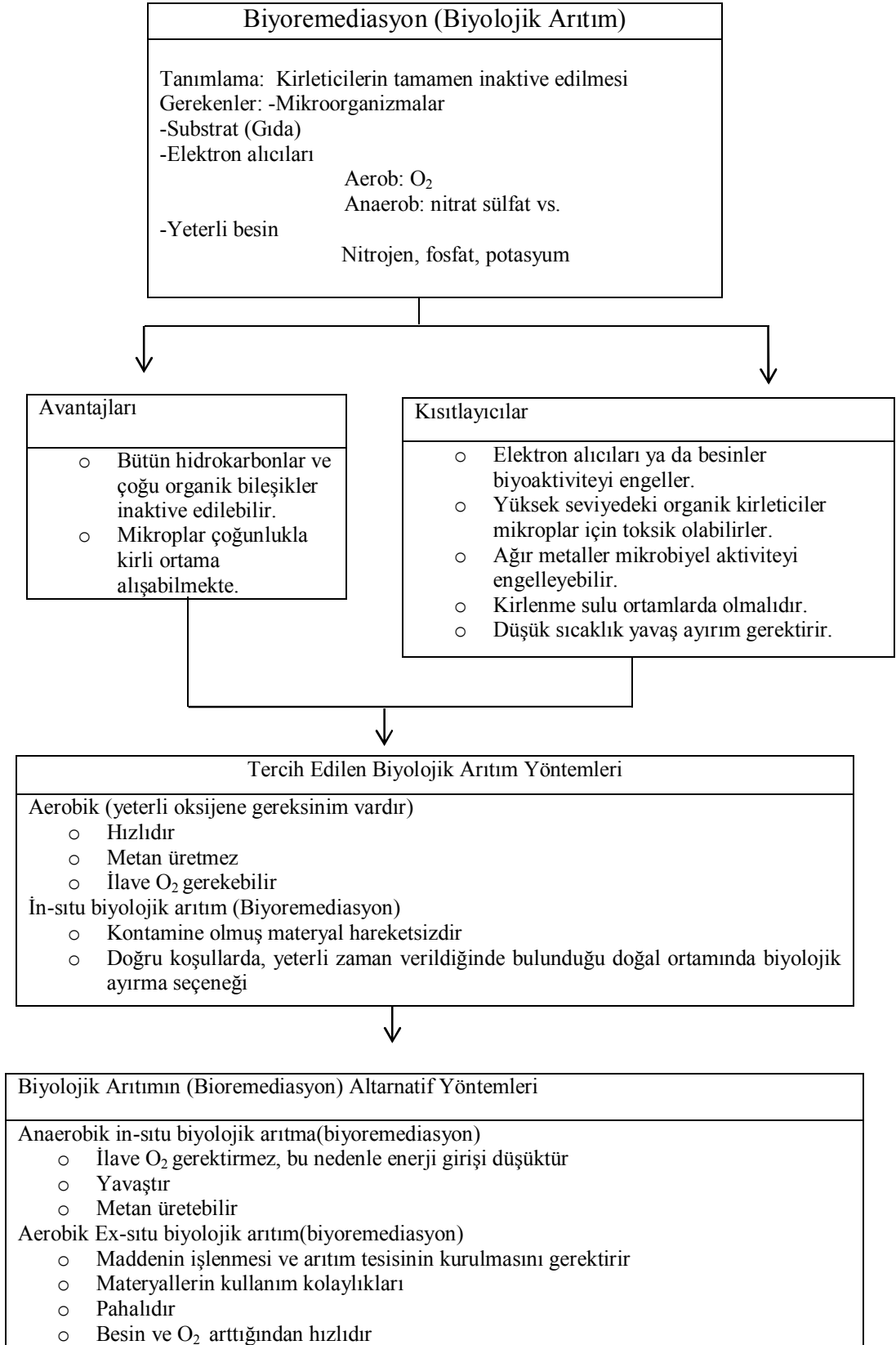
Biyoremediasyon, kirliliği temizlemek için bakterileri ve diğer mikroorganizmalar kullanan bir biyoteknoloji dalıdır [40]. Biyoremediasyon işlemleri, metal gideriminde fizikokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında, ekonomik ve düşük metal konsantrasyonlarında bile yüksek verim göstermesi nedeniyle daha cazip hale gelmiştir. Kirlenmiş ortamlardan metallerin uzaklaştırılmasında metallerin kullanımı gelecek vaat eden bir yöntem olarak kabul edilmektedir [38].

Bakteri, mantar, alg gibi çeşitli biyomateryallerin endüstriyel ve tarımsal atıklar dahil pek çok kirleticiyi bağladığı bilinmektedir. Biyosorbentler sulu çözeltilerden metalik elemanları, özellikle ağır metalleri, ayrılması için daha az maliyetli ve daha etkili bir alternatiftir. Biyosorpsiyonu cazip hale getiren, biyosorbentlerin iki ve çok değerlikli metal katyonlarına belirli bir spesifitesinin olmasıdır [41].

Mikrobiyal hücreler (canlı yada ölü) ve onun ürünleri, metalin hem çözünen hem de katı hali için etkin bir biyoakümülatördür. Yüksek metal bağlayan yeni biyokütle çeşitlerinin keşfedilmesi, bu konuda düşük maliyet ve rekabetli biyosorbent ürünlerinin potansiyel olarak tanıtılmasına olanak sağlamıştır. Metal arıtımı için kullanılacak cansız biyoküteller doğal olarak sık bulunan veya atık halde elde edilebilen algler, funguslar ve bakterilerden hazırlanır. Biyokütle, herhangi bir endüstriyel prosesin yan ürünü olarak daha az maliyet ile temin edilebilmektedir [40].

Ex situ biyoremediasyon kirliliklerin çıkarımını ve bunların özel bir bölgeye yerleştirilmesini içerir. Bu özel bölge, çevre koşulların sağlanabilmesi ve işlemlerin daha kolay izlenebilmesi avantajını sağlar. Böylece biyoremediasyon süreci daha hızlı gerçekleşmektedir. Buna rağmen, kirlilik giderimi zaman alıcı ve pahalıdır. Bunun dışında, yüzeysel kirliliklerin giderilmesi, çalışanların ve genel halkın zehirli materyalden olumsuz etkilenmesini arttırabilir. Bunun tersine *in situ* biyoremediasyon kirlenmiş bölgeden kirliliklerin çıkarılmasını gerektirmez. *In situ* biyoremediasyonun bir avantajı kirliliklerin çıkarılmasına gerek duyulmamasıdır. İşte bu nedenle çalışanların kirliliklerden etkilenmesi ve yöntemin maliyeti *ex situ* biyoremediasyona göre daha azdır. Yine de bu yöntemin de birtakım dezavantajları vardır. Özel biyoremediasyon bölgesi içermediğinden koşulların denetlenmesi ve işlemlerin izlenebilmesi diğer yöntemlere göre çok daha zordur [5,42]. Çizelge 1.4'te biyoremediasyon çeşitlerinin avantajları ve dezavantajları gösterilmiştir.

Çizelge 1.4 Biyoremediasyon çeşitleri [5, 40]



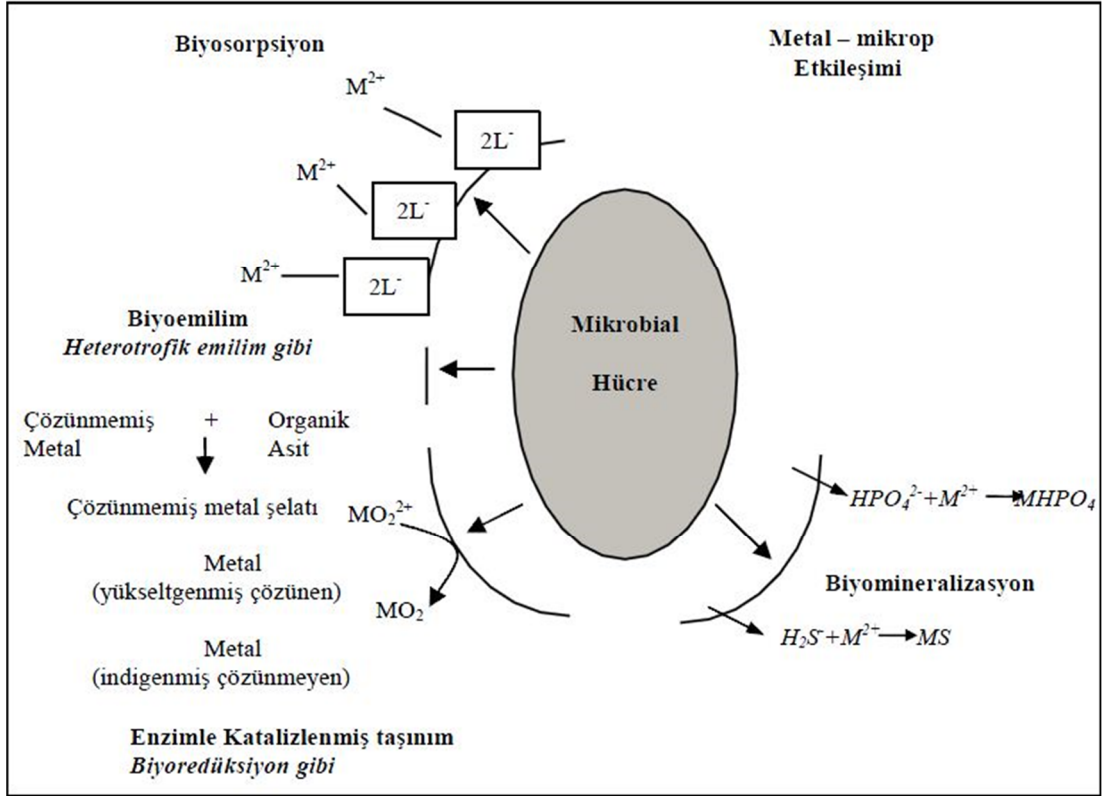
Biyolojik arıtım yöntemlerini biyosorpsiyon, biyoakümülyasyon, biyodegradasyon, fitoremediasyon olmak üzere 3 genel başlık altında toplayabiliriz [19,36,43]

1.1.4.2.1.1.Biyosorpsiyon

Ağır metal iyonlarının alımı hücre yüzeyine yakalanma ve bunu izleyen sorpsiyon aşamasından oluşur. Bu alım metodu biyolojik metabolik döngüden bağımsızdır ve biyosorpsiyon (pasif alım) olarak adlandırılır [44].

Biyolojik süreçlerle metal arıtımı, özellikle mikropsal hücrelerle yapılan metal biyosorpsiyonu etkili ve alternatif bir teknoloji oluşturacak güçtedir. Şekil 1.3'te metal mikrop ilişkili mekanizma şematize edilmiştir. Metallerle biyosorpsiyon sürecinin temelde iki hedefi vardır. Birincisi Au, Ag ve Pt gibi değere sahip paslanmaz metallerin geri kazanımını; ikincisi ise canlı sistemleri ve çevresi için çok küçük derişimlerde bile son derece zehirli olan Hg, Cu, Fe, Pb, Cr, Cd, Ni ve Zn gibi ağır metallerin kirlı sulardan uzaklaştırılmasıdır [5]. Karboksil, amin, hidroksil, fosfat ve sülfidril gruplarının varlığı nedeniyle nötr pH' da net eksi yük taşıyan hücre yüzeyi, artı yüklü katyonik metalleri kayda değer miktarda adsorplayabilir [24].

Cansız biyokütlerinde metal iyon giderimi adsorpsiyon ve iyon değişimi yollarını içermektedir. Herhangi bir biyosorbent kapasitesi esas olarak, biyokütle özellikleri tarafından, hedef metallerin fizikokimyasal özellikleri, etkileşim halinde olduğu mikroçevre solusyonları pH, sıcaklık ve diğer iyonlar tarafından etkilenir. Örneğın pH artışı metal iyonlarının çökmesine neden olabilir. Hücre yüzey emilim mekanizmaları hücre metabolizmasından bağımsızdır; bunlar metal ve hücre duvarı fonksiyonel grupları arasındaki fizikokimyasal etkileşime dayanmaktadır. Bu işlem hücre metabolizmasından bağımsız olduğu için metal bağlanması oldukça hızlıdır [45].



Şekil 1.3. Biyoremediasyon uygulamaları için metal-mikrop ilişkili mekanizmalar [24]

Oh ve arkadaşları [45], *Pseudomonas stutzeri*' nin liyofilize hücreleri tarafından Pb^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{2+} nin biyosorpsiyon kapasitesi Langmuir ve Freundlich izotermine göre incelemiştir. Pb^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{2+} için biyosorpsiyon kapasitesi, metal konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı görülmüştür. Biyosorpsiyon için optimum pH Cd^{2+} ve Cu^{2+} için 5.0 ve Pb^{2+} için 6.0 olduğu saptanmıştır.

Mikrobiyal hücrelerle metal biyosorpsiyonunda da enerjiye bağlı mekanizmalardan dolayı adsorpsiyon ortamının sıcaklığı önemlidir. Bayramoğlu ve arkadaşları [46], 5-40°C arasındaki çalışma şartlarında *Lentinus sajor-caju* misellerinin Cr^{+6} biyosorpsiyonunu değerlendirmişler ve sıcaklığın artışıyla biyosorpsiyon kapasitesinin 1.4-1.5 kat arasında arttığını gözlemlemişlerdir.

1.1.4.2.1.2.Biyoakümülyasyon

Bakteri, alg, fungus ve mayaları içeren mikroorganizmalar ağır metalleri ve benzer bileşikleri (örn: radyonükleidler, organometalik bileşikler, metalloidler ve metal partiküller gibi) dış çevrelerinden yüksek etkinlikle biriktirebilirler. Bunu fiziko-kimyasal (adsorpsiyon) ya da metabolik aktiviteye bağılı olabilen mekanizmalar aracılığıyla yaparlar. Gram pozitif bakterilerin çeperleri etkili metal şelatörleridir ve *Bacillus subtilis*'te peptidoglikandaki glutamik asitin karboksil grubu metalin tutulduğu önemli yerdir. Algal hücre çeperleri ve hücre dışı materyaller iyi biyosorptif ajanlardır. Hem iyonik hem de kovalent bağı hücre için önemli rolü olan protein ve polisakkaritlerle biyosorpsiyonu kapsar [35].

Canlı mikroorganizmalarla çalışmanın ana avantajı kültürünün yapılmasının kolay oluşu ve kolay saklanabilirliğidir. Ancak solusyondaki ağır metallerin toksik etkilerinden etkilenebilmektedirler [19]. Biyobirikim adsorpsiyondan daha yavaş bir süreç içerir [40].

1.1.4.2.1.3.Biyodegradasyon

Biyodegradasyon terimi genel olarak kompleks bileşiklerin biyolojik faaliyetlerle parçalanması (metabolize edilmesi) şeklinde tanımlanabilir. Sıcaklık, pH, su, besin miktarı ve biyolojik olarak parçalanacak kimyasalın sudaki çözünürlüğü, kimyasala bağılı yan gruplar, molekül büyüklüğü, toksisitesi gibi fizikokimyasal parametreler biyodegradasyonu etkileyen en önemli parametrelerdir. Biyodegradasyon, kimyasalın hücre dışında parçalanması veya hücre içine metabolize edilmesi şeklinde olmaktadır [47].

