

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİTYUM ve KALAY DİRENÇLİLİĞİ OLAN BAKTERİLERİN  
İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

NAZLI ORMAN

HAZİRAN 2012

**Biyoloji Anabilim Dalında** Nazlı ORMAN tarafından hazırlanan LİTYUM ve KALAY DİRENÇLİLİĞİ OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

Üye : Doç. Dr. Sema TAN \_\_\_\_\_

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### LİTYUM ve KALAY DİRENÇLİLİĞİ OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

ORMAN, Nazlı

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2012, 86 Sayfa

Bu çalışmada Kırıkkale- Kızılırmak'tan izole edilen lityum ve kalay dirençli bakteriler araştırılmıştır. Minimal inhibitör konsantrasyonu  $160 \text{ mgL}^{-1}$  olan kalay dirençli bir suş izole edilmiş ve biyokimyasal testler ile *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır. *P. agglomerans* suşunun alüminyum, lityum, baryum, kurşun, gümüş, antimon, stronsiyum gibi ağır metallere ve trimeth-sülfa, basitrasin, oksasilin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suş için yapılan plazmit DNA ve eliminasyonu çalışmaları sonucu kalay direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu gösterilmiştir. *P. agglomerans* suşunun total ve dış membran protein analizleri sonucunda özellikle total proteinlerin kalay dirençliliğinde etkin olduğu gösterilmiştir. Minimal inhibitör konsantrasyonu  $5000 \text{ mgL}^{-1}$  olan lityum dirençli bir suş izole edilmiş, yapılan biyokimyasal testler sonucu *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* suşunun alüminyum, baryum, gümüş, kalay, nikel, stronsiyum gibi ağır metallere ve ampisilin, aztreonam, gentamisin, imipenem, oksasilin, penisilin, piperasilin, trimeth-sülfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. DNA analiz çalışmaları

sonucunda lityum dirençlilik genlerinin *S. aureus* suşunda kromozom DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşta total protein analizi çalışmaları yapılarak lityum dirençliliğinde etkin olan proteinler belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kalay dirençli bakteri, lityum dirençli bakteri, moleküler karakterizasyon, ağır metal dirençliliği

## ABSTRACT

### ISOLATION and CHARACTERIZATION of BACTERIA CAPABLE of LITHIUM and TIN RESISTANCE

ORMAN, Nazlı

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

June 2012, 86 Pages

In this study, tin and lithium resistance bacteria were investigated in strains isolated from the river Kızılırmak-Kırıkkale. Tin-resistant bacterium with 160 mgL<sup>-1</sup> minimal inhibitory concentration was isolated and identified as *Pantoea agglomerans* by using biochemical tests. The isolate was shown to be resistant to other heavy metals like aluminum, lithium, barium, lead, silver, antimony, strontium and the antibiotics like trimeth-sulfa, bacitracin and oxacillin. Chromosomal DNA, plasmid DNA and curing results revealed that the tin resistance ability of the isolate was chromosome-encoded. Total protein and outer membrane protein profiles revealed that only total proteins were functional in tin tolerance of *P. agglomerans*. Lithium-resistant bacterium with 5000 mgL<sup>-1</sup> minimal inhibitory concentration was isolated and identified as *Staphylococcus aureus* by using biochemical tests. The isolate was shown to be resistant to other heavy metals like aluminum, barium, silver, tin, nickel, strontium and the antibiotics like ampicillin, aztreonam, gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacilin, trimeth-sulfa. Plasmid DNA analyses revealed that

the lithium resistance ability of *S.aureus* was chromosome-encoded. Total protein isolation results descriptively showed the importance of some of these proteins in lithium resistance.

**Keywords:** Tin-resistant bacteria, lithium-resistant bacteria, molecular characterization, heavy metal resistance

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın baőından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Bülent İÇGEN'e teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye ve Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a teşekkür ederim.

Çalıőmam boyunca yardımlarını esirgemeyen aynı laboratuvarı paylaőtđım bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugüne kadar beni destekleyen, çalıőmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen babam Mustafa ORMAN, annem Ayőe ORMAN, abim Süleyman ORMAN ve ablam Rukiye ORMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

|  |      |
|--|------|
| <b>ÖZET</b> .....  | i    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | iii  |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....  | v    |
| <b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....  | vi   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....   | xi   |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....   | xii  |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....                                | xiii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | 1    |
| 1.1. Literatür Özetleri.....   | 2    |
| 1.1.1. Çevre Kirliliği.....  | 2    |
| 1.1.2. Su Kirliliği Kaynakları.....  | 2    |
| 1.1.3. Ağır Metaller ve Toksik Etkileri.....                               | 5    |
| 1.1.4. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dallarını.....                | 9    |
| 1.1.4.1. Lityumun Kullanım Alanları.....                                   | 10   |
| 1.1.4.2. Kalayın Kullanım Alanları.....                                    | 10   |
| 1.1.5. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....                                  | 11   |
| 1.1.5.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....                     | 11   |
| 1.1.5.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma (Biyoremediasyon) Yöntemleri.....    | 13   |
| 1.1.6. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....                   | 17   |
| 1.1.6.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Alıkonması..... | 19   |
| 1.1.6.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu.....               | 20   |
| 1.1.6.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması.....    | 21   |
| 1.1.6.4. Ekstrasellüler Alıkonma.....                                      | 23   |