Yapılan bir çalışmada *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Pleurotus sajor-caju* gibi bazı *Basidiomycetes* üyeleri arasından siyanür yıkım yetenekleri bakımından etkin tür seçilmiştir. Denenen funguslar arasında *Trametes versicolor* hücrelerinin diğerlerine kıyasla daha yüksek bir yıkım aktivitesine sahip olduğu görülmüştür [48].

1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları

İnsanlar dünya üzerinde baskın bir etken olarak bir çok organizmanın evrimine şekil vermiştir. Bazı durumlarda, organizmaların evrimsel cevabındaki sapmaların insanlar ve çevresel sağlık için anlamları çok derin olmuştur. Hiçbir yerde bu etki, bakterilerin; antibiyotiklere, ağır metallere ve pestisidlere olan evrimsel yanıtından daha belirgin olmamıştır [51]. Bakteriler aynı biyokimyasal ve genetik prensiplere uygun olarak çalışırken, daha hızlı evrimleşme için ayırıcı olan belirli özellikler açısından çok hücreli ökaryotlardan farklıdırlar. Bakterilerin sadece üreme zamanları kısa değildir, ayrıca genetik farklılıkları da yüksektir [52].

Yaklaşık 4 milyar yıl önce hücresel yaşamın başından beri organizmalar, ısı, ozmotik stres, radyasyon ve toksik maddeler gibi stres koşullarıyla karşı karşıya kalmıştır. Yaşayan sistemler evrimleri boyunca bu streslere karşı özel taşıma mekanizmaları, metal bağlayıcı proteinler gibi sistemlerden faydalanarak adapte olmuşlardır [53].

Bakterilerde ağır metal direnci tekli ya da çoklu antibiyotik direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *Staphylococcus aureus* ile ilgili çalışmalar açıkça penisilin, eritromisin ve tetrasiklin direnciyle; Hg, Pb, Cd, Zn toleransı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Benzer direnç modelleri *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* için de vardır. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmit kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik kullanımından önce rapor edilmiştir [53,54]. *Staphylococcus* türleri birden fazla metal ve antibiyotiklere dirençli olup: en yaygın çoklu direnç Cr, Pb ve penisilindir [55].

Toksisite kendi ana bağlayıcı bölgelerinden veya ligand etkileşimleri yoluyla metallerin yer değiştirme yoluyla gerçekleşir. Metal adaptasyonunda bakterilerin kromozom, transpozon ve plazmid aracılı direnç sistemleri vardır. Ağır metal direnci için beş bilinen mekanizma vardır: [56]

- 1) Geçirgenlik bariyeri ile metallerin dışarıda tutulması,
- 2) Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu (Efflux)
- 3) Metallerin proteine bağlanması yolu ile hücre içinde alıkonması,
- 4) Ekstraselüler alıkonma,
- 5) Metallerin daha az toksik formlara dönüştürüldüğü enzimatik detoksifikasyon,

1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Dışarıda Tutulması

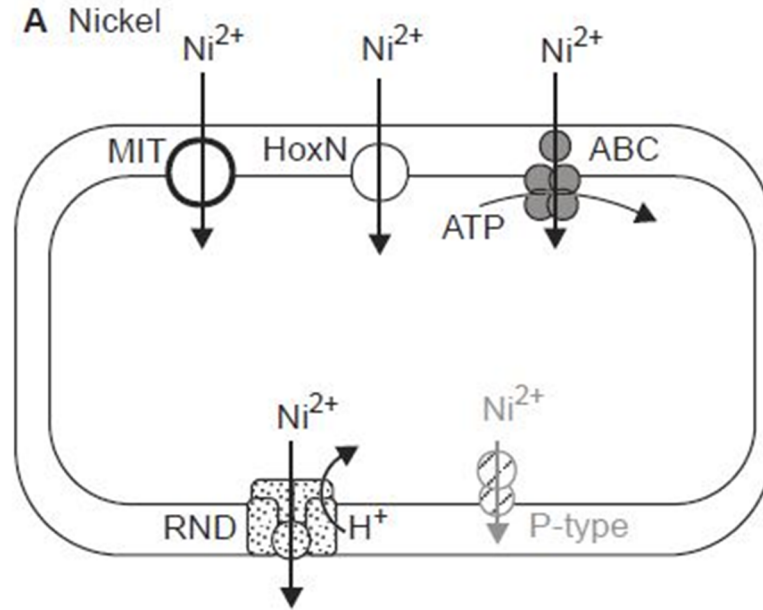
Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücrenel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E.coli*'deki Cu^{2+} dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinleri'nin üretimi değiştirilerek Cu^{2+} 'nin hücreye girişi engellenir [57].

Pseudomonas sp.'de bulunan bir operonda kodlanmış olan dört genin Cu^{2+} 'nin periplazmik bağlayıcı özelliğinin kodları olduğu bulunmuştur. Bunlar; *copA*, *copB*, *copC*, *copD*'dir. Cu^{2+} dirençliliği; *copA*, *copB* ile *copC*, *copD*'nin özelliklerinin toplamının eklenmesi şartıyla sağlanmaktadır. *copA* ve *copC* proteinleri iç ve dış membranlar arasında ve *copB* ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, periplazmik bağlayıcı veya ekstraselüler alıkoyma her ikisinden dolayı direnç hipotezini destekler görünmektedir. *S. aureus*'un bazı türlerinde, peniklinaz'ın kodlarını bulunduran plazmidler, hücre membranı değişimi aracılığı ile Cd^{2+} geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu Cd^{2+} nin 0,01-0,1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [2].

1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Transportu (Efflux)

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmid kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı yada ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [5].

Ni *Saccharomyces cerevisiae* bakterisinde hücre içine *CorA* sistemi tarafından girer. Buna ek olarak hidrojenaz gen kümesinin bir parçası olan Ni taşıyıcı sistemi *Ralstonia eutropha*'da tanımlanmış ve yeni HoxN sınıfı transport proteininin bir modeli bulunmuştur (Şekil 1.4). Ni alımı muhtemelen kemiozmatik gradient aracılığıyla yönlendirilmiştir. *E. coli* içinde hidrojenaz oluşumu için Ni bir ABC taşıma sistemi ve periplazmik nikel-bağlama proteini tarafından temin edilir. Bakterilerin en bilinen Ni dirençliliği, *Ralstonia* sp. CH34 ve benzeri suşlarda bir RND transport tarafından yönlendirilen taşıma sistemine dayanmaktadır [14].

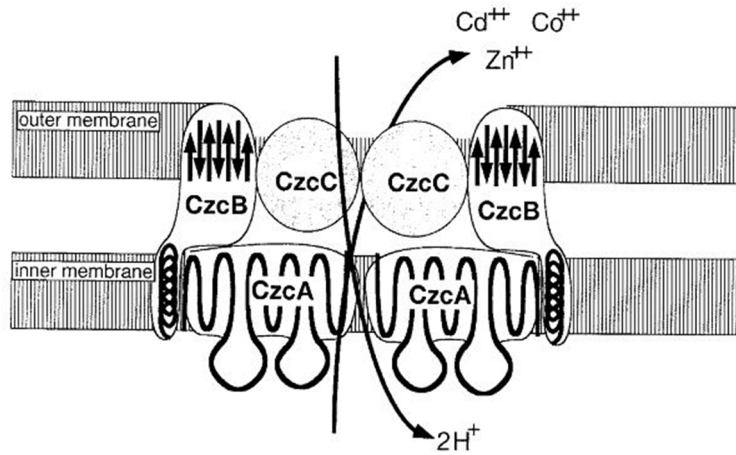


Şekil 1.4. Bakteriyel ağır metal metabolizmasında protein aileleri [14]

Nies ve arkadaşları [58] yaptıkları çalışmada, mikroorganizmalarda Cr'nin herhangi bir yararlı sınırdan bulunmadığını belirtmişlerdir. Kromat *Ralstonia* sp. CH34 suşunun hücre içine, birçok mikroorganizmada görülen sülfat alım sistemiyle girdiğini göstermişlerdir. Kromat direnci muhtemelen kromat azaltılması ve kromat taşınım etkileşimine dayandığını belirtmişlerdir.

Co^{2+} en hızlı bakteri hücresindeki CorA sistemi tarafından toplanır. Co konsantrasyonu düşük olduğunda indüklenebilir ATP odaklı alım sistemi henüz tespit edilmemiştir ancak *R. eutropha*'dan gelen Ni taşıyıcı HoxN ile ilgili bir sistem *Rhodococcus rhodochrous* da bulunmuştur. Bu nedenle HoxN homoloğu B_{12} kobalt protein üretimi için Co^{+2} sağladığı görülmüştür [14].

Toprağın kemolitotrofik ototrof *A. eutrophus*'un büyük plazmitleri birçok ağır metal direnç belirleyicisi bulundurmaktadır. Czc, iki değerlikli katyon/proton antiporter olarak işlev gören bir akış pompasıdır (Şekil 1.5). CzcA temel iç zar taşıyıcı proteindir. CzcC bir dış membran proteini olduğu düşünülmektedir. CzcB ise gram-negatif bakterilerin iç ve dış hücre zarları arasında köprü olan membran füzyon proteini olarak görülmektedir [59].

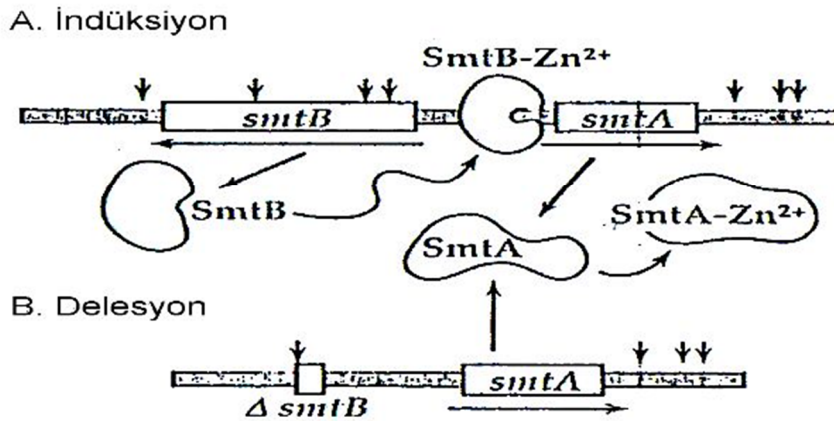


Şekil 1.5. Kadmiyum, kobalt ve çinko için Czc modeli [59]

1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması Yolu ile Hücre İçinde Alınması

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücrel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} metalleri alıkonmaktadır (Şekil 1.6) [2].

Synechococcus denizlerde yaşayan bir Cyanobacteria'dır. Bu mikroorganizmada *smtAve smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır. Bunlardan *SmtA*, Cd^{2+} ve Zn^{2+} ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *SmtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteininin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [60].



Şekil 1.6. *Synechococcus* 'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve Zn'yi bağlaması [2]

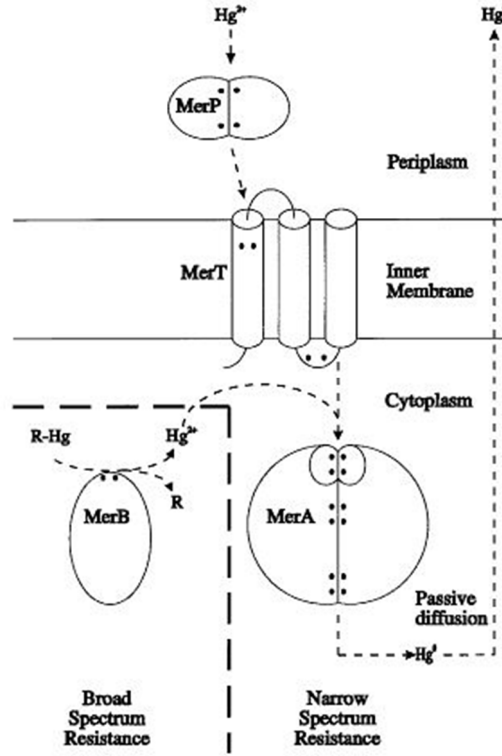
1.1.5.4. Ekstrasellüler Alıkonma

Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur. *S. cerevisiae*'deki Ni^{2+} dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni^{2+} absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere

çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metale zengin besi ortamlarına ekstraselüler glutasyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutasyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu^{2+} dirençli mantarlarda görölmektedir [61, 62].

1.1.5.5. Metallerin Daha Az Toksik Formlara Dönüştürüldüğü Enzimatik Detoksifikasyonu

Tanımlanmış olan birçok bakteriyel ağır metal dirençliliği içinde, Hg dirençliliği en iyi incelenmiş olanıdır. Hg geniş bir yayılma alanına sahiptir ve diğer ağır metal dirençliliklerinden farklıdır, Hg dirençli mikroorganizmaların izole edildikleri yerler ile memelilerin florası hemen hemen aynıdır. Hg dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik Hg^{2+} formundan elementel ve daha az reaktif Hg^0 formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Bazı Hg'ye dirençli bakteriler Hg'ye geniş spektrumlu dirençli esas bileşiklere sahiplerdir [63]. Filogenetik ve gen dizi analizleri *mer* ilişkili genlerin ilk jeotermal ortam değişiklikleri sırasında termofilik mikroorganizmalar arasından geldiğini gösterir. *Mer* operonu olarak gelişen genetik sistem aslında toksitesi yüksek formların uçucu toksik olmayan formlara dönüştüren iyi bilinen bakteriyel metal direnç sistemidir. Son zamanlarda Tn916 unsuru içerdiği konjugatif transpozon Tn6009 genlerin *merA*, *merB*, *merR* ve Hg detoksifikasyonundan sorumlu *merT* genlerini içeren *S. aureus* gibi gram-pozitif bakterilerin *mer* operonundakine benzer genler bulunmuştur. Tuhaftır ki, *Acidithiobacillus ferrooxidans*'dan saflaştırılmış sitokrom c oksidaz hücre içi transporttan sonra Hg bileşiklerine karşı detoksifikasyon faaliyeti gösterdiği rapor edilmiştir. *Mer* operonu Hg^{+2} gideriminde en yaygın genetik detoksifikasyon sistemlerinden biridir. Çeşitli genleri içeren *mer* operonu bakterilerde organik ve inorganik Hg bileşiklerinin tespiti için *merR/merD*, taşıma veya hareketini kolaylaştırması için *merP/merT/merC* ve son olarak enzimatik detoksifikasyon için *merA/merB* genlerini içerir [64].



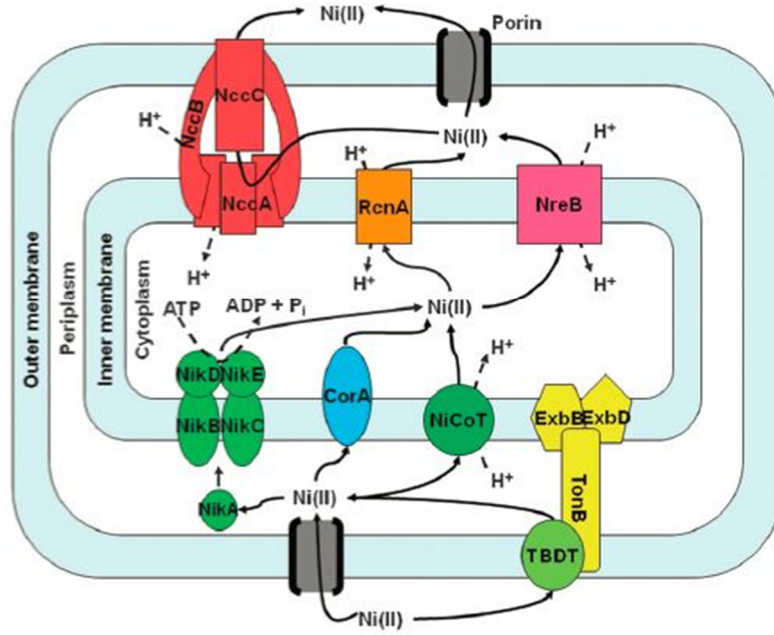
Şekil 1.7. Dar ve geniş spektrumlu bakteriyel Hg direnç mekanizması [65]

Hg direnç mekanizması Şekil 1.7’de gösterildiği gibi dar spektrum ve geniş spektrum olmak üzere iki tiptir. Dar spektrumda sadece merA geniyle inorganik Hg bileşiğinin enzimatik detoksifikasyonu ile giderimi sınırlıdır [64].

1.1.6. Ni Direnç Mekanizması

Ni genellikle sulu ortamda Ni⁰ ya da Ni²⁺ formunda kararlı olarak bulunur. Yakın zamana kadar, Ni toksitesi mikroorganizmaların Ni ile kontamine olmuş topraklara veya endüstriyel kirliliğe maruz kalması hücrelerde sınırlı probleme sebep olduğuna inanılmaktadır. Bu varsayım alt üst oldu ancak, Ni savunma sistemi (RcnA) mezofil E. coli bakterisinde karakterize edilmiştir. Birkaç DNA bağlayıcı protein, metal taşıma ve Ni bağlayan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunda değişikliklere yol açan proteinler konformasyonel değişikliğe uğrar. NikR en iyi çalışılmış Ni bağımlı düzenleyici proteindir. Diğer organizmaların NikR proteinleri metal bağlayıcı ve düzenleyici özelliklerinde farklılıklar sergiler. Karşılaştırmalı

genomik analiz sonuçlarına göre, bakteriler ve arkelerde Ni'nin yüksek afiniteli alımı için en yaygın mekanizma NikABCDE gibi bir ATP-bağlayıcı kaset (ABC) sistemi kullanır (Şekil 1.8). NikABCDE ilk kez *E. coli* de karakterize edilmiş ve ABC taşıyıcı alt familyanın bir parçası olduğu gösterilmiştir [18].

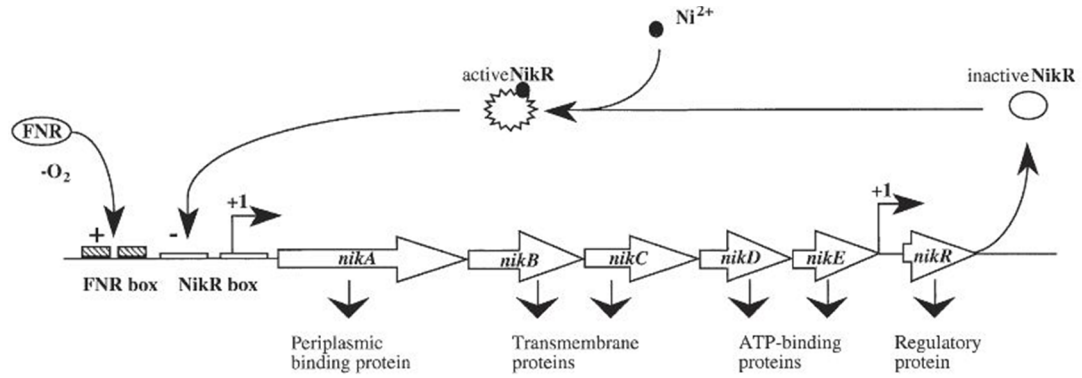


Şekil 1.8. Bakterilerde seçilen Ni giderim yollarının temsili [18]

NikB ve NikC Ni gözenek oluşturan bir transmembran proteindir. NikD ve Nike bağlanma ve ATP hidrolize proteinleridir. NikA ise bir periplazmik bağlanma proteindir. *Brucella suis*, *Vibrio parahemolyticus*, *Helicobacter hepaticus*, *Yersinia sp.* ve *S. aureus* gibi diğer Nik sisitemleri de içeren örneklerdir [18].

Andrée'nin [66] yaptığı bir çalışmada, *E. coli* 'de Nik sisteminin bir ABC taşıyıcı ailesinden olduğunu ve hidrojenazın anaerobik biyosentezi için Ni^{2+} iyonu sağladığını rapor etmişlerdir. Şekil 1.9'da *E. coli* bakterisinde Ni transfer operonu ve regülasyonu ifade edilmektedir. Başlama bölgesi (+1) ve transkripsiyon yönü

oklarla gösterilmiştir; (+) ve (-) NikABCDE' nin ekspresyonunun, aktivasyonu ve represyonunu ifade etmektedir.



Şekil 1.9. *E. coli* bakterisinde Ni transfer operonu ve regülasyonu [66]

NiCoT ailesinin kurucu üyesi olan HoxN, *Cupriavidus necator* da yüksek affiniteli Ni permeaz aktivitesi ve tam üreaz ve hidrojenaz faaliyetleri için gerekli olduğu bulunmuştur [18].

Nies [67] yaptığı bir çalışmada, RND (resistance-nodulation-cell division) ailesinin ilk tanımlanan üyesi *R. metallidurans* bakterisinden gelen CzcA proteini ve aynı bakteriden CnrA proteini izlemiştir. Ayrıca plazmid pMOL28 üzerindeki kobalt-nikel direnç belirleyici *cnr* geni katyon efflux sistemine dayandığını rapor etmiştir. Direnç belirleyici gen bölgesi, düzenleyici gen bölgesi *cnXH* öncesinde bir *cnrCBA* yapısal gen bölgesinden oluştuğunu belirtmiştir. *R. Metallidurans* CzcCBA aracılı efflux ile Co²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ ve Ni²⁺ metallerine karşı direnç geliştirdiğini belirtmiştir.

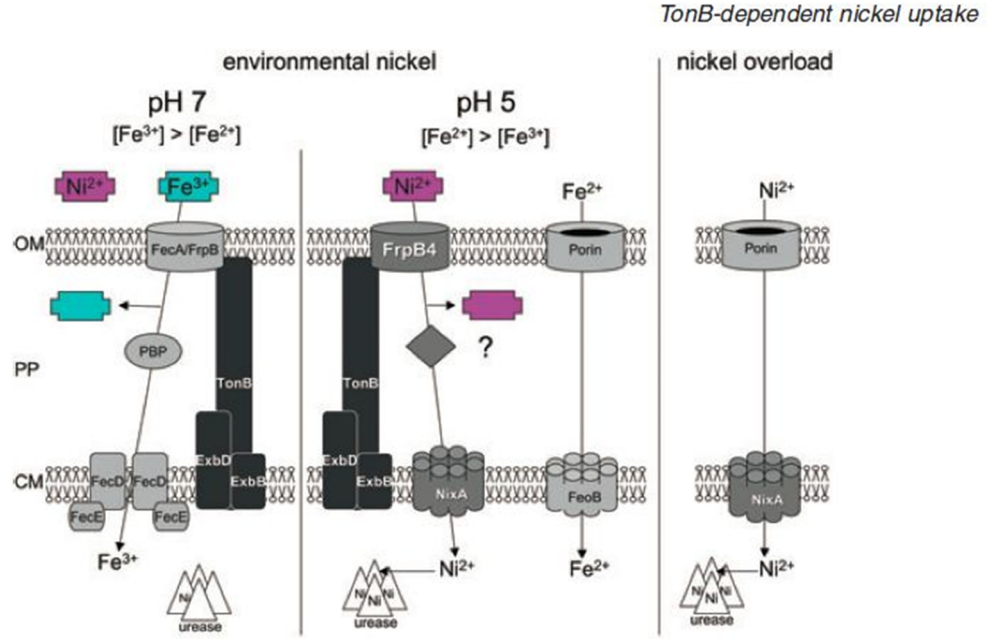
Jeannette ve arkadaşları [68], *Serratia marcescens* suşunun indüklenebilir Co ve Ni direnç mekanizmaları incelemiştir. Ağır metal dirençliliğinin *NcrABC* genlerine bağlı olduğu görülmüştür. *NcrA* ve *NcrC* olmadan metal dirençliliğinde düşüş, Ni ve Co birikiminde artış olduğunu rapor etmiştir

Agne's Rodrigue ve arkadaşlarının [69] Fransa'da yaptığı çalışmada, *E. coli*'de *yohM* (*rcnA*) geninin primer karakterizasyonu ve izolasyonunu incelemiştir. Bu

gen *E. coli* 'de Ni ve Co dirençliliğini artıran membrana bağlı bir polipeptidi kodladığını görmüşlerdir. Bu gen özellikle Ni ve Co için dirençlilik sağladığını saptamışlardır. Hücre içinde *yohM* mutasyonlarının Ni birikimini arttırdığı, *yohM* barındıran hücrelerdeyse intrasellüler Ni içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Ni ve Co ile kontamine olmuş ortamlarda bu metallerin biyoremediasyonu *yohM* geninin ürettiği proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Kao ve arkadaşlarının [70] Tayvan'da yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* 'de, gram pozitif (*Bacillus cereus* RC607) ve gram-negatif (*Pseudomonas* sp. K-62) bakterilerinden gelen, aşırı eksprese olan metal-bağlayıcı proteinin (*MerP*) sulu çözeltilerde Ni²⁺, Zn²⁺ ve Cr³⁺ metallerini adsorplayabildiğini rapor etmişlerdir. İlk adsorpsiyon hızı ve adsorpsiyon kapasitesi biyosorbentlerin performansını değerlendirmek için belirlenmiş ve *MerP* proteinin ekspresyonuyla rekombinant suşların metal adsorpsiyon kapasitelerinin Ni²⁺, Zn²⁺ ve Cr³⁺ için önemli ölçüde geliştirdiğini rapor etmişlerdir.

Ni çeşitli mikrobiyal enzimler için kofaktör olup eser bir elementtir. Patojen *H. pylori* için Ni insan midesinde hayatta kalması için gerekli bir elementtir. Çünkü önemli virülans faktörü ureazın kofaktörüdür. Ni transportu stoplazmik membranı boyunca NixA permeaz tarafından gerçekleştirilir. Gram- negatif bakterilerde dış membrana Ni transferini gerçekleştiren mekanizma henüz bilinmemektedir. Bakteriyel dış membran aracılı Fe ve kobalamin girişi TonB/ExbB/ExbD mekanizmaları tarafından spesifik enerji reseptörleriyle yapılmaktadır. Bakteride ExbB/ExbD/TonB and FrpB4 eksik olması halinde düşük pH da verimli Ni gideriminin mümkün olmadığını göstermektedir. Şekil 1.10'da *H. pylori* bakterisinde ExbB/ExbD/TonB foksiyon modeli gösterilmektedir. pH 7 de çevrede düşük konsantrasyonda Ni varlığında, *TonB* kompleksi esas olarak, siderofor bağlı (mavi kutu) ferrik demir (Fe³⁺) iyonunun dış zardan taşınması için kullanılır. *TonB* bağımlı taşınım, nickelophore (pembe kutu) kompleksiyle Ni dış membrandan alınır. Periplazmik boşlukta, Ni spesifik bir proteine bağlanabilir ve sonrasında sitoplazmik membrana *NixA* permeaz aracılığıyla ya da iç membran taşıyıcılarıyla taşınabilir [71].



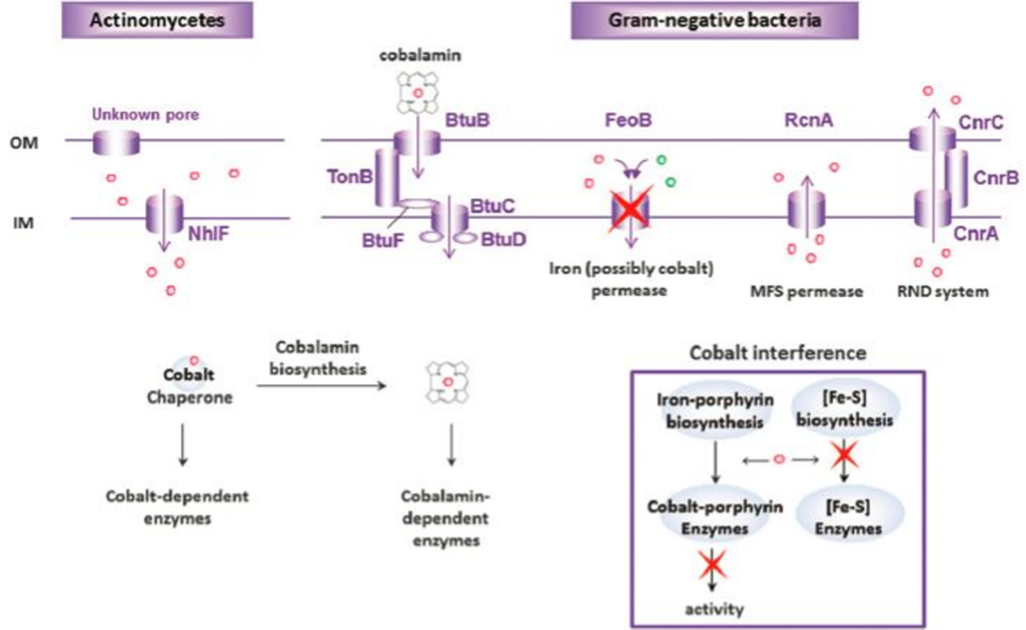
Şekil 1.10. *TonB* bağımlı Ni giderimi [71].

1.1.7. Co Direnç Mekanizması

Mikroorganizmalar bir veya birkaç direnç kombinasyonuna sahip olabilir. Kromozomal ve plasmid tabanlı metal direncinin sistemleri arasında farklılıklar vardır. Temel metal direnç sistemleri genellikle kromozom tabanlı ve plasmid sistemlere göre daha karmaşıktır. Bu iyon efflux mekanizmasının plasmid kaynaklı olması daha muhtemeldir çünkü belli durumlarda gerekli olduklarında diğer organizmalar için hızla harekete geçebilir ve gen yükünü azaltabilir [56].

Co^{2+} çoğu bakteri hücrelerinde *CorA* sistemi tarafından hızlı bir şekilde toplanır. Co konsantrasyonu çok düşük olduğunda hiçbir ATP güdümlü alım sisteminin bağlı olmadığı görülmüştür fakat *R. eutropha* bakterisinden gelen Ni taşıyıcı HoxN ile ilgili bir sistem nitril hidrataz içeren *Rhodococcus rhodochrous* bakterisinde bulunmuştur. Böylece HoxN geni B_{12} -kobalt proteini olmadan üretim için Co^{2+} temin ettiği görülür [14].

Gram negatif bakterilerde kobalt alım sistemi iç ve dış membran boyunca iyon taşınımı gerekir. Kobalt iyonları dış membran reseptörleri olarak adlandırılan yüksek affiniteli taşıyıcılar tarafından dış membran üzerinden taşınmaktadır (Şekil 1.12). Bu reseptörler enerjik TonB kompleksi tarafından iç membran proton itici güç (PMF) ile birleşmektedir [72].



Şekil 1.11. Bakterilerde kobalt giderim ve toksisite özeti [72]

1.1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Ni ve Co ağır metallerini tolere eden suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Ni ve Co metallerini tolere eden suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK değerleri belirlenmiş ve enyüksek MİK değerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Ni ve Co dirençli her bir suş için antibiyotik ve diğer metallerle dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu (curing) çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkilendirilmesi kurulmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar

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

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

2.1.1.2. Nutrient Broth

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

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

2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Ni ve Co dirençli suşların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinde Çizelge 2.1'de gösterilen antibiyotik diskler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları

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

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)

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

2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)

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

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

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

2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 gram Tris, 37.2 gram Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57.1 ml glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile tampon tamamlanmıştır.