|   |           |
|---|-----------|
| 1.1.6.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi..... | 24        |
| 1.1.6.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması.....                   | 25        |
| 1.1.7. Dirençliliğin Genetik Özellikleri.....   | 25        |
| 1.1.7.1. Plazmit.....   | 25        |
| 1.1.7.2. Transpozon.....  | 26        |
| 1.1.7.3. İntegron.....  | 27        |
| 1.1.8. Çalışmanın Amacı.....  | 28        |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>   | <b>29</b> |
| 2.1. Materyal.....  | 29        |
| 2.1.1. Kullanılan Besiyerler.....   | 29        |
| 2.1.1.1. Nutrient Agar.....   | 29        |
| 2.1.1.2. Nutrient Broth.....  | 29        |
| 2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler.....  | 30        |
| 2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....   | 31        |
| 2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar.....  | 31        |
| 2.1.3.2. Kullanılan Tamponlar.....  | 31        |
| 2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....  | 31        |
| 2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....   | 31        |
| 2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS).....  | 31        |
| 2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit).....                                    | 31        |
| 2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE).....  | 32        |
| 2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....                                 | 32        |
| 2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....   | 32        |
| 2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu.....   | 32        |
| 2.1.3.2.2.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması.....  | 32        |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu.....  | 33 |
| 2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....   | 33 |
| 2.1.3.2.2.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu.....   | 33 |
| 2.1.3.2.2.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu.....   | 33 |
| 2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol.....   | 33 |
| 2.1.3.2.2.9. %70'lik Alkol.....   | 33 |
| 2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....   | 34 |
| 2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....   | 34 |
| 2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....                                      | 34 |
| 2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )..... | 34 |
| 2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan<br>Solüsyonlar.....                           | 34 |
| 2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon.....  | 34 |
| 2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon.....   | 34 |
| 2.1.3.2.5. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....   | 35 |
| 2.1.3.2.6. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....  | 35 |
| 2.1.3.2.6.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....  | 36 |
| 2.1.3.2.6.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük).....   | 36 |
| 2.1.3.2.7. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonun Hazırlanması.....                                      | 36 |
| 2.2. Yöntem.....  | 37 |
| 2.2.1. Çalışma Alanı.....   | 37 |
| 2.2.2. Örneklerin Toplanması.....   | 38 |
| 2.2.3. Lityum ve Kalaya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....   | 39 |
| 2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....  | 39 |
| 2.2.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....                                    | 39 |
| 2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....  | 40 |
| 2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği.....                         | 40 |
| 2.2.8. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi.....   | 40 |
| 2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....  | 41 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu.....  | 42        |
| 2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....   | 42        |
| 2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması.....   | 43        |
| 2.2.13. Plazmit DNA'nın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....   | 43        |
| 2.2.14. Plazmit Eliminasyonu.....   | 43        |
| 2.2.15. Total Protein İzolasyonu.....   | 44        |
| 2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu.....   | 44        |
| 2.2.17. Dış Membran ve Total Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının<br>Belirlenmesi.....                               | 45        |
| 2.2.18. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....   | 45        |
| 2.2.18.1. Ayrırma Jelinin Hazırlanması.....   | 46        |
| 2.2.18.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanması.....   | 46        |
| 2.2.18.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....   | 46        |
| 2.2.18.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması.....  | 47        |
| 2.2.18.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....  | 47        |
| <b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>  | <b>48</b> |
| 3.1. Lityum ve Kalaya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin<br>Belirlenmesi.....                       | 48        |
| 3.2. Bakterilerin Tanımlanması.....   | 48        |
| 3.3. Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profili.....   | 50        |
| 3.3.1. Lityum Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> Suşunun Çoklu Metal ve<br>Antibiyotik Dirençlilik Profilleri..... | 50        |
| 3.3.2. Kalay Dirençli <i>Pantoea agglomerans</i> Suşunun Çoklu Metal ve<br>Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....    | 52        |
| 3.4. Bakterilerin Üreme Eğrisi.....   | 54        |
| 3.4.1. Lityum Dirençli Bakterinin Büyüme Eğrisi.....  | 54        |
| 3.4.2. Kalay Dirençli Bakterinin Büyüme Eğrisi.....   | 55        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu.....                     | 56        |
| 3.5.1. Lityum Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve<br>Kromozomal DNA Lokasyonu ..... | 56        |
| 3.5.2. Kalay Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve<br>Kromozomal DNA Lokasyonu.....   | 57        |
| 3.6. Bakterilerin Dış Membran Protein ve Total Protein Analizi.....                        | 58        |
| 3.6.1. Lityum Dirençli Suşun Total Protein Analizi.....                                    | 58        |
| 3.6.2. Kalay Dirençli Suşun Total ve Dış Membran<br>Protein Analizi.....                   | 60        |
| <b>4. TARTIŞMA-SONUÇ.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>  | <b>73</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>ŞEKİL</u>   | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1. Metalin su ortamında izlediği yol.....  | 4            |
| 1.2. Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi.....                 | 8            |
| 1.3. Biyosorpsiyon mekanizmaları.....  | 15           |
| 1.4. <i>E. coli</i> 'de arseniğin hücre dışına aktif taşınımı.....                         | 21           |
| 1.5. Bakterilerde çinko dirençlilik mekanizması.....                                       | 22           |
| 1.6. <i>Synechococcus</i> 'ta <i>Smta</i> ve <i>Smtb</i> genleri ve çinkoya bağlaması..... | 23           |
| 1.7. Transpozon mutagenezi.....  | 26           |
| 1.8. İntegron yapısı.....  | 28           |
| 2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu.....  | 37           |
| 3.1. <i>S. aureus</i> suşunun üreme eğrisi profili.....                                    | 54           |
| 3.2. <i>P. agglomerans</i> suşunun üreme eğrisi profili.....                               | 55           |
| 3.3. <i>S. aureus</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....         | 56           |
| 3.4. <i>P. agglomerans</i> suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu.....    | 57           |
| 3.5. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....                          | 58           |
| 3.6. Lityum dirençli <i>S. aureus</i> suşunun total protein profili.....                   | 59           |
| 3.7. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....                        | 59           |
| 3.8. Kalay dirençli <i>P. agglomerans</i> suşunun total protein profili.....               | 60           |
| 3.9. Total proteinlerin moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....                   | 61           |
| 3.10. Kalay dirençli <i>P. agglomerans</i> suşunun OMP profili.....                        | 61           |
| 3.11. OMP moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....                                 | 62           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>ÇİZELGE</u>   | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1. Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları.....                       | 5            |
| 1.2. Metallerin toksisitelerine göre sınıflandırılması.....                            | 7            |
| 1.3. Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstri dalları.....                           | 9            |
| 1.4. Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler.....                                  | 11           |
| 1.5. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler.....   | 14           |
| 1.6. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri.....        | 17           |
| 1.7. Antibiyotik direnç mekanizması.....   | 18           |
| 2.1. Antibiyogram diskler ve konsantrasyonları.....                                    | 30           |
| 2.2. SDS- PAGE stok solüsyonları hazırlanışı.....                                      | 35           |
| 2.3. SDS- PAGE çalışma solüsyonları.....   | 35           |
| 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması.....   | 36           |
| 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....   | 36           |
| 2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....                                | 38           |
| 3.1. Lityum ve kalay dirençli suşların bölgelere göre yayılımı.....                    | 48           |
| 3.2. Lityum ve kalay dirençli suşların biyokimyasal özellikleri.....                   | 49           |
| 3.3. Lityum dirençli <i>S. aureus</i> Suşunun çoklu metal dirençlilik profili.....     | 50           |
| 3.4. Lityum dirençli <i>S. aureus</i> Suşunun antibiyotik dirençlilik profili.....     | 51           |
| 3.5. Kalay dirençli <i>P. agglomerans</i> Suşunun çoklu metal dirençlilik profili..... | 52           |
| 3.6. Kalay dirençli <i>P. agglomerans</i> suşunun antibiyotik dirençlilik profili..... | 53           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

|                   |               |
|-------------------|---------------|
| Pb                | Kurşun        |
| Ag                | Gümüş         |
| Al                | Alüminyum     |
| Cd                | Kadmiyum      |
| Cu                | Bakır         |
| Co                | Kobalt        |
| Cr                | Krom          |
| Fe                | Demir         |
| Hg                | Civa          |
| Li                | Lityum        |
| Mn                | Mangan        |
| Ni                | Nikel         |
| Sb                | Antimon       |
| Sn                | Kalay         |
| Sr                | Stronsiyum    |
| Zn                | Çinko         |
| As                | Arsenik       |
| LiCl              | Lityum Klorür |
| SnCl <sub>2</sub> | Kalay Klorür  |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|          |   |
|----------|---|
| SDS-PAGE | Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi |
| NA       | NutrientAgar  |
| NB       | NutrientBroth   |
| MİK      | Minimal İnhibitör Konsantrasyonu                      |



## 1. GİRİŞ

İnsan var oluşundan itibaren çevreyi kendi istekleri doğrultusunda kullanmakta ve değiştirmektedir. Nüfusun hızla artışı ve sanayinin hızlı gelişimi çevre sorunlarını gündeme getirmiş, nehirlere, göllere, denizlere arıtılmadan akıtılan bol miktardaki evsel ve sanayi atıkları çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmuştur [1]. Kaynağından kullanım aşamasına kadar en kolay kirlenen madde sudur [2]. Diğer taraftan su ve karasal ekosistemler bilinçsiz ve aşırı kullanılarak önemli ölçüde zarar görmüştür. Tüm bunların sonucu olarak dünya aşırı ve hızlı bir şekilde kirlenmiş olup, çevre sorunları acil çözüm bekleyen problemler haline gelmiştir. 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 [1]. Ağır metaller çevre için son derece tehlikeli olan kimyasallar olarak bilinirler [3]. Bunlar her gün büyük miktarlarda doğal ve endüstriyel kaynaklardan, evsel atıklardan, zirai kaynaklardan ve atmosferik kirleticilerden çevreye yayılmakta ve değişik yollarla nehir, göl ve denizlere ulaşmaktadırlar [4]. Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır [5, 6]. Bu nedenlerden dolayı endüstriyel atık sulardan öncelikle ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atık sulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir [7]. Bu uzaklaştırmada çeşitli bakteriler, funguslar ve algler kullanılmaktadır. Ağır metal gideriminde kullanılacak olan mikroorganizmanın iyi bir biyosorbent olmasının yanı sıra ekonomik olarak üretilmesi de önemlidir [8, 9].

## **1.1. Literatür Özetleri**

### **1.1.1. Çevre Kirliliği**

Çevre; insan veya başka bir canlının yaşamı boyunca ilişkilerini sürdürdüğü dış ortamdır. Hava, su ve toprak bu çevrenin fiziksel unsurlarını, insan, hayvan, bitki ve diğer mikroorganizmalar ise biyolojik unsurlarını teşkil etmektedir. Doğanın temel fiziksel unsurları olan, hava, su ve toprak üzerinde olumsuz etkilerin oluşması ile ortaya çıkan ve canlı öğelerin hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkileyen çevre sorunlarına "Çevre Kirliliği" adı verilmektedir [10].

Çevre unsurlarına göre çevre kirliliği 4 gruba ayrılır.

- a) Hava kirliliği
- b) Toprak kirliliği
- c) Su kirliliği
- d) Ses kirliliği

Bu dört unsurda çevre kirliliğini oluşturan ana sebeplerdir ve her biri ayrı bir konu başlığı altında incelenebilir. Fakat bu çalışma doğrultusunda su kirliliğine neden olan etmenlerden ağır metallerin mikroorganizmalar üzerine etkileri hakkında detaylı bir araştırma yapılmıştır.