2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 ml)

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

2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 ml)

10 gram SDS tartılarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 ml)

0.0384 CaCl₂.2H₂O tartılarak, 5 ml gliserol ve 100 µl, 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 ml oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözültiden 10 ml alınarak 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 ml)

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

2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 ml)

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

2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu (100 ml)

96 ml kloroform, 4 ml izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

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

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

2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 ml)

İzopropanol alkolden 100 ml alınarak plazmit izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.3.2.2.9. %70'lik Ethanol (100 ml)

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

2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 ml)

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

2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 ml)

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

2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu: (KH₂PO₄.K₂HPO₄)

6.8 gram KH₂PO₄ ve 8,7 gram K₂HPO₄ tartılıp 1000'er ml distile suda çözülmüştür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH: 7.0'ye ayarlanmıştır.

2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon: (10 mM Tris-HCl, pH: 8)

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülmüş ve HCl ile pH: 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon: (11,1 mM Tris-HCl, Triton X-100, pH:7,6)

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

2.1.3.2.5. SDS PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.2. SDS PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

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

2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid (100ml)	29.2 gram akrilamid ve 0.8 gram bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100ml)	2 M Tris-HCl (pH = 8.8) 75 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 21 ml. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100ml)	1 M Tris-HCl (pH = 6.8) 50 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 46 ml. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 ml)	0.5 gram amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 ml'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 µM) 3 gram, glisin (192 mM) 14,4 gram, SDS (% 0,1) 1 gram tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH =8,3
ÖrnekTamponu (5x) (10ml)	1 M Tris-HCL (pH = 6.8) 0,6 ml, %50 Gliserol 5 ml, %10 SDS 2 ml; 0.5 ml 2-merkaptotanol, %1 Bromfenol mavisi 1 ml; 0.9 ml distile su. Buzdolabında saklanır.

2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

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

2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)

Çizelge 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması

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

2.1.3.2.7. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak, Türkiye topraklarından doğarak yine Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsudur. Adını akarsu yatağının tabanında bulunan, 3. zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu-killi tortudan alır. Uzunluğu 1355 km.dir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi nehir, İç Anadolu'nun en doğusundaki Sivas ilinde Kızıldağ'ın güney yamaçlarından yaklaşık 39.8° kuzey 38.8° doğu noktasından doğar, ilk önce batı ve güney batıya 38.7° kuzey 34.8° doğuya kadar akar, daha sonra yay şeklinde biçimlenir. İlk batıya, daha sonra kuzeydoğudaki Tuz Gölü'nü geçerek kuzeybatıya akar. Daha sonra kuzey ve kuzeydoğuya yönelir. Burada Delice Irmağı ile 40.47° doğu 34.14° batı noktasında birleşir. Sonra zigzaglar çizerek kuzeybatıya akar. 41.10° doğu 34.42° batı da Devrez Nehri ile birlikte akar ve kuzeydoğuya doğru döner. Sonuçta Karadeniz'e 41.72° kuzey 35.95° doğu noktasında boşalır. Sırasıyla Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve

Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır [73].



Şekil 2.1.Kızılırmak'ın lokasyonu [74]

Kızılırmak Nehri Türkiye'nin en uzun akarsuyu olduğundan ülkemiz açısından çok önemli bir su kaynağıdır. Özellikle geçtiği illerde veya yakın illerde hem içme suyu, hem sulama hem de enerji üretimi açısından hayati öneme sahiptir. Günümüzde kuraklık ve küresel ısınma tehlikesinin gözle görülür derecede arttığı düşünülürse su kaynaklarının kullanımı, işletilmesi gibi konular ön plana çıkmıştır [73].

2.2.2. Örneklerin Toplanması

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

Çizelge 2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

Bölge Numarası	Bölge Adı	Bölge Koordinatları
1	Kesikköprü Barajı	39° 23' 53,41"K, 33° 25' 18,44"D, 775m
2	Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi	39° 22' 50,98"K, 33° 24' 56,99"D, 819,5m
3	Erdemli Mah. - Sarımusalli Mevkii	39° 26' 54,60"K, 33° 23' 25,53"D, 781m
4	Akkoşan Merkez Mevkii	39° 28' 25,39 "K, 33° 24' 00,99"D, 801m
5	Eğribük - Akkoşan Yerleşim Mevkii	39° 32' 26,97"K, 33° 23' 59,54"D, 760m
6	Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii	39° 33' 51,02"K, 33° 24' 38,51"D, 750,5m
7	Sulubük - Kıybağı Mevkii	39° 37' 04,85"K, 33° 26' 11,19"D, 771m
8	Kapulukaya Barajı Girişi	39° 39' 42,39"K, 33° 27' 13,46"D, 766,5m
9	Kapulukaya Barajı Su Tutma Bendi	39° 44' 08,62"K, 33° 28' 59,95"D, 741m
10	Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii	39° 46' 56,08" K, 33° 27' 42,27"D, 718,5m
11	Mezbahane - MKE Tesisleri Mevkii	39° 50' 00,92"K, 33° 28' 07,85"D, 706,5m
12	Irmak Mevkii - Kızılırmak İl Sınırı Çıkışı	39° 56' 53,25"K, 33° 25' 04,24"D, 699,5m

2.2.3. Ni ve Co Dirençli Bakterilerin İzolasyonu

Ni ve Co ağır metallerin itolere eden suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Ni ve Co dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı NiSO₄ve CoNO₃ ağır metalleri içeren nutrient agar (NA) ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan

su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Ni ve Co dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması

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

2.2.5. Ni ve Co Dirençli Bakterilerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Ni ve Co ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda NiSO₄ ve CoNO₃ eklenerek saptanmıştır. 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petriyelerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki ayrı ayrı Ni ve Co metalleri bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saat süre sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

Kırıkkale-Kızılırmak'tan Ni ve Co dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiştir ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiştir. ve API 20 kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır [75,76].

2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

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

Ni'ye dirençli suşun, çoklu metal direnç profilini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda Cd, Al, Li, Ba, Cr, Mn, Pb, Sr, Fe, Cu, Sn, Ag, Zn, Hg, Sb, ağır metallerini içeren NA besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme görülen suşlar ortama ekilen metale karşı dirençli, üreme görülmemeye ise o metale karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Co dirençli suşta ise Ni dirençli suşta kullanılan metod uygulanmıştır.

Ni dirençli suşun antibiyotik direnç profilini belirlemek için Ni içermeyen NA besiyeri hazırlanmıştır. Ekim yapılan besiyerine Çizelge 2.1'de belirtilen antibiyotik diskleri uygulanmış 30°C 48 saat inkübe edilmiştir. Disk etrafında zon görülmesi o antibiyotiğe duyarlı olduğu, zon görülmemesi durumunda dirençli olduğu tespit edilmiştir. Co dirençli suşta ise Ni dirençli suşta kullanılan metod uygulanmıştır.

2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

MİK değerleri belirlenen Ni ve Co metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µl örnek alınarak, 100 ml NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Ni ve Co metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Ni içeren kültürler 30°C ve Co içeren kültürler 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD₆₀₀ nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

2.2.9. Plazmit DNA İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [77]. Plazmit izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda NiSO₄ ve CoNO₃ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. 30 ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen kültürlerden 1.5 ml alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1.5 ml kültür konularak işlem tekrarlanmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µl GTE (glukoz/ tris/ EDTA) ilave edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200 µl, 0.2 N NaOH/ %1 SDS solüsyonun üzerine ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 150 µl, 3M potasyum asetat ilave edilmiştir ve karıştırılarak 5 dakika bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen solüsyonun üst kısmı toplama tüpüne alınarak pellet kısmı atılmıştır. %100'lük etanolden 900 µl tüplere konulmuş ve -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Gece sonunda beklemiş olan solüsyon 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine %70'lik etanolden 1 ml eklenerek 15 dakika 13.100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz atılmıştır ve pellet üzerine 20 µl su ve 5 µl boya ilave edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzole edilen Ni ve Co dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [78] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. 15 ml'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 5.7 ml TE tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz K ve RNAaz eklenerek 60 dakika 37°C inkübe edilmiştir.

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

izoamil alkol tamponu eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 ml %70’lik etanol eklenmiş ve 10 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmıştır ve pellet kurutularak 200 µL TE tamponu eklenmiştir ve -20°C’de saklanmıştır.

2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması

%1,5’luk jel hazırlamak için 1.5 g agaroz 100 ml 10x TAE tamponu ile çözüldükten sonra ısıtılarak eritilmiştir. Çözelti yaklaşık 40°C’ye kadar soğutulup, jel kutusuna dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice ayrılmıştır. 20-25 µL’lik miktarlarda DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet ile örnek çukurlarına yüklenmiştir. Separe edilen plazmitlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacı ile jeldeki çukurlardan birine 3 µL marker DNA (Sigma Lambda DNA Ecor I + Hind III ready to use solution) yüklenmiştir. Jel agaroz aparatına yerleştirilmiştir. Aparata jelin üzerini kaplayacak kadar yürütme tamponu konulmuştur. 100 V/cm₂ voltaj uygulanarak 1.5 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır. Separasyon zamanını sonlandırmak için, yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin jelde katettiği mesafe bize yol gösterir.

2.2.12. DNA’nın Etidyum Bromid ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromid boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası jeli 1 mM MgSO₄ solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Jel daha sonra U.V. transillüminatör üzerine konularak fotoğrafları çekilmiştir [79].

2.2.13. Plazmit DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA/EcoRI+HindIII marker referans alınarak, her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bandlarının yürüdüğü mesafe ve bandların bilinen molekül ağırlık degerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen plazmit DNA bandlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmid Curing)

İzole edilen Ni dirençli bakterinin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılmıştır [80]. Ni dirençli suşun optimum üreme sıcaklığı 30°C'dir. Plazmit eliminasyon çalışmalarında NB besiyerine ekimi yapılan Ni dirençli suş için en yüksek denenen sıcaklık 40°C olup, bu sıcaklıkta üremediği gözlemlenmiştir. 39°C denenmiş ve bu sıcaklıkta üreme olduğu gözlemlenmiş olup Ni içeren ve içermeyen 2 farklı NA besiyeri hazırlanmış ve 39°C'de üreyen Ni dirençli suştan ekim yapılmış, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

2.2.15. Total Protein İzolasyonu

Ni ve Co metallerine dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [81] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda NiSO₄ ve CoNO₃ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 5 ml steril su eklenerek 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelletler üzerine 2 ml fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devir de sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm de 2 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz tüplere transfer edilmiştir. 75µl örnek üzerine 75µl örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu

Dış membran proteinleri Achtman ve arkadaşları [82] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Dış membran proteinleri izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda NiSO₄ ve CoNO₃ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Kültürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 10 ml, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 3000 rpm'de, 20 dakika, 4°C'de santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Süpernatant temiz tüplere alınarak 20.000 rpm, 60 dakika, 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µl steril su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örnekler 200 µl Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20°C'de bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de, 90 dakika, 2000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 50 µl örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

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

2.2.18. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

Dış membran ve total protein analizleri Laemmli'ye [83] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı

16.7 ml Akrlamid/Bis Akrlamid (%30'luk), 19.8 ml distile su, 12.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 ml %10'luk APS (amonyum persülfat), 500 ml %10'luk SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 ml TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı

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

2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

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

2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitleme çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [84]. Jellerin fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar, jel görüntüleme cihazı (Corestream Molecular Imaging Software Standart Edition) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [85].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Ni ve Co'ya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden Ni ve Co'ya dirençli suşlar izole edilmiştir. Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi Ni'ye dirençli 8 suş ve Co'ya dirençli 5 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. En yüksek MİK değeri NiSO₄ için 395 mg/L, CoNO₃ için ise 750 mg/L olarak belirlenmiştir. Nikel için MİK değeri 395 mg/L olan suş 11. bölgeden izole edildiği için Ni11 kodlanmıştır. Kobalt için MİK değeri 750 mg/L olan suş yine aynı bölgeden izole edildiği içinde Co11 olarak kodlanmıştır.

Çizelge 3.1. Ni ve Co dirençli suşların bölgelere göre yayılımı

İzolasyon Bölgeleri ve Bakteri Üreme Durumları												
Ağır Metaller	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NiSO ₄	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CoNO ₃	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

(-), negatif, (+), pozitif

3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2’de Ni11 ve Co11 kodlu suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek tanımlanması yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Ni ve Co dirençli suşlarının biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Testler	Nikel Dirençli Suş Ni11	Kobalt Dirençli Suş Co11
Şekil	Kok	Kok
Gram Reaksiyon	(-)	(+)
Akışkanlık	Akışkan	Akışkan
Optik Özellikler	Opak	Opak
Pigment	Beyaz	Turuncu
Urea (URE)	-	+
Maltose (MLT)	+	+
Mannose (MNE)	-	-
Arabinose (ARA)	-	-
Glucose (GLU)	+	+
Mannitol (MAN)	-	+
Xylose (XYL)	-	-
Galactose (GLC)	-	-
Ornithine Decarboxylase	-	-
Trehalose (TRE)	-	+
Cellobiose	+	-
Arginine (ARG)	-	+
Xylitol (XYL)	-	-
Salicin	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-
Acetoin (AC)	-	+
Nitrat Reduction	-	+
Lactose (LAC)	-	-
Sucrose (SUC)	-	+
Fructose (FRU)	-	+
Oxidase	+	-
Tanımlanan Türler	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi nikel dirençli Ni11 kodlu suşun gram negatif bir kok olan *Comamonas testosteroni* olduğu belirlenmiştir. Daha önce *Pseudomonas testosteroni* olarak adlandırılan mikroorganizmanın cinsi 1987 yılında *Comamonas* cinsine aktarılmış ve *Comamonas testosteroni* olarak adlandırılmıştır [86]. Kobalt dirençli Co11 kodlu suşun gram pozitif bir kok olan *Staphylococcus warneri* olduğu belirlenmiş olup hayvan ve insan derisinde yaşadığı tespit edilmiştir.

3.3. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

İzole edilen nikel dirençli *Comamonas testosteroni* suşu ile kobalt dirençli *Staphylococcus warneri* suşlarının metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir.

3.3.1. Ni Dirençli *Comamonas testosteroni* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

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

Çizelge 3.3. Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili
Hg(NO ₃) ₂ H ₂ O	195	S
Pb(NO ₃) ₂	1200	S
MnSO ₄	1000	S
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	825	S
FeCl ₃	450	S
NiSO ₄ ·7H ₂ O	450	S
K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆	1400	S
AgNO ₃	8	R
Cd(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	S
SnCl ₂ ·2H ₂ O	160	R
LiCl	5000	R
AlCl ₃ ·6H ₂ O	300	R
BaCl ₂ ·2H ₂ O	2700	R
CrN ₃ O ₉ ·9H ₂ O	1050	S
Sr(NO ₃) ₂	2000	R
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	395	S

R, dirençli; S, duyarlı

Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun ise Şekil 3.4’de gösterildiği gibi ampicilin, gentamicin, netilmicin, oxacillin, pefloxacin, penicillin, sulbactam, trimeth-sulfa, vancomycin antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

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

R, dirençli; S, duyarlı

3.3.2. Co Dirençli *Staphylococcus warneri* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

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

Çizelge 3.5. Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

Metal Formu	Konsantrasyon (mg/L)	Dirençlilik Profili
Hg(NO ₃) ₂ H ₂ O	195	S
Pb(NO ₃) ₂	1200	R
MnSO ₄	1000	R
ZnSO ₄ 7H ₂ O	825	S
FeCl ₃	450	S
NiSO ₄ 7H ₂ O	450	S
K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆	1400	S
AgNO ₃	8	R
Cd(NO ₃) ₂ H ₂ O	750	R
SnCl ₂ 2H ₂ O	160	R
LiCl	5000	R
AlCl ₃ 6H ₂ O	300	R
BaCl ₂ 2H ₂ O	2700	R
CrN ₃ O ₉ 9H ₂ O	1050	S
Sr(NO ₃) ₂	2000	R
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	395	R

R, dirençli; S, duyarlı

Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi ciprofloxacın, gentamicin, netilcimin, pefloxacın, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

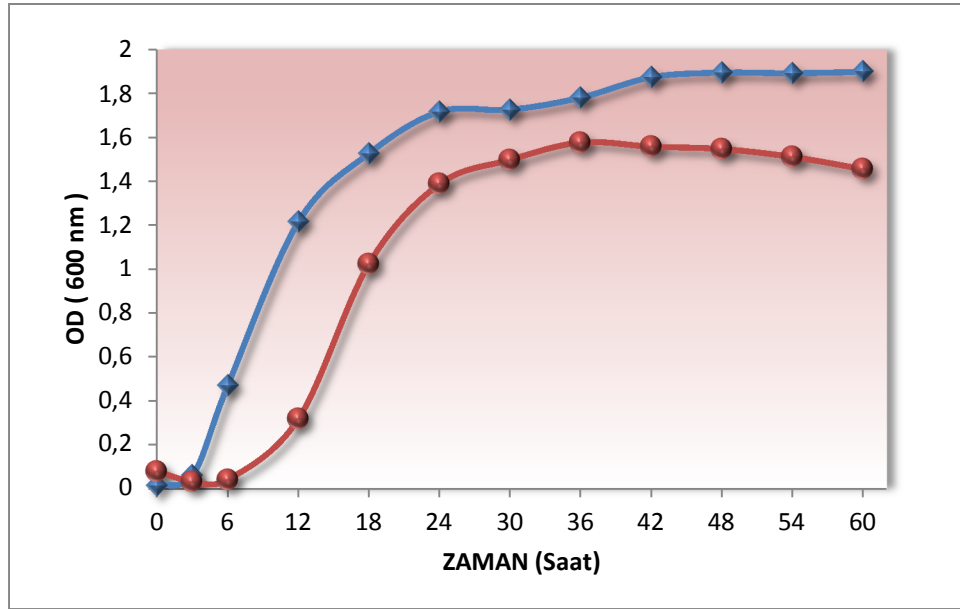
Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik
Amikacin (30)	S
Amoxycilli/CA (20/10)	S
Ampicilin (10)	S
Aztreonam (30)	S
Bacitracin (10)	S
Cefepime (5)	S
Ceftazidime (30)	S
Ciprofloxacın (5)	R
Chloramphenicol (30)	S
Gentamicin (10)	R
Erythromycin (15)	S
Imipenem (10)	S
Netilcimin (30)	R
Oxacillin (1)	S
Pefloxacın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

R, dirençli; S, duyarlı

3.4. Bakteri Üreme Eğrileri

3.4.1. Ni Dirençli *Comamonas testosteroni* Suşunun Üreme Eğrisi

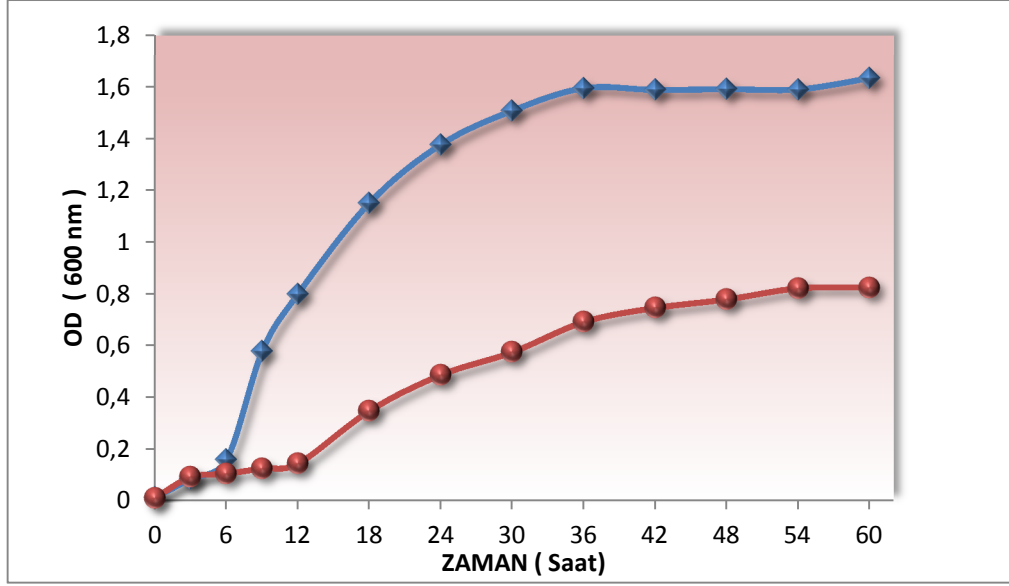
Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun elde edilen büyüme eğrisi Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu suşun Ni içermeyen ortamda log fazına erken girdiği ve Ni içeren ortamdaysa log fazına yaklaşık 3.5 saat kadar geç girdiği görülmektedir. Ni varlığı OD’de ciddi bir düşüşe neden olmamıştır.



Şekil 3.1. *Comamonas testosteroni* suşunun (—◆—) Ni içermeyen ve (—●—) Ni içeren ortamdaki üreme eğrisi

3.4.2. Co Dirençli *Staphylococcus warneri* Suşunun Büyüme Eğrisi

Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun elde edilen üreme eğrisi Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Co içeren ortamda suşun logaritmik faza 6 saat kadar geç girdiği tespit edilmiştir. Co varlığı OD’de yarıya kadar bir düşüğe neden olmuştur.



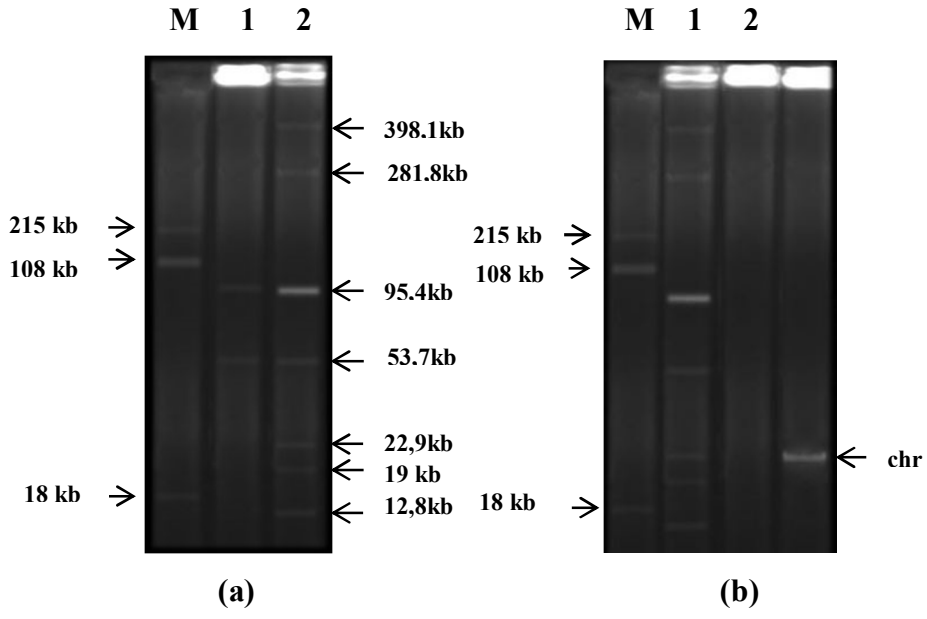
Sekil 3.2 *Staphylococcus warneri* suşunun (—◆—) Co içermeyen ve (—●—) Co içeren ortamdaki üreme eğrisi

3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Ni ve Co dirençli suşların metal dirençliliği ile bu suşların plazmit içerikleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit izolasyonu ve eliminasyonu çalışmaları yapılmıştır.

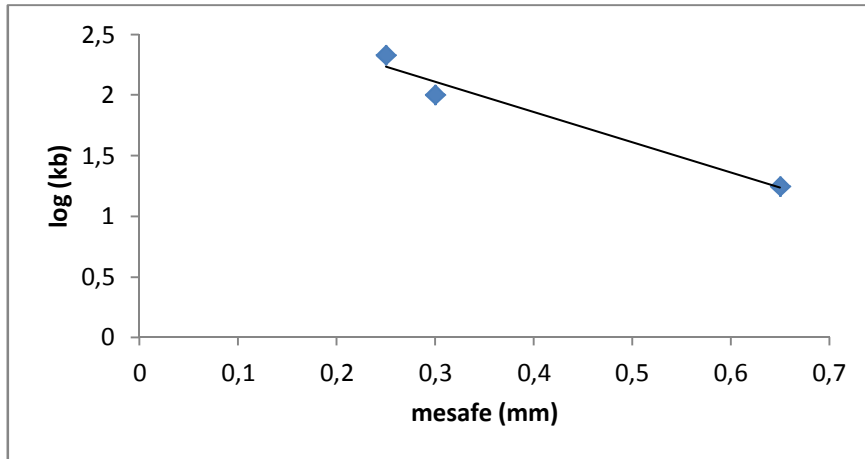
3.5.1. Ni Dirençli *Comamonas testosteroni* Suşunun Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun plazmit ve kromozomal DNA profilleri belirlenmiştir. Her bir jel için ayrı ayrı elde edilen ve Şekil 3.4’de bir örneği gösterilen standart eğri ile moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit DNA’ların moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. *Comamonas testosteroni*’de Ni içeren ortamda 12.8, 19, 22.9, 53.7, 95.4, 281.8 ve 398,1 kb büyüklüğünde 7 plazmit belirlenmiştir. (Şekil 3.3). Ni içermeyen ortamdaysa bu plazmitlerden sadece 53.7 ve 95.4 kb büyüklüğündeki plazmitlerin varlıklarını devam ettirdikleri tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında *Comamonas testosteroni* suşunun tüm plazmitlerini kaybettiği buna bağlı olarak ta nikel direncinin ortadan kalktığı, vancomycin, penicilin, oxacilin, cefoperazone ve amplicilin gibi antibiyotiklere karşı ise duyarlı hale dönüştüğü belirlenmiştir.



Şekil 3.3. *Comamonas testosteroni* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

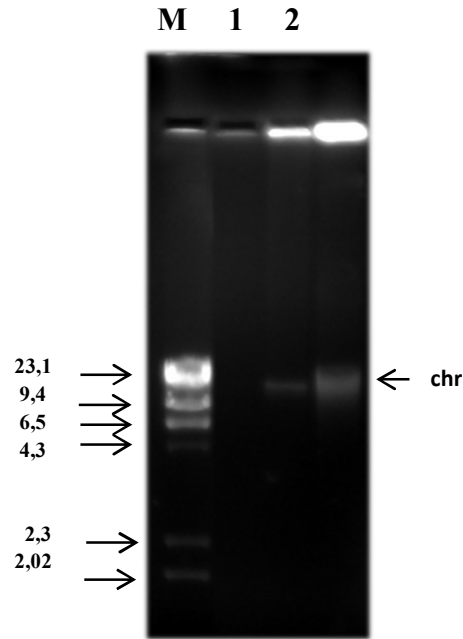
(a)1: nikel içermeyen, 2: nikel içeren ortam (b)1; plazmit DNA (nikel içeren ortam), 2: plazmit DNA eliminasyon sonrası, chr: kromozomal DNA, M: marker (*Agrobacterium tumefaciens* 215,102 ve 18 kb)



Şekil 3.4. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.5.2. Co Dirençli *Staphylococcus warneri* Suşunun Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

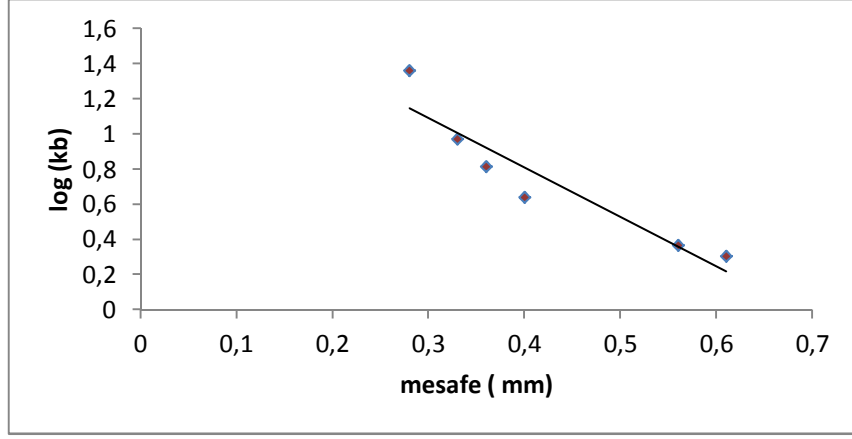
Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun plazmit ve kromozomal DNA profilleri belirlenmiştir. Şekil 3.5'te gösterildiği gibi *Staphylococcus warneri* Co içeren ve içermeyen ortamda plazmit varlığı tespit edilememiştir.



Şekil 3.5. *Staphylococcus warneri* plazmit DNA Profili ve kromozomal DNA

Lokasyonu

1: kobalt içermeyen, 2:kobalt içeren ortam, chr: kromozomal DNA , M; marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII)



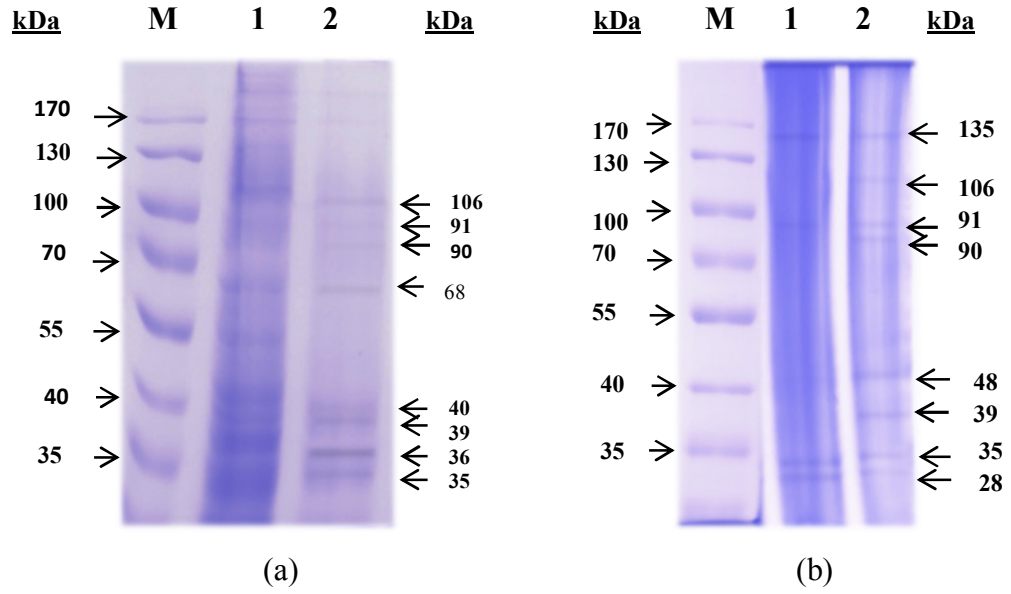
Şekil 3.6. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Profili

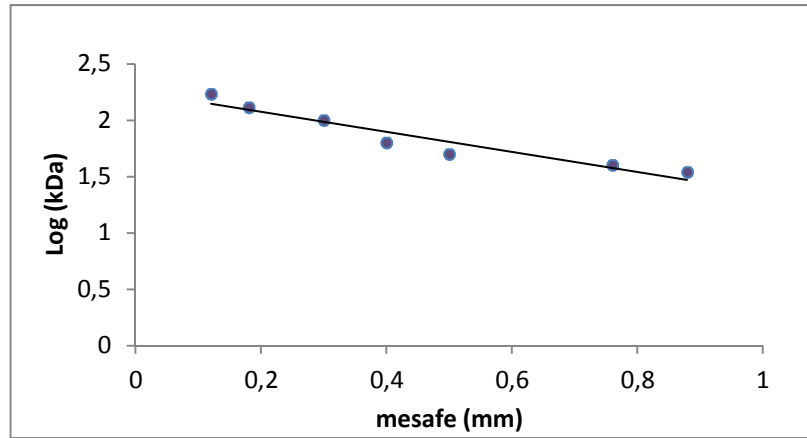
Ni ve Co dirençli suşların metal içeren ve içermeyen ortamlardaki dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir.