### **1.1.1. Su Kirliliği Kaynakları**

Su kirliliğinin nedenlerini aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür:

- a) Tarımsal faaliyetlerin neden olduğu kirlilik: Her türlü tarımsal faaliyet sonucu ortaya çıkan katı ve sıvı atıkların neden olduğu kirliliktir. Bunun yanı sıra erozyon, tarım toprağının en verimli ve tarıma uygun olan üst kısmının sürüklenerek bazı su kaynaklarına yığılmasına neden olur. Göllerin, limanların, baraj göllerinin, göletlerin tabanları taşınan toprakla örtülür ve su kütlelerinin kullanma ömürleri kısalmır.
- b) Bitki besin maddelerinin oluşturduğu kirlilik: Tarla tarımında verimin artması, bitki besin maddelerinin kullanımına bağlıdır. Azot ve fosfordan oluşan yapay gübreler toprağa karışıp su kaynaklarını kirletirler. Azot ve fosfor belli miktarlar

içinde tüm canlılar için yararlı olan kimyasallardır. Ancak, yüksek miktardaki azot, zehirlenmeye neden olmakta ve toplu balık ölümlerine yol açmaktadır [11].

c) Hayvan atıklarının oluşturduğu kirlilik: Hayvancılık yapılan yerlerde hayvan barınaklarının yağışlarla yıkanmasıyla oralandaki hayvan artıkları yüzey sularına karışırlar. Ayrıca tarlalara serilen gübrenin de yağışlarla yüzey sularına karışması, su kaynaklarının kirlenmesinde önemli bir etkidir [11].

d) Tarımsal mücadele ilaçlarından kaynaklanan kirlilik: Tarla ve bahçe tarımında yetiştirilen ürünlerin niteliğinin ve niceliğinin artması, bu bitkilere zarar veren yaban otları, asalaklar ve böceklerin yok edilmesi için kullanılan ilaçlar yağışlarla su kaynaklarına karışırlar. Tarımsal mücadelede kullanılan kimyasal ilaçlar kalıcı özelliğe sahiptirler.

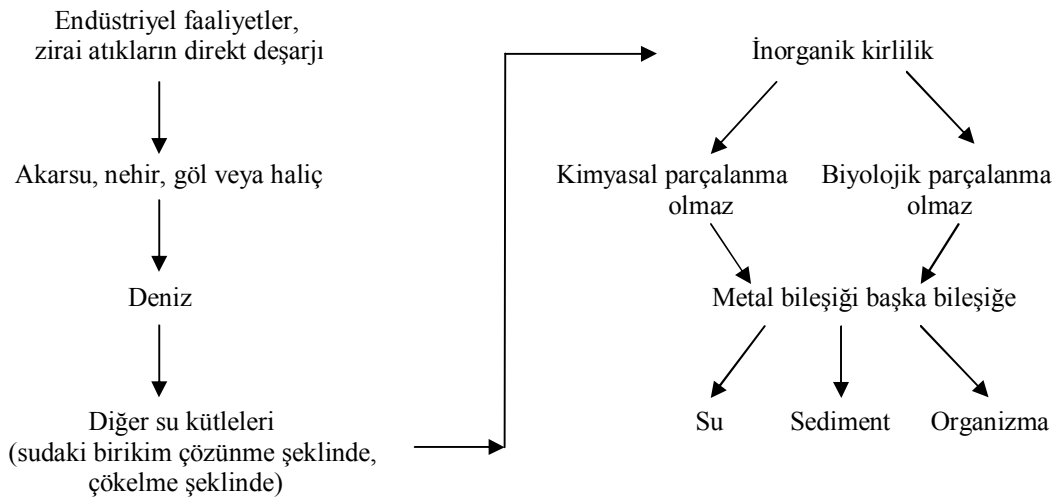
e) Sanayi faaliyetlerinin neden olduğu kirlilik: Sanayinin çevre sorunlarının ortaya çıkışındaki ağırlıklı etkisi, su kirliliğinde de kendini göstermektedir. Çeşitli sanayi faaliyetleri sonucunda oluşan atık ve toksik ağır metaller doğrudan su kirliliğine yol açarlar. Özellikle petrol rafineri atıkları, kağıt, metal kaplama, deterjan, gıda, plastik, ilaç ve deri sanayi atıkları ve atık suları ağır metal bakımından başta gelen kirleticilerdir [11].

Su kirliliğinin en önemli nedenleri; endüstriyel faaliyetler sonrasında açığa çıkan atık suların herhangi bir işlemde geçirilmeden alıcı ortamlara verilmesidir. Bu atık suların içerdikleri çeşitli ağır metaller, tuzlar, pestisitler ve deterjanlar, sularda kimyasal ve fiziksel değişikliklere neden olur. Endüstrilerin çıkardığı atıklar, çevredeki tarım arazilerini etkilemekte, ormanları tahrip etmektedir, mevcut yeraltı ve yerüstü su kaynakları kirlendiğinden, bu kaynakların içme ve sulama amacıyla kullanım olanakları azalmaktadır [11]. Adedeji ve arkadaşlarının [12], yapmış oldukları çalışmada alaro nehrindeki kirleticileri belirlemek için çalışılmıştır. Sonuç olarak endüstriyel ve ev atıklardan kaynaklı ağır metallerin nehirde birikiminin artmış olduğu tespit edilmiştir.

Sularda ağır metal birikimi, çözünme şeklinde olabileceği gibi, çözünmeden suların dibinde çökme şeklinde de olabilir. Bu şekilde bir kirlenme endüstriyel ve zirai

atıklardan meydana geldiği gibi herhangi bir yolla atmosfere verilen metal türü maddelerden de meydana gelebilir. Atmosfere verilen metal türü maddeler sonunda yeryüzüne dönerler ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenirler [13].

Metal kirlenmesi, organik kirlenmeler gibi kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanmazlar, bir metal bileşiği başka bir metal bileşiğine dönüşür. Dönüşme ne olursa olsun metal iyonu kaybolmaz (Şekil 1.1) [14].



**Şekil 1.1.** Metalin su ortamında izlediği yol [14]

Su ortamları tek başına su kütlelerinden ibaret olmayıp, bünyesinde bir çok hayvan ve bitki kökenli yüzen veya dipteki sediment tabakasında yaşayan organizma grupları ihtiva etmektedir. Kirleticiler sadece suda çözünmekle kalmayıp, ortam şartlarına göre organizmaya geçmekte, besin zincirinde birikmekte veya dibe çökmektedirler. Dolayısıyla bir kirletici sadece suda değil, aynı zamanda o su ortamında bulunan tüm canlıların yapısına geçmektedir. Su ortamlarında ağır metal üç şekilde ölçülebilir; suda, sedimentte ve canlıda. Suda, sedimentte ve organizmalarındaki kirlilik seviyelerinin belirlenmesiyle ve izlenmesiyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu üç bileşen ya kirletici seviyelerini izlemek ya da kirleticilerin çevresel davranışlarını tanımlamak için kullanılmıştır [14].

### 1.1.3. Ağır Metaller ve Toksik Etkileri

Fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metallere ağır metal denir [10]. Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Çizelge 1.1'de yer kabuğunda en bol bulunan 12 element ile daha az bulunan bazı elementler gösterilmiştir (bu elementlerin arasında metal olmayanlar da vardır). En bol bulunan bu 12 elementin toplam kütlesi, yer kabuğu kütlelerinin %99,4'ü kadardır [15].

**Çizelge 1.1.** Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları [15]

| Element                       | Konsantrasyon (ppm) |
|-------------------------------|---------------------|
| <b>Bol oranda bulunanlar</b>  |                     |
| *Oksijen                      | 466000              |
| *Silisyum                     | 277200              |
| Alüminyum                     | 81300               |
| Demir                         | 50000               |
| Kalsiyum                      | 36300               |
| Sodyum                        | 28300               |
| Potasyum                      | 25900               |
| Magnezyum                     | 20900               |
| Titanyum                      | 4400                |
| *Hidrojen                     | 1400                |
| *Fosfor                       | 1180                |
| Mangan                        | 1000                |
| <b>Eser oranda bulunanlar</b> |                     |
| Baryum                        | 425                 |
| Vanadyum                      | 135                 |
| Nikel                         | 75                  |
| Çinko                         | 70                  |
| Bakır                         | 55                  |
| Kurşun                        | 12,5                |
| Berilyum                      | 2,8                 |
| Uranyum                       | 2,7                 |
| Kalay                         | 2                   |
| Kadmiyum                      | 0,2                 |
| Civa                          | 0,08                |
| Gümüş                         | 0,07                |
| Altın                         | 0,004               |

\* Metal olmayanlar

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonlarına redoks tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır [16]. Örneğin  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{4+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mo^{4+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi metaller esansiyeldir ve yüksek konsantrasyonda toksiktirler. Enzimlerin kofaktör olarak ihtiyaç duydukları bazı metal iyonları şunlardır:  $Zn^{2+} \rightarrow$  alkol dehidrogenaz, karbonik anhidraz, karboksipeptidaz;  $Co^{2+} \rightarrow$  kobalamin (vitamin B<sub>12</sub>);  $Mn^{2+} \rightarrow$  arjinaz, fosfotransferaz;  $Fe^{2+} \rightarrow$  sitokromlar, peroksidaz, katalaz, ferrodoksin;  $Cu^{2+} \rightarrow$  tirozinaz, sitokrom oksidaz;  $Mo^{4+} \rightarrow$  azot fiksasyonu, nitrat redüksiyonu. Ayrıca bu ağır metaller besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bunlar, mikrobese olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat  $Ag^+$ ,  $Al^+$ ,  $Au^{2+}$ ,  $Cd^+$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi ağır metallerin biyolojik önemleri ve besinsel değerleri yoktur. Canlılar için esansiyel olmayıp eser miktarları bile toksik etki gösterebilir. Bu toksik metaller önemli hücrese bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücrese fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir [16-18].

Bir çok metal “ABD çevre koruma ajansı” tarafından öncelikli kirleticiler olarak sınıflandırıldı. “ABD toksik madde ve hastalıklar kayıtları ajansı” kurşun, civa, arsenik ve kadmiyumu sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü ve altıncı olarak derecelendirdi. Bu derecelendirme zehirli atık sitelerindeki yaygınlığına ve toksisite şiddetine göre yapıldı. Ağır metal kirliliği, yerel, bölgesel ve global ölçekte ciddi bir kaygı konusudur [19].

Organizmalar üzerindeki etkilerine bağılı olarak metaller, kritik olmayan, toksik ve çok toksik olarak Çizelge 1.2’de sınıflandırılmıştır [20].

**Çizelge 1.2.** Metallerin toksisitetlerine göre sınıflandırılması [20]

| <b>Kritik Olmayan</b>   | <b>Toksik</b>  | <b>Çok Toksik</b>   |
|---|--|---|
| Na, C, K, P, Li<br>Mg, Fe, Rb, Ca, S,<br>Sr, H, Cl, Al, O, Br, Si | Ti, Ga, Hf, La, Zr,<br>Os, Rh, Nb, W<br>Ta, Ru, Re, Ba | Be, As, Co, Se,<br>Hg, Ni, Te, Tl, Cu,<br>Pd, Pb, Zn, Ag, Sb,<br>Sn, Cd, Bi |

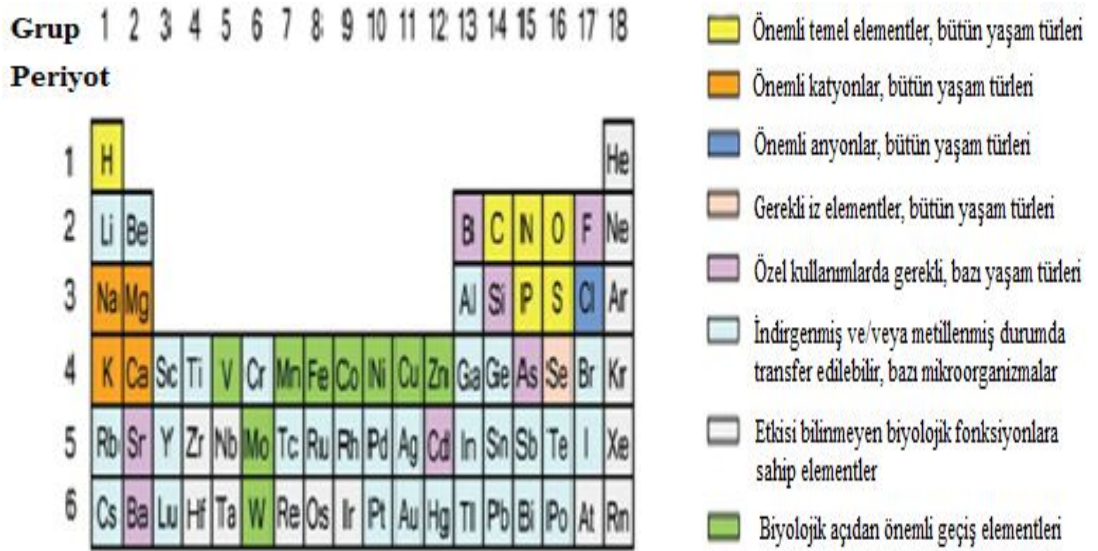
Na, sodyum; C, karbon; K, potasyum; P, fosfor; Li, lityum; Mg, magnezyum; Fe, demir; Rb, rubidyum; Ca, kalsiyum; S, kükürt; Sr, stronsiyum; H, hidrojen; Cl, klor; Al, alüminyum; O, oksijen; Br, brom; Si, silisyum; Ti, titanyum; Ga, galyum; Hf, hafniyum; La, lantan; Zr, zirkonyum; Os, osmiyum; Rh, rodyum; Nb, niobyum; W, volfram; Ta, Tantal; Ru, rutenyum; Re, renyum; Ba, baryum; Be, berilyum; As, arsenik; Co, kobalt; Se, selenyum; Hg, civa; Ni, nikel; Te, tellür; Tl, talyum; Cu, bakır; Pd, paladyum; Pb, kurşun; Zn, çinko; Ag, gümüş; Sb, antimon; Sn, kalay; Cd, kadmiyum; Bi, bizmut

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 [21]. Örneğin; yeterli konsantrasyonda  $Hg^{+2}$  ve  $CH_3Hg^+$  sadece yüksek organizmalar için değil mikroorganizmalar içinde toksik olabilmektedir. Bununla birlikte, birkaç bakteri biyolojik olarak civanın toksik formlarını toksik olmayan formlarına dönüşümünü sağlayabilir. Civaya dirençli gram negatif bakterilerde civa redüktaz denen NADPH bağılı bir enzim  $Hg^{+2}$ ’yi  $Hg^0$ ’a indirger. Bu reaksiyonda üretilen  $Hg^0$  uçucudur ama insanlara ve hayvanlara toksik değildir [22].

Ağır metal kirliliğinin artması çevre ve canlılar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [23]. Metallerin bazıları arsenik, bakır, demir ve nikel gibi düşük konsantrasyonlarda vücut için yararlıdır fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilidir. Alüminyum, berilyum, kadmiyum, kurşun ve civa gibi diğer metallerin hiçbir biyolojik

fonksiyonları yoktur ve büyük ölçüde bedensel fonksiyonlarını bozan son derece zehirli metallerdir. Örneğin; arsenik metali oyuncak ve duvar kağıtlarında renklendirici madde olarak, böcek ve fare zehiri olarak ayrıca ahşapları termitlerden korumak için kullanılır. Arseniğin toksisitesi, küçük kan damarlarının geçirgenliğini artırır bağırsak mukozasında nekroza neden olur ve mitokondriyal enzim sistemi ile karışır. Arsenik zehirlenme etkisine, deri kanserlerine, karın ağrısına, iştahsızlık ve kusmaya sebep olur [24].

Periyodik tabloda (Şekil 1.2) bulunan elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal olarak rol oynarlar. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, işte o zaman katalitik olarak rol oynarlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin sentezinde pek çok element gereklidir. Bu ise elementlerin yapısal fonksiyonudur ve element, son ürünün vazgeçilmez bileşenidir [25].



Şekil 1.2. Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi [26]



#### 1.1.4. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları

Atık sularında bulunabilecek ağır metaller, organik bileşikler gibi biyolojik olarak bozundurulamazlar. Bazı ağır metallerin yaygın kullanımları onların atık su içerisinde istenmeyen derişimlerde olmasına yol açar. Çeşitli endüstrilerin atık sularında bünyesinde yüksek miktarda bulunan bu ağır metaller “öncelikli kirleticiler” listelerinde yer almaktadır. Özellikle kaplama, madencilik ve metal alaşımı endüstrileri atık ve atık sularında ağır metal konsantrasyonları yüksektir [27]. Çeşitli endüstrilerde kullanılan ve atık sularında rastlanılan metaller Çizelge 1.3’de verilmiştir [28].

**Çizelge 1.3.** Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstri dalları [28, 29]

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

#### **1.1.4.1. Lityumun Kullanım Alanları**

Lityum; cevher ve konsantre cevher, metalik lityum ve lityum bileşikleri olmak üzere üç grupta kullanılmaktadır. Lityum cevheri ve konsantresi en çok; cam, seramik ve porselen emayesi alanında kullanılır. Metalik lityum en çok butil lityum (eczacılık, yapay kauçuk ve roket yakıtı endüstrilerinin önemli bileşenlerinden) üretiminde kullanılır. Bundan başka; demir dışı metallerin metalurjisinde, oksijen ve kükürdü tutmada, alüminyum ve magnezyum alaşımlarında, kurşunla beraber kablo kaplamasında ve deoksidan olarak bakırda kullanılır. Lityum bileşiklerinden lityum karbonat, alüminyum üretiminde geniş bir kullanım alanı bulur. Bunun yanı sıra; seramik endüstrisi, diğer lityum bileşiklerinin üretimi ve tıpta manik depresyon tedavisi (bir ruh hastalıkları gurubu) karbonat olarak kullanıldığı diğer alanlardır. Lityum hidrür hidrojen gazı üretiminde, Lityum hidroksit motor yağı ve gres üretiminde, lityum klorür ve bromür soğutma sistemlerinde kullanım alanı bulur. Lityum en çok lityum karbonat olarak kullanılır. Onun da en çok kullanıldığı alan alüminyum endüstrisidir [30].