3.6.1. Ni Dirençli *Comamonas testosteroni* Suşunun Total ve Dış Membran Protein Profili

Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir (Şekil 3.6). Şekil 3.7'de bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein analizleri sonucunda *Comamonas testosteroni* suşunun nikel içeren ortamda 35, 36, 39, 40, 68, 90, 91, 106, 170 kDa büyüklüğündeki bantların ekspresyonlarında azalmalar tespit edilmiştir. Aynı suşun nikel içeren ortamda 35, 39, 48, 90, 106 kDa büyüklüğündeki dış membran protein bantların eksprese olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşunun total (a) ve dış membran (b) protein profilleri
M; marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder- 170 kDa), 1: nikel içermeyen
2: nikel içeren ortam.

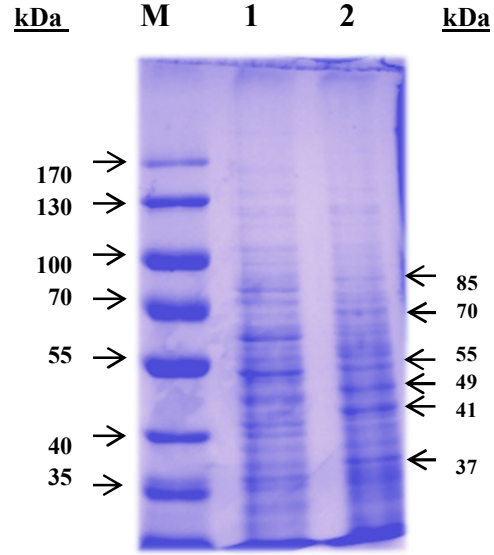


Şekil 3.8. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.6.2. Co Dirençli *Staphylococcus warneri* Suşunun Total Protein Profili

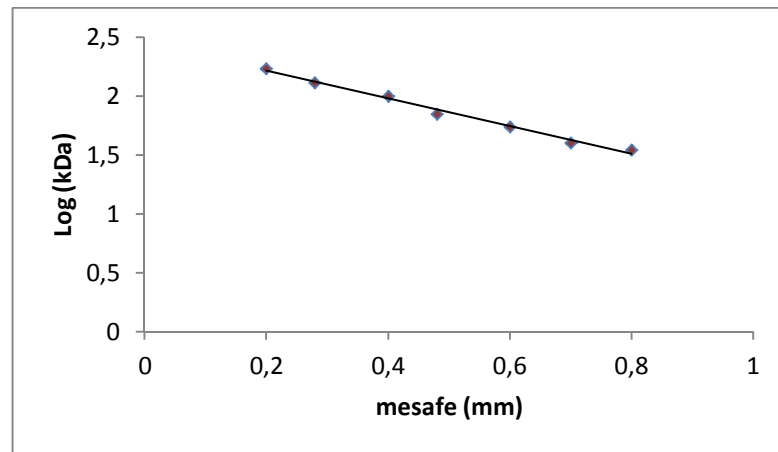
Co dirençli *Staphylococcus warneri* suşunun total protein profili belirlenmiştir ve Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Şekil 3.9’da bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bandlarının

moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Co içeren ortamda 37, 41, 49, 55, 70 ve 85 kDa boyutlarındaki bantların ekspresyonlarında sırasıyla 2, 4, 3, 1.1, 1.3, 1.1 kat artış tespit edilmiştir.



Şekil 3.9. Co Dirençli *Staphylococcus warneri*'nin total protein profili

1: kobalt içermeyen, 2: kobalt içeren ortam, M; marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder- 170 kDa)



Şekil 3.10. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kızılırmak üzerinde örnek toplanan 12 istasyonların sekizinde Ni dirençli bakteriler izole edilmiştir. MİK değeri 395 mg/L ile en yüksek Ni direnci gösteren suş 11. bölgeden izole edilmiştir. Morfolojik özellikleri ve biyokimyasal özellikleri belirlenen suş *Comamonas testosteroni* olarak tanımlanmıştır. Kobalt için MİK değeri 750 mg/L olan ve yine aynı bölgeden izole edilen suşta morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak *Staphylococcus warneri* olarak tanımlanmıştır.

Jackson ve arkadaşlarının [87] yaptığı bir çalışmada Plankenburg nehrindeki metal konsantrasyonlarını Al için 11.56 mg/L, Ni için 0.17 mg/L, Fe için 12.2 mg/L olduğu tespit etmişlerdir. Olası metal dayanıklılığına sahip mikroorganizmalar *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Delftia tsuruhatensis* A90 , *Kocuria kristinae* 6J-5b, *Comamonas testosteroni* WDL7, *Stenotrophomonas maltophilia*776, *Staphylococcus* sp. MOLA:313, *Micrococcus* sp. TPR14, *Sphingomonas* sp. 8b-1 ve *Microbacterium* sp. PAO-12. olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada izole edilen Ni dirençli *C. testosteroni* suşu için belirlenen 395 mg/L olan MİK değerinin diğer çalışmalara ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu dikkat çekicidir.

Ünaldı ve arkadaşları [88] tarafından yapılan bir çalışmada bir *Pseudomonas* suşunun kadmiyum için MİK değeri 5 mM olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bütün izolatların krom'a (MİK'leri 1-1.7 mM arasında) çok düşük dirençlilik gösterdiği belirtilmiştir. Suşların %32'si 6mM Cu'ya, %14'ü 9mM Ni'ye, %28'i 9mM Cd'ye ve %42'si 1.7mM Cr'ye tolerans gösterdiği belirtilmiştir. Toprak örneklerinden izole edilen bir suş; Cu (21mM), Ni (18mM), Cr (1,7mM) ve Cd (10mM)'un yüksek konsantrasyonlarını nispeten tolere edebilmiştir. Baska bir suş ise; Cu (7mM), Ni (7mM), Cr (1,5mM) ve Cd(7mM) tolere edebilmiştir. Aynı çalışmada *Pseudomonas* suşunun içerdiği 20.8 , 19.6 , 8 ve 4.7 kb büyüklüğünde 4 adet plazmit tespit edilmiştir. Bulunan ağır metal direnç genlerini içeren plazmitleri transformasyon çalışmalarıyla *E. coli* AB3505 suşuna transformasyon çalışmaları yapılmıştır.

Özellikle maden ocaklarının bulunduğu çevrelerden izole edilen mikroorganizmalar arasında, ağır metal dirençliliği yaygın olarak bulunan bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. *Acidiphilum* ve *Acidocella* cinsi bakteriler Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} gibi metallerin 1M konsantrasyonlarına plazmitler aracılığıyla direnç gösterdiği belirtilmiştir. S. Ghosh ve arkadaşlarının [89] yaptığı bu çalışmada, *Acidocella* sp. GS19h suşu hem Cd^{2+} hem de Zn^{2+} dirençli olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada Ni^{2+} için belirlenen MİK değeri 200 mM olduğu rapor edilmiştir.

Kömür maden aktiviteleri büyük miktarda yan ürün ortaya çıkarmasıyla karakterize edilir. Bunlardan biri ağır metallerin çözünmesi için sulu asit oluşturma eğiliminde olan pirittir. Marcus ve arkadaşlarının [90] yaptığı bir çalışmada, Santa Catarina'da kömür madenciliği alanındaki mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonunu açıklamışlardır. 96 bakteri ve mantar suşunu izole etmişlerdir. Bakteriler nötrofilik ve asidofilik olarak ikiye ayırmışlardır. Çalışma sonucunda *Acidiphilium* ve *Acidocella* cinsi bakterilerin 1M Cd, Zn, Ni ve Cu gibi yüksek metal konsantrasyonlarına plazmit aracılı direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada tespit edilen ağır metal direncinin yüksek oranda olması nedeniyle bu mikroorganizmaların biyoremediasyon çalışmalarında kullanabilme potansiyelini vurgulamışlardır.

Roane ve Kellog [91] yaptıkları çalışmada ağır metal kontaminasyonu bulunan topraktan izole edilmiş dirençli *Pseudomonas* suşu (kadmiyum için MİKdegeri;1.2 mM) tespit etmişlerdir. Ayrıca Ni'ye dirençli bakteriler de rapor edilmiştir. Bir galvanizasyon tankından izole edilen *Alcaligenes xylosoxidans* 31A suşunun, Cu (1 mM), Cd (1 mM), Zn (10 mM), Co (20 mM), Ni (40 mM)'in yüksek konsantrasyonlarını tolere edebildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Ni ve Co direnç genlerinin ekspresyonuyla oluşan proteinleri de tanımlamışlardır.

Congeevaram ve arkadaşlarının [92] ağır metal dirençli mantar ve bakterilerin, galvanize endüstrisinin toprak örneklerinden ve endüstriyel atık sulardan ağır metal giderimi için uygulanabilirliğini değerlendirmek için Cr^{4+} ve Ni^{2+} biyobirikimi karakterize etmişlerdir. Her izolat için hem optimum pH ve sıcaklık koşulları hemde

büyüme ve ağır metal giderimi belirlemişlerdir. Fungal izolatlar için optimum pH bakteri izolatı için olandan daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteri strainleri için metal konsantrasyonları Ni^{2+} için 50 mg/L Cr^{4+} için 100 mg/L olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Sporophyticus*, *Bacillus*, *Phanerochaete* cinslerine ait suşların endüstriyel atıksularından krom ve nikel giderimi için uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında bu çalışmada izole edilen Ni dirençli *Comamonas testosteroni* suşu için belirlenen MİK değerinin yüksek olması bu suşun Kızılırmak'ta uzun süreli Ni stresine maruz kaldığını düşündürmektedir. Ağır metallerin çevrede birikimleri, bakterilerde bunlara karşı direnç gelişimine ve giderek dirençli klonların seleksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan araştırmalarla çoğunluğu çevresel bakteriler olmak üzere birçok bakteri türünde ağır metal direncinin yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir.

Staniland ve arkadaşları [93], ağır metallerle kontamine olmuş Kitwe bölgesinde *C. testosteroni* suşunun Co ve diğer geçiş elementlere karşı dirençliliği araştırmışlardır. Özellikle Co direnci gösteren *C. testosteroni* suşunun Co birikiminin büyüme üzerinde olumlu bir etki yarattığı tespit edilmiştir. Ni^{2+} için 0.2 μ M, Co^{2+} için 200 μ M konsantrasyona direnç gösterdiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise Ni dirençli *C. testosteroni* suşu çoklu metal dirençliliği göstermesine karşın Co direnci göstermediği belirlenmiştir.

Endüstriyel kirli sularla sulanan tarım topraklarında yüksek düzeyde Fe, Cr, Cu, Zn, Ni ve Cd ağır metalleri analiz edilmiştir. Bu topraklardan elde edilen 40 bakteri izolatı 17 *Enterobacteriaceae* familyasına ait, 10 tanesi *Pseudomonas* sp. olduğu gösterilmiştir. MİK değerleri Cd için 200, Zn ve Cu için 400, Ni için 800, Pb için 1600 mg/L olarak belirlenmiştir [94]. *Pseudomonas* sp. suşunun bu çalışma kapsamında bulunan Ni direncinden daha yüksek bir Ni direnci gösterdiği görülmüştür.

Nikel dirençli bakterinin antibiyotik ve diğer ağır metallerle karşı çoklu dirençlilik profili de incelenmiştir. *Comamonas testosteroni* suşunun Al, Li, Ba, Ag, Sn, Sr metallerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir. Antibiyotik direnç profiline

bakıldığında ise penicillin, ampicilin, sulbactam, oxacillin, vancomycin, gentamicin, netilmicin, pefloxacin, trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği saptanmıştır.

Wright ve arkadaşlarının [95] yaptığı çalışmada, artan Cd miktarıyla mikroorganizmaların dirençliliğinde de artış görülmüş ancak sadece bu metale karşı değil aynı zamanda Ni metaline ve ampicillin ve gentamicin antibiyotiklerinede dirençliliğin arttığı görülmüştür. *P. aeruginosa* çoklu antibiyotik ve metal dirençliliğine sahip bir bakteri olduğu tanımlanmıştır. Zn dirençliliğinin yanı sıra Co ve Cd dirençliliğininde olduğu gösterilmiştir. Carbapenem sınıfı imipenem antibiyotiklerinde direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Kobalt dirençli bakterinin antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profilleri incelenmiştir. *Staphylococcus warneri* suşunun Cd, Al, Li, Ba, Mn, Pb, Ag, Sn, Ni, Zn metallere ve ciprofloksacin, gentamicin, netilmicin, pefloxacin, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği saptanmıştır.

Sabry ve arkadaşları [96], deniz suyunda total heterofilik ve metal dirençli bakteri toplulukları çalışmışlardır. Sekiz ağır metal 81 bakteri izolatu için MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İzolatların bir bölümü Hg (%91), Zn (%84), Co (%83), Cd (%99)'a duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların bir çoğu çoklu metal dirençliliği gösterdiği rapor edilmiştir. Co dirençliliği gösteren izolatın aynı zamanda penicillin, ampicillin, gentamicin dirençliliğide görülmüştür. Hem kobalt hem çinko dirençliliğine sahip bir izolatın, tetracycline, polymyxin ve streptomycin, antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir.

Sannasi ve arkadaşları [97], yaptığı bir çalışmada, kültürdeki Cd^{2+} , Cr^{4+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Pb^{2+} gibi ağır metalleri içeren sulu çözeltilerdeki bakteri kültürünün büyüme karakterizasyonu, mikroskop ve biyokimyasal testleri açıklamışlardır. Mikroskop ve biyokimyasal testlerle 6 gram negatif (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Flavobacterium* sp., *Chryseomonas* sp., *Xanthomonas* sp. ve *Agrobacterium* sp.) ve 3 Gram pozitif (*Bacillus* sp, *Arthrobacter* sp, ve *Micrococcus* sp) bakteri

tanımlamışlardır. Bu bakterilerin yüksek konsantrasyonda Cd, Cr, Cu, Ni ve Pb dirençliliği olduğunu belirtmişlerdir.