#### **1.1.4.2. Kalayın Kullanım Alanları**

Tarımda, böcek ve mantar ilaçlarında, deniz araçlarında, pas önleyici boyalarda ve kalay kaplamada kullanılır. Kalay bileşiklerinde en zehirli olanıdır. Bitki ölümlerine ve hayvanlarda merkezi sinir sistemlerinin bozulmasına neden olur [31]. Kalay, teneke yapımında, kaplamacılıkta, çeşitli alaşımlar, lehim ve kimyasal madde yapımında kullanılır. Otomotiv endüstrisinde de motor yataklarında, kaporta, radyatör, yağ ve hava filtrelerinde kullanılır. Uçak ve gemi endüstrisi ile elektronik ve elektrik sanayinde geniş bir kullanım alanı vardır. Kimya sanayinde boya, parfüm, sabun, poliüretan üretiminden diş macunu yapımına kadar geniş bir alanda tüketilir. Bunların yanında, matbaacılıkta, mutfak malzemeleri ve cam endüstrisinde de kullanılmaktadır [32].

## 1.1.5. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

### 1.1.5.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

Ağır metal içeren atık suların arıtımı, genelde işletmenin kapasitesine, atık su debisi ve karakteristiklerine, prosese, arıtma tesisine, kullanılan kimyasallara bağlı olmakla birlikte, temeli; kimyasal olarak metal iyonunun çökebilen bir bileşiği şekline dönüştürülmesi ilkesine dayanır [33]. Kirlenmiş toprak ve suların çeşitli remediasyon metotları daha önce Çizelge 1.4’de gösterilmiştir [36, 37]

**Çizelge 1.4.** Su biyoremediasyonunda kullanılan yöntemler [36-38]

| Yöntem          | Avantaj  | Dezavantaj   | Uygulamalar  |
|-----------------|--|--|--|
| Çökeltme        | Basit,<br>Ekonomik   | Yüksek derişim için zor ayrılma,<br>Etkin değil,<br>Atık çamur oluşması  | Ağır metallerin uzaklaştırılması   |
| İyon değişimi   | Kısa süreli<br>Verimli,<br>Saf atık metalin geri dönüşümünün mümkün olması | Oksidasyon ve pH değişiminin yeraltı sularını etkileyebilmesi,<br>Parçacıklara duyarlı olması,<br>Reçinelerin pahalı olması,<br>Küçük ölçekli uygulama | Çözünmüş metallerin giderimi ve sulu çözeltilerdeki radyoaktifler  |
| Ters ozmos      | Saf atık (Geri dönüşüm için)   | Pahalı,<br>Yüksek basınç,<br>Membran boyutu önemli   | Suyun içindeki istenmeyen tüm mineralleri sudan ayıran ve saf su ve içme suyu teminine yönelik olarak kullanılan |
| Mikrofiltrasyon | Çözünmüş maddelerin hızla uzaklaştırılması                                 | Ticari olarak bu maddelerden yararlanılamaz  | Ağır metallerin uzaklaştırılması   |
| Elektrodiyaliz  | Yüksek sıcaklığa dayanıklıdır ve yeniden kullanılabilir                    | Yüksek metal konsantrasyonları için geçerli,<br>Spesifik koşullara duyarlı   | Çözünmüş maddelerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması  |

Geleneksel yöntemlerin çok pahalı olmaları, tamamen uzaklaştırma yapmamaları, seçiciliklerinin düşük olması, uygulamada fazla enerji harcamaları, pahalı ekipmana gereksinim duymaları, ağır metal kirliliğinin yüksek derişimlerde olması durumunda etkin olmaları ve zehir etkisi oluşturmaları gibi dezavantajları vardır [34]. Bu yöntemler, özellikle sulu çözeltilerdeki metal iyonu derişimi 1 – 100 mgL<sup>-1</sup> gibi düşük derişimlerde olduğunda etkisizdir ve aynı zamanda işlenmesi gereken çok büyük miktarlarda çamur üretirler. Emisyon standartlarının zamanla daraltılması geleneksel yöntemleri yetersiz kılmıştır [35].

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

a) İndirgeme – çökeltme yöntemi: Bu yöntemle yüksek değerlikli metal, çökebilene bir şekline indirgendikten sonra, nötrale edilir, reaktifin aşırısı metali çökeltir. Çöktürmede karıştırma, yumaklaşma (flokülasyon), koyulaştırma ve süzme işlemleri yapılır. Bu yöntem özellikle kromlu atıkların arıtımında kullanılır [33].

b) 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 demir ve mangan içeren atıkların arıtımında kullanılır [33].

c) Nötralizasyon – çöktürme yöntemi: Cr<sup>4+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> gibi ağır metal iyonları ortama kireç, soda veya sodyum hidroksit katılarak nötrale edilir, hidroksitleri şeklinde çöktürülerek atık sudan uzaklaştırılır [33].

d) İyon değişimi: Bu yöntem ağır metal iyonlarının, elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzeyinde tutularak, ortamdaki farklı türdeki iyonlarla değiştirilmesi ilkesine dayanır. Bu amaçla iyon değiştirici reçineler kullanılır [33].

### 1.1.5.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma (Biyoremediasyon) Yöntemleri

Biyoremediasyon; canlı organizmalar kullanarak toksik formdaki kirleticileri daha az toksik veya toksik olmayan bileşiklere dönüştürme yöntemidir [40]. Biyolojik yöntemler günümüzde en çok başvurulan metal giderim yöntemleridir [41].

Bu yöntemin avantajları; maliyetin düşük olması, işlem süresinin kısa olması, temiz ve kolay işletilebilir olmasıdır. Dezavantajı ise, metal gideriminin düşük olması, filtrelerin veya enjeksiyon kanallarının mikroorganizmalarca tıkanabilmesi, düşük geçirgenli akiferlere (yer altı suyunu tutan ve ileten kayalar) uygulanmasının zor olması, uygulanan akiferlerde sadece fazla geçirgen tabakaların temizlenebilmesi, sürekli izlenme ve bakım gerektirmesi sayılabilir [31, 34].

Biyoremediasyonla metal arıtımı, özellikle mikropsal hücrelerle yapılan metal biyosorpsiyonu etkili ve alternatif bir teknoloji oluşturacak güçtedir. Metallerle biyosorpsiyon sürecinin temelinde iki hedef vardır. Birincisi altın, gümüş ve platin gibi değere sahip paslanmaz metallerin geri kazanımını; ikincisi ise canlı sistemleri ve çevresi için çok küçük derişimlerde bile son derece zehirli olan civa, bakır, demir, kurşun, krom, kadmiyum, nikel ve çinko gibi ağır metallerin kirli sulardan uzaklaştırılmasıdır [42].

Biyoremediasyon sistemi her koşulda aynı verimlilikte çalışmamaktadır. Verimliliği etkileyen faktörler Çizelge 1.5’de gösterilmiştir. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler: biyoremediasyon işlemi aerobik, heterotrof mikroorganizmaların aktivitelerine dayalıdır. Hızlı degradasyon için substrata özgü mikroplar elverişli çevresel faktörler içinde bulunmalıdırlar. Kirleticileri degrede etmek için fizyolojik ve metabolik yetenekleri olan mikroplar fungi ve bakterileri içerebilirler. Biyoremediasyona direkt etki gösteren faktörler; enerji kaynakları, elektron alıcıları, nutrientler, pH, sıcaklık ve substrat inhibisyonu veya metabolitlerdir [43, 44].

**Çizelge 1.5.** Biyoremediasyonu etkileyen faktörler [39]

| <b>Faktörler</b>                              | <b>Önemleri</b>   |
|---|---|
| Mikrobiyal                                    | Kritik biyomas üretimi, enzim indüksiyonu, duyarlı mikrobiyal popülasyonun zenginleşmesi ve toksik metabolitlerin üretimi |
| Çevresel                                      | Öncelikli substratların tükenimi ve çevresel koşulların inhibisyonu   |
| Substrat                                      | Çok düşük kontaminant konsantrasyonu, kimyasal yapı, kontaminantların çözünürlüğü ve toksisitesi                          |
| Aerobik / anaerobik işlem                     | Elektron alıcılarının oksidasyon / redüksiyon potansiyeli ve uygunluğu  |
| Kirlenmelerin fiziko-kimyasal biyoyouygunluğu | Eşit soğurma, geri dönüşümsüz soğurma, Incorporation into humic Matters   |
| Kütle transfer sınırlaması                    | Oksijen difüzyonu, nutrient difüzyonu ve çözünürlüğü, suda çözünürlük   |

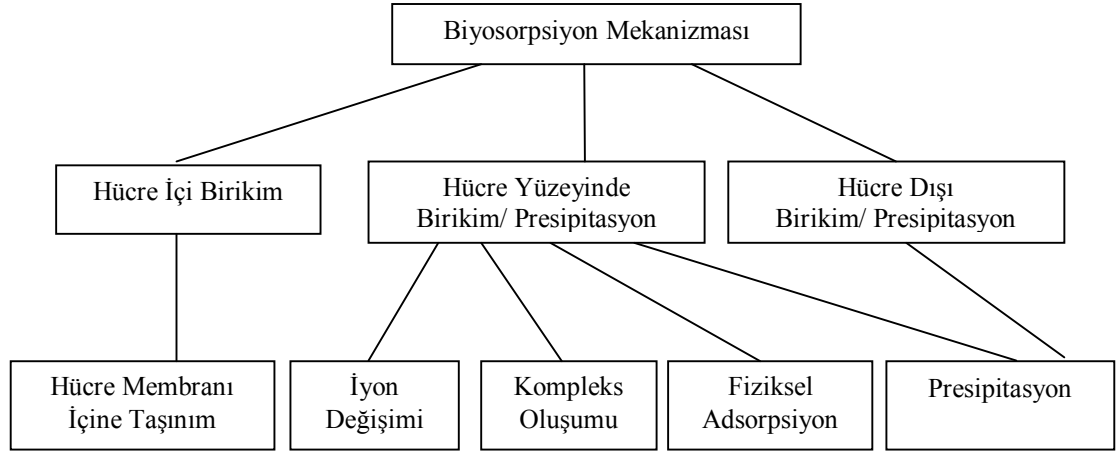
Suda yaşayan pek çok organizma çözülmüş ağır metalleri ve radyoaktif elementleri bünyelerine adsorplayabilmektedirler. Mikroorganizmaların bu özelliklerinden yararlanarak deniz suyu, endüstriyel ve atık sular ve radyoaktivite sonucu kirlenmiş sularda yer alan zararlı metal iyonlarının giderilmesi mümkün olmaktadır [31]. Bu giderilmede bakteriler, mantarlar, algler ve mayalar kullanılmaktadır. Bunlar yapılarında ve yüzeylerinde ağır metal adsorplayabilme yeteneği olan mikrobiyal türlerdir [45, 46].

Mikroorganizmaların kompleksliği, hücre tarafından tutulan metaller için pek çok yolun olduğunu gösterir. Biyosorpsiyon mekanizmaları bu yüzden farklıdır. Bu mekanizmalar aşağıdaki gibi farklı kriterlere ayrılabilir. Hücre mekanizmasına bağlı olarak biyosorpsiyon mekanizması 2'ye ayrılır;

- a. Metabolizmaya bağlı
- b. Metabolizmadan bağımsız

Çözültiden uzaklaştırılan metalin bulunduğu yere göre biyosorpsiyon Şekil 1.3’de gösterildiği gibi 3’e ayrılır [47];

1. Hücre dışı birikim/presipitasyon
2. Hücre yüzeyinde sorpsiyon/presipitasyon
3. Hücre içi birikim



**Şekil 1.3.** Biyosorpsiyon mekanizmaları [47]

Adsorbsiyon, akışkan fazda çözülmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı adsorbent yüzeyine tutunmasına (transferine) dayanan ve faz yüzeyinde görülen bir ayırma yöntemidir. Katı matriks yüzeyinde bulunan iyonlar, çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözültideki maddeleri katı yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Katı yüzeyinde tutunma işleminin gerçekleşebilmesi için, çözülmüş maddenin çözültiden uzaklaştırılması, çözücünün katı yüzeyden uzaklaştırılması ve çözülmüş maddenin yüzeye tutunması gerekmektedir. Yüzeye tutunan madde adsorblanan, yüzeyinde tutunmanın gerçekleştiği madde ise adsorbent olarak adlandırılır [48].

Acosta ve arkadaşları [49] yaptıkları çalışmada, ağır metallerin, gram pozitif, patojenik veya zehirli olmayan bir bakteri olan *Paenibacillus polymyxa P13* tarafından biyosorpsiyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmada, bakır model element olarak seçilmiştir, çünkü bakır çok farklı endüstrilerden kaynaklanan bir kirleticidir.

Biyosorbent olarak kullanılan bakterinin EPS (ekzopolisakkarit) üreten bir fenotipi, belirgin bir  $\text{Cu}^{2+}$  biyosorpsiyon kapasitesi sergilemiştir. Optimum koşullarda (pH 6,0 ve 25 °C) gerçekleştirilen deneylerde, sulu çözeltilerdeki  $\text{Cu}^{2+}$  biyosorpsiyonu için adsorpsiyon izotermi Langmuir modeline uymuştur. Bu deneylerde, sağlam hücrelerle yüksek biyosorpsiyon kapasitesi ( $112 \text{ mgg}^{-1}$ ) elde edilmiştir. Yüksek tuz derişimi (1 M NaCl) ile oluşturulan hiperozmotik koşullarda EPS üretimi artmış ve bu da sağlam hücrelerin biyosorpsiyon kapasitesinde bir artışa ( $150 \text{ mgg}^{-1}$ ) sebep olmuştur. Ayrıca, temizlenmiş EPS ile  $\text{Cu}^{2+}$  biyosorpsiyon kapasitesi de incelenmiştir. En yüksek biyosorpsiyon kapasitesi,  $0,1 \text{ mg EPS.mL}^{-1}$  ile  $1602 \text{ mgg}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mg EPS.mL}^{-1}$  ile  $583 \text{ mgg}^{-1}$  olarak elde edilmiştir. Son olarak, bakırın EPS üzerine biyosorpsiyonuna, çözeltide bulunan farklı metal iyonlarının etkisi de incelenmiştir. Yapılan deneyler sonunda, Na, K, Ca, Mg ve Zn iyonlarının varlığının  $\text{Cu}^{2+}$  giderimini azalttığı belirlenmiştir. Özellikle  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonlarının varlığı  $\text{Cu}^{2+}$  gideriminde belirgin bir azalmaya neden olmuştur [49].

Biyolojik arıtma yöntemleri aerobik ve anaerobik olmak üzere ikiye ayrılır. Arıtmanın oksijenli ortamda gerçekleştiği prosesler aerobik proseslerdir. Burada aktif çamur sistemleri, damlatmalı filtreler ve aerobik stabilizasyon havuzları gibi yöntemlerle arıtma sağlanır. Anaerobik prosesler ise havasız ortamda gerçekleştirilen arıtma prosesleridir [50]. Uygulamaları; sürekli karışimli reaktörler, anaerobik filtreler ve akışkan yataklı sistemlerdir. Sürekli karışimli tank reaktörü, atık suların anaerobik arıtılmasında kullanılan ve katı resirkülasyonu olmayan sürekli karıştırılan tank tipidir. Anaerobik filtre, hareketsiz hücre reaktörlerinin bir uyarlaması olarak geliştirilmiştir. Anaerobik filtre tipinde kullanılan dolgu malzemesi biyofilm gelişmesi için gerekli olan temas yüzeyini sağlar. Akışkan yataklı sistemlerde ise yukarı akışlı reaktör, kısmen bir taşıyıcı malzeme (genellikle kum) ile doldurulur. Söz konusu reaktörde kum tanecikleri üzerinde biyofilm oluşturularak arıtmanın gerçekleştirilmesi amaçlanır [50].



### 1.1.6. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönmesi olarak tanımlanır [51].

Önemli sayıdaki raporlar, doğal çevredeki metal kontaminasyonunun, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasını ve korunmasını desteklediğini göstermektedir. Çizelge 1.6'da antibiyotik dirençliliği genel, yapısal ve fonksiyonel karakter olarak metal dirençliliği ile ortak özelliklere sahip olduğu gösterilmektedir [52].

**Çizelge 1.6.** Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri [52]

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

As; arsenik, Cu; bakır, Mn; mangan, Zn; çinko, Co; kobalt, Ag, gümüş, Hg; civa, Ni; nikel, Cd; kadmium, Chlor, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; CouA, coumermycin A; Rif, rifampicin; Tet, tetracycline; Trim, trimethoprim

Genelde tek veya birçok antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarına karşı direnç oluşumu; plazmid yapılar aracılığı ile meydana gelmektedir. Antibiyotiklere karşı gelişen dirençlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir [54]. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnci genetik

olarak ya kromozomal ya da direnç plazmitlerinde kodlanır. Özgül dirençler, bir lokasyonda ya da diğerinde tipik tarzda genetik temellere sahiptir (Çizelge 1.7) [22].