Ni ve Co dirençliliğinin plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkisini belirlemek amacı ile nikel ile kobalt dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Yapılan deneylerde, *Comamonas testosteroni*'nin nikel içeren ve içermeyen ortamda da plazmit bulundurduğu gözlemlenmiştir. Metallsiz ortamda *Comamonas testosteroni*'de 53.7 ve 95.4 kb büyüklüğündeki plazmit tespit edilmiştir. Metalli ortamda ise bu plazmitlere ek olarak 12.8, 19, 22.9, 281.8 ve 398,1 kb boyutunda 7 plazmit tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu ile tüm plazmitleri elimine edilen *Comamonas testosteroni*'nin Ni direncini ve kaybettiği penicilin, ampicilin, cefoperazone, oxacilin antibiyotiklerine karşı duyarlı hale geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Ni dirençliliği ve söz konusu antibiyotik dirençliliklerinin plazmit kökenli olduğu, 12.8, 19, 22.9, 281.8 ve 398,1 kb boyutlarındaki plazmitlerle ilişkili olacağı sonucuna varılmıştır. Stoppel ve arkadaşları [98] yaptıkları bir çalışmada *Alcaligenes eutrophus* CH34 bakterisinde Ni ve Co dirençliliğinin pMOL28 adlı plazmit üzerinde kodlandığını belirtilmiştir. Bu çalışma bizim çalışmamızı destekler nitelikte olmakla beraber bizim çalışmamızda benzer özellikteki bir direncin Co için olmaması ilgi çekicidir. Bu sonuçlar dikkate alındığında Ni ve Co dirençlilik genlerinin her zaman birarada olmadığı söylenebilir.

Schütt [100] Skarshultsjön gölünden 62 aerobik bakteri straini plazmit analizi için izole etmiştir. İzole edilen suşlar arasında üçte biri yüksek moleküler ağırlıklı çoklu plazmit eçerdiği belirlemiştir. *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp, *Aeromonas* ve *Enterobacteriaceae* grubuna ait üyeler plazmit taşıdıkları belirtilmiştir. *Alcaligenes* sp. Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , ve Hg^{2+} dirençliğine sahip olduğu belirtilmiştir. Plazmit eliminasyon çalışmalarından sonra Ni dirençliliğinin kaybolduğu ve Ni direncinin plazmit kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bizim çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuç ile paralellik göstermektedir.

Başka bir çalışmada ise Shanab ve arkadaşları [101] *Arthrobacter rhombi* AY509239, *Clavibacter xyli* AY509235, *Microbacterium arabinogalactanolyticum*

AY509226, *Rhizobium mongolense* AY509209 ve *Variovorax paradoxus* AY512828 bakterilerinin 9 farklı metale direnç gösterdiğini Hg, Zn, Cr ve Ni metallerine karşı direncin ise kromozomal DNA üzerinde kodlandığını belirtmişlerdir. Antibiyotik direnç genlerinin olduğu gibi ağır metal direnç genlerinin de genellikle plazmit veya transpozonlarda ve aynı genetik elemanlarda birlikte bulunmaları nedeniyle gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasında antibiyotik direnciyle birlikte ağır metal direncinin de yatay geçişinin mümkün olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, antibiyotikler dirençli bakterilerin özellikle hastane ortamlarında seleksiyona uğramaları, ağır metallere dirençli suşların da seleksiyonla baskın hale gelmesi ya da tersi anlamını taşımaktadır. Antibiyotiklere direnç sağlayan beta-laktamazlar, aminoglikozidler modifiye eden enzimler vb. gibi molekülleri kodlayan genler kromozomda, plazmitlerde veya transpozonlarda bulunur. Kromozomda bulunanlar da ortamda antibiyotik bulunduğu için oluşmamışlardır; ya intrensik olarak esasen mevcuttur (bazen antibiyotik bu genlerin ekspresyonunu indükler), ya bu genleri taşıyan bir bakteriden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyonla ya da plazmit veya transpozondaki genlerin kromozoma integrasyonu ile kazanılır. Plazmitler ve transpozonlar gibi genetik elementler veya bunlardaki direnç determinantları (beta-laktamaz enzimlerinin, aminoglikozidler modifiye eden enzimlerin vb. genleri) antibiyotik bulunduğu için oluşmazlar. Bu genetik elementler esasen doğada bulunmaktadır. Bunları antibiyotik üreten mikroorganizmalarla aynı ortamda yaşamak durumunda olan bakterilere doğanın bağışladığı bir savunma aracı gibi düşünebiliriz. Duyarlı bir bakteri bu genetik elementleri ancak bir genetik olayla kazanabilmektedir.

Kobalt direnci gösteren *Staphylococcus warneri* ise kobalt içeren ve içermeyen her iki ortamda plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu nedenle bu suşun kobalt dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu düşünülmektedir. Xiong ve arkadaşlarının [99] yaptığı çalışmada çoklu metal dirençliliği gösteren *Comamonas testosteroni* S44 suşunun yüksek konsantrasyonda Zn^{+2} (10mM) dirençliliği gösterdiği tespit edilmiştir. Zn^{2+} dirençliliğinin yanı sıra Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} dirençliliği de görülmüştür. Ampicillin ve kanamycin dirençliliklerinin plazmit üzerinde kodlandığını belirtmişlerdir. *C. testosteroni* gen analizi sonucunda Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} RND tipi $Co^{2+}/Cd^{2+}/Zn^{2+}$ efflux pompası tarafından kromozomal DNA

üzerinde kodlandığı tespit edilmiştir. Bu bulgular bizim bulgularımızı doğrular niteliktedir. Direnç genlerinin bakteriler arasında yayılmasında transpozonların çok büyük rolü vardır. Birçok direnç geni transpozon denilen DNA elementlerinde yer alırlar. Transpozonların bakteriyofaj-plazmid-bakteri kromozomu arasında birinden diğerine atlamalarını (transpozisyonlarını) sağlayan genleri de vardır. Bu nedenle sıçrayıcı genler olarak da tanımlanabilirler. Bu özellikleri dolayısıyla örneğin kromozomal olan bir direnç genini bakteride bulunan bir plazmide, plazmide kodlanan bir direnç genini bakteri kromozomuna veya bir başka plazmide geçirebilirler. Bu da bakteriler arasında direnç genlerinin yayılmasına yol açar.

Mergeay ve arkadaşlarının [102] yaptığı bir çalışmada Co, Zn, Cd, metallerine dirençliliği araştırılan *Alcaligenes eutrophus* suşunun iki plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Bu plazmitlerden biri 163 kb ağırlığındaki Ni, Hg ve Co dirençliliğinin bulunduğu pMOL28 plazmiti, diğerinin ise 238 kb ağırlığındaki Zn, Cd, Hg ve Co dirençliliğinin bulunduğu pMOL30 plazmiti olduğu tespit edilmiştir. Co dirençliliğinin plazmit üzerinde olduğu belirtilen bu çalışmayla yaptığımız çalışma uyuşmamaktadır.

Rodrigue ve arkadaşlarının [69] yaptığı çalışmada, *E. coli* bakterisinden *yohM* geninin izolasyonu ve birincil özelliklerini rapor etmişlerdir. Kromozomal DNA'da lokalize olan *yohM* geni ilk olarak *E. coli*'de tanımlanan Ni ve Co dirençliliği için efflux sistemi olarak ifade edilmiştir.

Çalışmamızda nikel dirençli *C. testosteroni* suşunun total ve dış membran protein profilleri belirlenmiştir. *C. testosteroni*'nin total protein profili incelendiğinde nikel içeren ortamda 35, 36, 39, 40, 68, 90, 91 ve 106 kDa ağırlığındaki protein bantlarının ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. *C. testosteroni* suşunun 55 kDa ağırlığındaki proteinin metali ortamda eksprese olmadığı görülmüştür. *C. testosteroni* suşunun dış membran protein profili incelendiğinde ise 35, 39, 48, 90, 106 kDa ağırlığındaki dış membran proteinlerinin ekspresyonu metal içeren ortamda eksprese olduğu metal içermeyen ortamda ise eksprese olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında *C. testosteroni* suşunun nikel dirençliliğinde daha çok dış membran proteinlerinin aktif olduğu düşünülmektedir.

Congeevaram ve arkadaşları [92] mikroorganizmaların ağır metallere kontamine olmuş toprak ve atıksuların biyoremediasyonda rolü olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada 50 mg/L Ni ve 100 mg/L Cr konsantrasyonlarında maruz kalması sonucu *Aspergillus* ve *Micrococcus* türlerinin protein ekspresyonları tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında (metal içermeyen ortam) *Aspergillus* sp. de 93 kDa üzerinde önemli miktarda proteinin eksprese olduğu belirtilmiştir. Ni dirençli bakteri izolatların 60 kDa'nın aşağısında bazı proteinlerin eksprese olduğu da tespit edilmiştir.

Kobalt dirençli *Staphylococcus warneri* suşlarının total protein profilleri incelenmiştir. Kobalt içeren ortamda total protein ekspresyonunda 37, 41, 49, 55, 70 ve 85 kDa boyutlarındaki bantların sırasıyla 2, 4, 3, 1.1, 1.3, 1.1 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Schmidt ve Schlegel [91] yaptıkları bir çalışmada *Alcaligenes xylosoxidans* suşunun plazmit kaynaklı Ni-Co-Cd dirençlilik genini taşıdığı tespit etmişlerdir. *A. xylosoxidans* suşu Cu galvenize tanktan izole edilmiş ve yüksek konsantrasyonda Ni(40mM), Co(20mM), Zn(10mM), Cd(1mM) ve Cu(1mM) metallere tolere edebildiği rapor edilmiştir. Bu metal direnç genleri 2 büyük plazmit pTOM8 (340 kb) ve pTOM9 (200 kb) üzerinde lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Bu iki plazmit ağır metallere duyarlı olan 3 plazmit içeren *Alcaligenes eutrophus* CH34 suşuna transformasyonla aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında her bir plazmit Ni, Co, Cd dirençliliği geliştirmiştir. Ni-Co-Cd dirençliliği kodlayan *ncc* gen bölgesinin protein ekspresyonu incelenmiş ve *ncc* operonunun 5 potansiyel gen ürünü belirlenmiştir. 114 kDa (*nccA*), 43 kDa (*nccC*), 41kDa (*nccB*), 21 kDa (*nccN*), 18 kDa (*nccX*) protein ağırlıkları tespit edilmiştir. Antibiyotik ve diğer kimyasal terapötik ajanların kullanımının yaygınlık kazanmasının en önemli yan etkisi, insan ve hayvanlarda sadece patojenlerin değil, aynı zamanda normal flora üyelerinin de adaptif mutasyonlar aracılığı ile direnç kazanmasıdır. Bu kazanılan direnç sistemlerinin tür içi ya da yakın akraba türler arasında aktarımı yanında ilişkisiz türler arasında da aktarımının sağlanabilmesi özellikle patojenlerde çoklu ilaç dirençlilik gelişiminin esasını teşkil etmektedir [103]. Plazmitlerin taşıdığı genler, çoğunlukla transpozonlar ve insersiyon elementleri gibi hareketli genom bölgeleri ile ilişkilidir. Bu sayede söz konusu genlerin bölge spesifik rekombinasyon aracılığı ile

yer değiştirmesi m¼mk¼n olmaktadır. Bazı durumlarda transpozisyonel yapılar, plazmitlerle kromozomlar, vir¼sler ya da baska plazmitler arasında da oluşabilmektedir. Bu durumun en tipik ¼rneęi ilaç dirençlilik genlerin de saptanmıştır [104]. Antibiyotik dirençlilik adaptif bir mekanizma olduğu için, dirençlilik ve vir¼lenslik genleri evrimleşmeleri açısından b¼y¼k oranda ortak ¼zellikler içermektedirler. Her iki ¼zellięi kodlayan genler veya gen grupları kromozomal DNA ve plazmid DNA ¼zerinde bulunabilmektedir. Bu genlerin genomda farklı DNA molek¼lleri ¼zerinde bulunması, hareketli elementler ya da vir¼sler tarafından tasınması ile gerçekleşmektedir. Yapılarında antibiyotik dirençlilik genlerini taşıyan çok sayıda transpozon ya da insersiyon elementi tanımlanmıştır [105].

¼zer [106], yapmış olduğu çalışmada g¼m¼ře dirençli *P. putida* ve *K. pneumoniae* suşları ile stronsiyuma dirençli *S. paucimobilis* ve *P. fluorescens* suşlarının total ve dış membran protein analizleri yapılmıştır. Metal varlığı g¼m¼ř ve stronsiyumun total ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunda bir artış g¼stermiřtir. Plazmit eliminasyon çalışmaları yapılarak dış membran ve total proteinlerinin ekspresyonlarında bir azalış olduğu tespit edilmiştir.

Aktan [107], Kızılırmak'dan izole ettiği kurşun dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun total protein analiz sonuçları kurşun varlığında bazı proteinlerin ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Turalı [108], Kırıkkale-Kızılırmak'da bulunan bakır dirençli *P. putida* ve krom dirençli *Enterococcus faecalis* suşlarının total protein analiz çalışmaları ile krom ve bakır dirençli suşların metal varlığında total protein ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Orman [109], Kırıkkale- Kızılırmak'da bulunan kalay dirençli *P. Agglomerans* ve lityum dirençli *S. aureus* suşlarının total ve dış membran analiz çalışmaları sonucunda *P. agglomerans* ¼zellikle total proteinlerin kalay dirençliliğinde etkin olduğu g¼sterilmiřtir.

Akbulut [110], Kızılrnak'tan izole ettiği *Serratia marcescens* ve *Acinetobacter haemolyticus* suşlarının Plazmit analizi ve eliminasyonu çalışmaları sonucunda her iki bakterisinde mangan direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Çinko dirençli başka bir suş olan *Acinetobacter haemolyticus*' un plazmit profil analiz çalışmaları sonucunda çinko direnç genlerinin de diğer iki izolatda olduğu gibi kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Serim [111], Kızılrnak'tan izole ettiği aliminyum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun Plazmit DNA analiz çalışmaları sonucunda alüminyum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer tarafan baryum dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Stenotrophomonas rhizophila* suşları tanımlanmıştır. Baryum dirençli *S. aureus* suşunun plazmit DNA analiz çalışmaları sonucunda *S. aureus*'un baryum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Baryum dirençli diğer suş olan *Stenotrophomonas rhizophila*'nın ise baryum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir. *S. rhizophila* için yapılan total ve dış membran protein analizleri sonucunda sadece total proteinlerin baryum dirençliliğinde etkin olduğu belirlenmiştir.

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

KAYNAKLAR

- [1] K. Selvi, Çanakkale Sarıçay'daki Ağır Metal Kirliliğinin (Ni, Fe, Cu, Zn) Bazı Bentik Makroomurgasızlar Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Çanakkale, 2006.
- [2] S. Ersoy, Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmitlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi. Mersin, 2007.
- [3] S. Aksoy, Farklı Boy Gruplarında Fitoplanktonik Organizmalar Kullanılarak Atıksulardan Cr⁺⁶ Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü. Gebze, 2008.
- [4] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü. İstanbul, 2004.
- [5] Ö. Akçelik, Ağır Metallerin *Saccharomyces cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi. Ankara, 2008.
- [6] Taylan, Z., S., Özkoç, H., B., Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. BAÜ FBE Dergisi 9(2): 17-33, 2007.
- [7] Summers, O.A., Damage control: regulating defenses against toxic metals and Metalloids. Science Direct. 12: 138–144, 2009.
- [8] Landis, W.G., Ho Yu, M., "Environmental Toxicology", Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems, Second Edition, Chapter-8 "Heavy Metals", Lewis Publishers, CRC Pres LLC, 1999.