**Çizelge 1.7.** Antibiyotik direnç mekanizması [22]

| Direnç Mekanizması   | Antibiyotik Örnek   | Direncin Genetik Temeli              | Mekanizmanın Mevcut Olduğu Organizma   |
|--|---|--------------------------------------|--|
| Geçirgenliğin azaltılması  | Penisilinler  | Kromozomal                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>Enterik Bacteria  |
| Antibiyotik inaktivasyonu(örneğin penisilinaz; metilaz, asetilaz, fosforilaz ve diğerleri modifiye eder) | Penisilinler<br>Kloromfenikol<br>Aminoglikozitler           | Plazmit ve Kromozomal<br><br>Plazmit | <i>Staphylococcus aureus</i><br>Enterik Bacteria<br><i>Neisseria gonorrhoeae</i><br><br><i>S. aureus</i> |
| Hedef bölgenin değiştirilmesi  | Eritromisin,<br>Rifamisin,<br>Streptomisin,<br>Norfloksasin | Kromozomal                           | <i>S. aureus</i><br>Enterik Bacteria   |
| Dirençli biyokimyasal yolun geliştirilmesi   | Sülfonamidler   | Kromozomal                           | <i>S. aureus</i><br>Enterik Bacteria   |
| Hücrenin dışına pompalama  | Tetrasiklinler,<br>Kloromfenikol,<br>Eritromisin            | Plazmit<br>Kromozomal                | <i>S. aureus</i><br>Enterik Bacteria,<br><i>Staphylococcus</i> sp.                                       |

Mikroorganizmalar, toksik metal varlığında adaptasyon için çeşitli mekanizmalar kazanmışlardır [55]. Bu adaptasyon mekanizmaları;

1. Geçirgenlik bariyeri ile metallerin hücre dışında alıkonması
2. Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu
3. Metallerin proteinlere bağlanarak hücre içinde alıkonma
4. Ekstrasellüler alıkonma
5. Metallerin enzimatik detoksifikasyonla metallerin daha az zararlı fonksiyonlara dönüştürülmesi
6. Hüresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerinin azaltılması

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

Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücre sel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E.coli*'deki  $Cu^{2+}$  dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretimi değiştirilerek  $Cu^{2+}$  nin hücreye girişi engellenir [1]. Bu tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir. Diğer bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır. Tamamen ispatlanamasa da  $Cu^{2+}$  dirençliliğinin bazı biçimlerinin periplazmik bağlayıcılık özelliği üzerine kurulu olduğuna inanılmaktadır. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kuşatan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak hücre içine girişini engellemektedir. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir [1].

*Staphylococcus aureus*'un bazı türlerinde, peniklinaz'ın kodlarını bulunduran plazmitler, hücre membranı değişimi aracılığı ile  $Cd^{2+}$  geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu  $Cd^{2+}$  un 0,01-0,1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [1].

### 1.1.6.2. Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

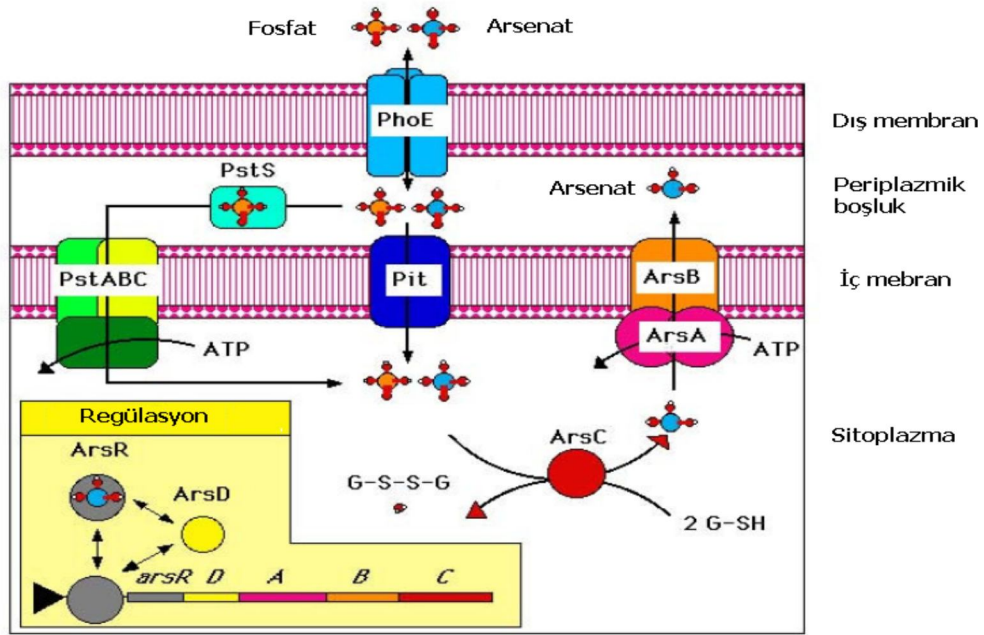
Aktif pompa sistemleri her tür hücrede (bakteri, maya, küf, insan) bulunabilmekte ve çeşitli substratlardan ve çoğunlukla amfilik olan ilaçlardan hücreleri korumaktadır. Aktif pompa sistemleri, gerek gram-negatif gerekse gram-pozitif bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Tek bir substrata özgül olabildikleri gibi yapısal olarak birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilirler. Bu durum çoğul antibiyotik direncine ve yanı sıra substrat profilinin genişliğine bağlı olarak bazı boyalara, deterjanlara, dezenfektanlara karşı dirence neden olmaktadır. Pompa sistemi proteinlerinin normalde bulunan operonun bir parçası olabileceği ve düzenleyici bir genin kontrolü altında ortaya çıktığı düşünülmektedir [56].

Pompa mekanizması ile direnç kazanma yeteneğine sahip bazı bakteriler şunlardır; *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Stenotrophomonas maltophilia* [57].

CPx-tip ağır metal ATPaz'ların Cu, Zn, Cd ve Pb gibi toksik metallerin hücre membranlarından geçişinde rol aldığı bildirilmiştir [74]. Korunmuş bir membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin (CPx) motifine sahip oldukları için tip IB olarak sınıflandırılan ağır metal taşıyıcıları CPx-ATPaz'lar olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin plazma membranında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında pompalar olarak fonksiyon gördüğü veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [75]

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

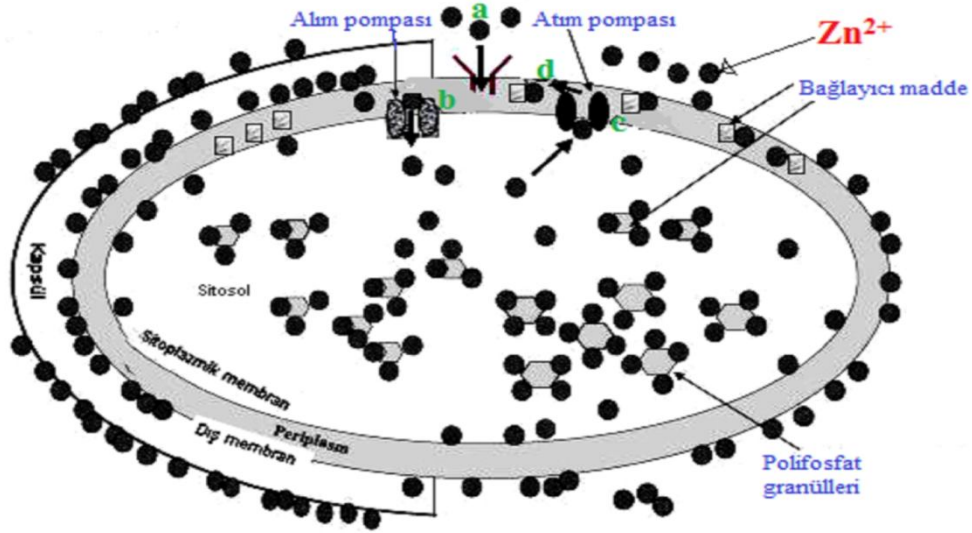
[58]. Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığı ile *E. coli* (Şekil 1.4) ve *S. aureus*'ta;  $Cd^{3+}$  direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S. aureus*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp. veya *Alcaligenes eutrophas*'ta *eze* operonu bulunmuştur.  $Pb^{+2}$  direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus*'ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmit ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [59].



Şekil 1.4. *E.coli*'de arseniğin hücre dışına aktif taşınımı [60]

### 1.1.6.3. Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alınması

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hüresel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metalleri alıkonmaktadır (Şekil 1.5). Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek bulunmaktadır. Bunlar; *Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi ve *Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [61].