- [9] Rainbow, P.S., Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 183-192, 1995.
- [10] Atabeyoğlu, K., Atamanalp, M., Yumuşakçalarda (Molluska) yapılan ağır metal çalışmaları. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 5 (1): 35-42, 2010.
- [11] Abu Al-Rub, F.A., El-Naas, M.H, Benyahia, F., Ashour, I., Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. *Process Biochemistry*. 39: 1767–1773, 2004.
- [12] Kılıç, N,K., Dönmez, G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*. 6 (2): 27-33, 2008.
- [13] Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste. *International Journal Of Environmental Sciences*. 2 (2): 0976-4402, 2011.
- [14] Nies, D. H., Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 730-750, 1999.
- [15] GADD, G.M., Microbial control of heavy metal pollution. Cambridge Press, Cambridge. 59–88, 1992.
- [16] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M. Van Til, M., Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Diversity and Activity as Shown by the Sensitivity-Resistance index, an Ecologically Relevant Parameter. *Biology and Fertility of Soils*. 17: 177-184, 1994.
- [17] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-II. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü. İstanbul, 2004.

- [18] Macomber, L., Hausinger R.P., Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics*. 3: 1153–1162, 2011.
- [19] B. E. Taştan, Atıksulardan Bakır (II), Nikel (II), Krom (VI) ve Reaktif Boyar Madde Gideriminde *Aspergillus* sp. Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [20] Rayner, G., *Descriptive İnorganic Chemistry*. USA, New York, 484-533, 1978.
- [21] S. F.Sibley, Cobalt, www.usgs.gov (Erişim Tarihi: 08.03.2012)
- [22] Pal, A., Ghosh, S., Paul, A.K., Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. 97: 1253–1258, 2006.
- [23] Gikas P., Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms. 159: 187–203, 2008.
- [24] Lloyd, j.R., Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. *Microbiology Today*. 69: 67-69, 2011.
- [25] Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Çevre ve Orman Bakanlığı, 2004.
- [26] F. Habashi, *Handbook of Extractive Metallurgy*. WILEY-VCH, Germany, 2, 1997.
- [27] M. Emre, Nikelli Ve Nikelsiz Altın Alaşımalarının Geniş Bir Bileşim Aralığında Fiziksel, Kimyasal, Mekanik Ve Alerjen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 2000.
- [28] <http://www.inchem.org> (Erişim tarihi: 08.03.2012)

- [29] A. Rether, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi. M nch Technik Üniversitesi. M nch, 2002.
- [30] <http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group29/nicktox.htm>
(Erişim Tarihi: 08.03.2012)
- [31] akar, Z.P., Alkım, C., Turanlı, B., Tokman, N., Akman, S., Sarıkaya, M., Tamerler, C., Benbadis, L., François, J.M., Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. 143: 130–138, 2009.
- [32] Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K., Moawad, H., Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. Electronic Journal of Biotechnology.7 (1): 0717-3458, 2004.
- [33] Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., Matis, K.A., Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry. 39: 909–916, 2004.
- [34] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells. Environment International. 30: 261–278, 2004.
- [35]A. abuk, Removal of Heavy Metals from Wastewater Using Immobilized Bacterial Biomass in Fixed Bed Bioreactor. Yüksek Lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2001.
- [36] Ahalya, N., Ramachandra, T.V., Kanamadi, R.D., Biosorption of Heavy Metals. Research Journal of Chemistry And Environment. 7(4): 71-79, 2003.
- [37] Ahluwalia, S.S., Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technology. 1-15, 2006.

- [38] Fulekar, M.H., Sharma, J., Tendulkar, A., Bioremediation of heavy metals using biostimulation in laboratory bioreactor. *Environmental Monitoring and Assessment*. 10: 1007-1061, 2011
- [39] Aslan, S., Bozkurt, Z., Tekeli, A.N., Removal of Cu (II), Ni (II), Cd (II) AND Cr (VI) Ions From Aqueous Solution by Biosorption Processes. *Journal of Engineering and Natural Sciences*. 25 (2): 209-222, 2007.
- [40] Gavrilescu, M., Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 4 (3): 219-232, 2004.
- [41] Ansari, M.I., Masood, F., Masood, A., Bacterial Biosorption: A Technique for Remediation of Heavy Metals. *Agricultural and Environmental Applications*. 283-319, 2011.
- [42] Kavamura, V.N., Esposito E., Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28: 61–69, 2010.
- [43] Rajendran, P., and Gunasekaran, P., Nanotechnology for Bioremediation of Heavy Metals. *School of Biological Sciences*. 211-221. 2007
- [44] Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R., Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 70: 95–104, 1999.
- [45] Oh, S.E., Hassan, H.E., Joo, J.H., Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *World J Microbiol Biotechnol*. 25: 1771–1778, 2009.

- [46] Bayramoglu, G., Celik, G., Yalcin, E. ve ark., Modification of Surface Properties of *Lentinus sajor-caju* Mycelia by Physical and Chemical Methods: Evaluation of their Cr⁶⁺ Removal Efficiencies from Aqueous Medium. *Journal of Hazardous Materials*. 2005.
- [47] O. Gülnaz, Bisfenol A'nın Biyolojik Parçalanması, Biyokonsantrasyon Faktörleri ve Östrojenik Aktivite Düzenlerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2006.
- [48] A. Çabuk, Beyaz Çürükçül Fungusların Siyanür Biyodegradasyonu. Doktora Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2005.
- [49] <http://www.tarimsal.com/fitoremediasyon/fitoremediasyon.htm>
(Erişim Tarihi: 08.03.2012)
- [51] Wiener, P., Müller-Graf, C., and Barcus, V., Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research, *Reviews in Undergraduate Research*, 2: 1-6, 2003.
- [52] Haubold, B., Rainey, P.B., Genetic and ecotypic structure of a fluorescent *Pseudomonas* population. *Molecular Ecology*. 5: 747–761, 1996.
- [53] Grass, G., Rensing, L., Rensing, C., Metal toxicity. *Metallomics*. 3: 1095–1097, 2011.
- [54] Allen, D.A., Austin, B., Colwell, R.R., Antibiotic Resistance Patterns of Metal-Tolerant Bacteria Isolated from an Estuary. 12 (4): 545-547, 1977.
- [55] Austin, C.B., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 14 (4): 176-182, 2006.

- [56] G. Çıtır, A Study on Cobalt Adaptation and Memory Retention of Freshwater Bacteria Isolates. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2010.
- [57] Rouch, D. A., Lee, B. T. D., Morby, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 132-141, 1995.
- [58] Nies DH, Silver S Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 186-199, 1995.
- [59] Silver, S., Phung, L.T., Bacterial Heavy Metal Resistance. *Annual Review Microbiology*. 50: 753–89, 1996.
- [60] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 119-125, 1995.
- [61] Joho, M., Inouhe, M., Tohyama, H., and Murayama, T., Nickel resistance in yeast and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 64-168, 1995.
- [62] Deng, X., Li, Q.B., Lu, Y.H., Sun, D.H., Huang, Y.L., Chen, X.R., Bioaccumulation of nickel from aqueous solutions by genetically engineered *Escherichia coli*. *Water Research*. 37: 2505–2511, 2003.
- [63] Summers, A.O., Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. *Annual Review Microbiology*. 40: 607–634, 1986.
- [64] Mathema, V.B., Thakuri, B.C., Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial Compounds. *Archives of Microbiology*. 193: 837–844, 2011.
- [65] Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P., Ritchie, D.A., Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiology Reviews*. 19: 239-262, 1997

- [66] Eitinger, T., Andrée, M., Berthelot, M., Nickel transport systems in microorganisms. *Archives of Microbiology*. 173: 1–9, 2000.
- [67] Nies, H.D., Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 313-339, 2003.
- [68] Marrero, C., Auling, G., Coto, O., Nies, H.D., High-Level Resistance to Cobalt and Nickel but Probably No Transenvelope Efflux: Metal Resistance in the Cuban *Serratia marcescens* Strain C-1. *Microbial Ecology*. 53: 123–133, 2007.
- [69] Rodrigue, A., Effantin, G., Berthelot, M.A.M., Identification of rcnA (yohM), a Nickel and Cobalt Resistance Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 187 (8): 2912–2916, 2005.
- [70] Kao, W., Huang, C., Chang, J., Biosorption of nickel, chromium and zinc by MerP-expressing recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*. 158: 100–106, 2008.
- [71] Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne1, A., Reuse, A., Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular Microbiology*. 63 (4): 1054–1068, 2007.
- [72] Okamoto, S., Eltis, L.D., The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics*. 3: 963–970, 2011.
- [73] S. Önal, Yapay Sinir Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin Akım Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009.
- [74] http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/k%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak_nehri (Erişim Tarihi: 08.03.2012)

- [75] Chang, Y., Han, J., Chun, J., Lee, K.C., Rhee, M., Kim, Y., Bae, K.S., *Comamonas koreensis* sp. nov., a non-motile species from wetland in Woopo, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 377–381, 2002.
- [76] Behme, R., Shuttleworth, R., McNabb, A., Colby, W.D., Identification of Staphylococci with a Self-Educating System Using Fatty Acid Analysis and Biochemical Tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (12): 3075–3084, 1996.
- [77] Birnboim HC., Doly J., Arapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523, 1979.
- [78] Cutting, S.M., and Horn, PB., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wileyand Sons, Chichester, Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for Bacillus., 27-74, UK, 1990.
- [79] Manniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., *Molecular Cloning a Labarotory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. 545, 1982.
- [80] Salam, A., Abosereh, N. A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M., Resistance Plasmids of Indigenous Pseudomonas in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*. 3 (9): 873-878, 2007.
- [81] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total Soluble Protein and Membrane Lipopolysaccharide Profiles in Differentiating Rhizobium isolates. *Microbios*. 86: 143-156, 1996.
- [82] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A. & Silver, R. P., Six Widespread Bacterial Clones Among *Escherichia coli* K Isolates. *Infection and Immunity*. 39: 315-335, 1983.
- [83] Laemli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-684, 1970.

- [84] Demiralp, H., Celik, S., Koksel H., Effects of Oxidizing Agents and Defatting on the Electrophoretic Patterns of Flour Proteins During Dough Mixing. *European Food Research and Technology*. 211: 322-325, 2000.
- [85] Mukhallad AM, Malcolm PS. The distribution of heavy-chain iso forms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. *Biochemical Journal*. 260: 421-426-1989.
- [86] Arda, B., Aydemir, S., Yamazhan, T., Hassan A., Tünger, A., Serter, D., *Comamonas testosteroni* meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma. *APMIS*. 111: 474–6, 2003.
- [87] Jackson, V.A., Paulse, A.N., Odendaal, J.P., Khan, S., Khan³, W., Identification of metal-tolerant organisms isolated from the Plankenburg River, Western Cape, South Africa. *Water SA*. 38 (1): 29-38, 2012.
- [88] Rodrigue, A., Effantin, G., Berthelot, M.A.M., RcnB Is a Periplasmic Protein Essential for Maintaining Intracellular Ni and Co Concentrations in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 193 (15): 3785–3793, 2011.
- [89] Ghosh, S., Mahapatra, R., Banerjee, P.C., Metal Resistance in Acidocella Strains and Plasmid-Mediated Transfer of This Characteristic to Acidiphilium multivorum and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (11): 4523–4527, 1997.
- [90] Silva, M.A.C., Lima, O., Gerchenski, A.V., Jaques, D.B. , Rodrigues, A.L., Heavy Metal Resistance Of Microorganisms Isolated From Coal Mining Environments Of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34 (1): 45-47, 2003.
- [91] Schmidt, T., Schlegel, H.G., Combined Nickel-Cobalt-Cadmium Resistance Encoded by the ncc Locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *Journal of Bacteriology*. 176 (22): 7045-7054, 1994.

- [92] Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K., Biosorption of chromium and nickel by heavy metalresistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials*. 146: 270–277, 2007.
- [93] Staniland, S., Coppock, M., Tuffin, M., Zyl, L., Roychoudhury, A.N., Cowan, D., Cobalt Uptake and Resistance to Trace Metals in *Comamonas testosteroni* Isolated From a Heavy-Metal Contaminated Site in the Zambian Copperbelt. *Geomicrobiology Journal*. 27: 656–668, 2010.
- [94] Ansari, M.I., Malik, A., Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*. 98: 3149–3153, 2007.
- [95] Austin, C.B., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-selection of antibiotic and metal Resistance. *Trends in Microbiology*. 14 (4): 176-182, 2006.
- [96] Sabry, S.A., Ghozlan, H.A., Zeid, D.M., Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of abacterial population isolated from sea water. *Journal of Applied Mjcfobiology*. 82: 245-252, 1997.
- [97] Sannasi, P., Kader, J., Othman, O., Salmijah, S., Physical Growth And Biomass Characterization Of Bacterial Cells Exposed to Cd(II), Cr(VI), Cu(II), Ni(II), and Pb(II). *Journal of Environmental Research And Development*. 4 (1): 8-18, 2009.
- [98] Stoppel, R.D., Schlegel, H.G., Nickel-Resistant Bacteria from Anthropogenically Nickel-Polluted and Naturally Nickel-Percolated Ecosystems. *Applied And Environmental Microbiology*. 61 (6): 2276–2285, 1995.

- [99] Xiong, J., Li, D., Li, H., He, M., Miller, S.J., Yu, L., Rensing, C., Wang, G., Genome analysis and characterization of zinc efflux systems of a highly zinc-resistant bacterium, *Comamonas testosteroni* S44. *Research in Microbiology*. 162: 671-679, 2011.
- [100] Schütt, C., Plasmid in the Bacterial Assemblage of a Dystrophic Lake: Evidence for Plasmid-Encoded Nickel Resistance. *Microbial Ecology*. 17: 49-62, 1989.
- [101] Shanab, A., Berkum, P., Angle, S.J., Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 68: 360–367, 2007.
- [102] Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., Gijsegem, F.V., *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*. 162 (1): 328-334, 1985.
- [103] Chakravorty, D., Wester, I. and Hensel, M, Salmonella Pathogenicity Island 2 Mediates Protection of Intracellular Salmonella from Reactive Nitrogen Intermediates. *The Journal of Experimental Medicine*. 195 (9): 1155-1166, 2002.
- [104] Helinski, D. R., An Introduction to plasmids: A selective view of their history. In: *Plasmid Biology*. B. E. Funnell and G. Philips (eds). ASM Press, Washington, DC.1-21, 2004.
- [105] Pasquali, F., Kehrenberg, C., Manfreda, G. and Schwarz, S., Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 562-565, 2005.

- [106] G. Özer, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2011.
- [107] Y. Aktan, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [108] G. Turalı, Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [109] N. Orman, Lityum ve Kalay Dirençliliği Olan Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, 2012
- [110] S. Akbulut, Endüstriyel Atık Sulardan İzole Edilen Çinko ve Mangan Dirençli Bakterilerin Tanımlanması ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, 2012
- [111] G. Serim, Alüminyum ve Baryum Dirençli Çevre İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, 2012