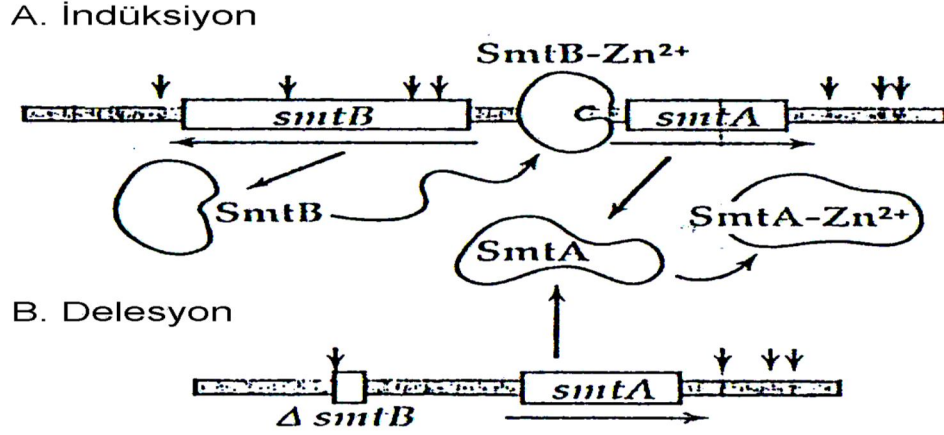
**Şekil 1.5.** Bakterilerde çinko dirençlilik mekanizması [62]

Dış membran üzerinde ekstrasellüler bağlama; spesifik ve non-spesifik yollarla alındıktan sonra çinko iyonlarının akış pompası (P-tipi ATPaz veya Proton antiporterları) aracılığı ile dışarı aktif taşınımı; periplazmik, sitoplazmik proteinler veya diğer polifosfat granülleri gibi ligandlar aracılığı ile alıkoyma [62].

*Synechococcus* denizlerde yaşayan bir Cyanobacteria'dır. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır (Şekil 1.6) Bunlardan *SmtA*,  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır [63].

Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Synechococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothionein'lerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. *SmtA*'daki metalothioneindeki sistein kalıntıları, çok zehirli katyonlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda *SmtB*'nin yapısı belirlenmiştir. *SmtB* proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapılu bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört  $Zn^{2+}$  bağlayıcı yer göstermektedir [64]. Metallerin hücre içinde alıkonmasına ilişkin diğer bir örnek de *Pseudomonas putida*'da görülmektedir. Bu

bakteri metallothioneinlere benzeyen 3 farklı sistein bakımından zengin protein üretmektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*'da siyah bakır sülfat formunun çökmesinde alkoyma aracılığı ile hücre içi birikimi de ispatlanmıştır [65].



Şekil 1.6. *Synechococcus* 'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve çinkoya bağlaması [63]

#### 1.1.6.4. Ekstrasellüler Ahkonma

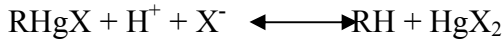
Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur. *S. cerevisiae*'deki Ni<sup>2+</sup> dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni<sup>2+</sup> absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metale zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu<sup>2+</sup> dirençli mantarlarda görülmektedir [66].

Penninckx ve Jaspers'ın raporlarına göre, mikroorganizmalarda glutatyon gibi kükürt bakımından zengin bileşiklerin sentezi, ağır metallere karşı direnç sağlamaktadır [67]. Glutatyon, L-sistein, L-glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşan ve ağır metallere karşı yüksek affinitesi olan bir tripeptittir [68].

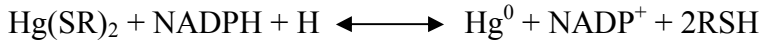
### 1.1.6.5. Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi

Metaller, enzimlerin ve proteinlerin yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak bu molekülleri inaktive edebilmektedirler. Civa bu özelliğinden dolayı toksik metal olarak kabul edilmektedir. Bazı bakteri grupları civayı enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirmektedirler. Bazı bakteriler  $Hg^{2+}$  dirençliliği sağlayan ve bir operon (mer operonu) tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon; sadece  $Hg^{2+}$  yi detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir. Mer operonu, organik civa liyaz ve civa redüktaz olmak üzere iki enzim kodlamaktadır. Organik civa liyaz enzimi C-Hg bağını kırarken, civa redüktaz  $Hg^{2+}$  yi  $Hg^0$  a (metalik civa) indirgemektedir [68, 72, 73].

1- Organik civa liyaz: C-Hg bağının hidrolizinde etkilidir.



2- Civa redüktaz:  $Hg^{2+}$  yi  $Hg^0$  a (metalik civa) indirgemektedir.



Mer operonu tarafından kodlanan transport proteinleri aracılığı ile metalik civa, hücre membranından geçirilerek dışarı verilmektedir [68, 72, 73].

*Bacillus, Escherichia, Klebsiella, Micrococcus, Pseudomonas, Salmonella, Sarcina, Shigella, Staphylococcus* ve *Streptococcus*,  $Hg^{2+}$  ye karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir [76].



### 1.1.6.6. Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltmak sureti ile ya da metal inaktivasyonunda kullanılan belli bazı hücresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir [1]. DNA tamir mekanizmaları plazmit ve genomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd<sup>2+</sup> a maruz kaldığında önemli DNA hasarları olduğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [1].

### 1.1.7. Dirençliliğin Genetik Özellikleri

#### 1.1.7.1. Plazmit

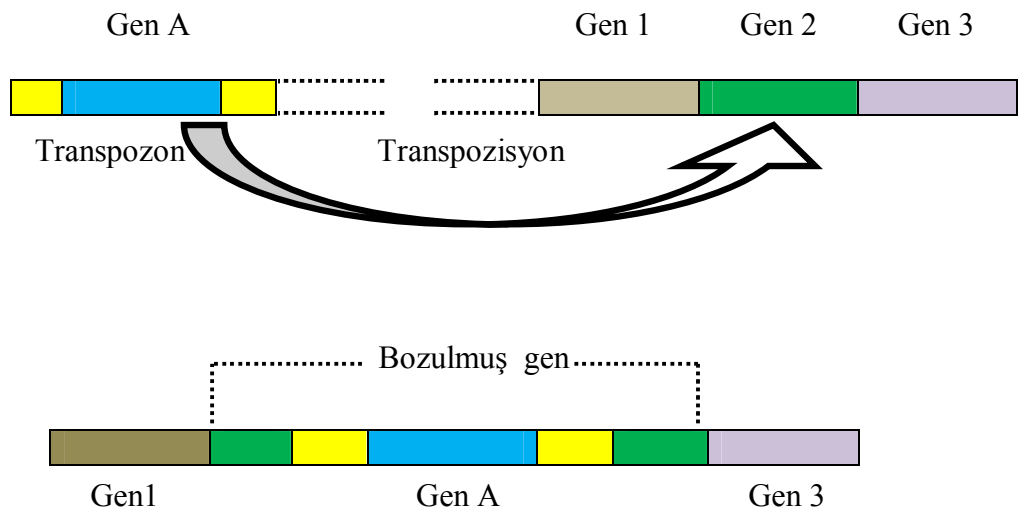
Plazmitler genel olarak; bakteri hücrelerinde ve bazı ökaryotik hücrelerde bağımsız olarak var olan ve sirküler DNA molekülleri olarak tanımlanmıştır [69]. Doğal oluşumlu plazmitler için en kullanışlı sınıflandırma, plazmit genleri tarafından kodlanan temel özelliklere dayanmaktadır. Bu tip sınıflandırmaya göre plazmitler 5 grup altında toplanır. Bunlar; fertilitate (F), dirençlilik (R), kolisin (Col), parçalayıcı ve virülens plazmitlerdir [69]. Plazmit stabilitesinin en yüksek düzeyde etkilendiği koşullar, bakterilerin gelişebildiği sıcaklık değerleridir. Zira plazmitlerin hücrelerden eliminasyonu, kopya sayılarının düşürülmesi ve replikasyonlarının bloke edilmesi sureti ile gerçekleştirilmektedir [70]. Kesikli üretimlerde uzayan inkübasyon sürelerinde, suşun üremesi sonucu ortamdaki besin maddelerinin azalması ve metabolitlerin birikimi, başta pH ve toksik atık ürünler olmak üzere, değişik stres koşulları yaratmaktadır. Bakteriler bu stres koşullarına dirençlilik için değişik yanıt mekanizmaları geliştirmiştir. Adaptif stres yanıtının oluşumu, büyük ölçüde genetik

esneklik ile ilişkili olduğundan, bu özelliğin gen kodu genellikle plazmitler üzerinde kodlanmaktadır [70, 71].

### 1.1.7.2. Transpozon

Transpozon (Tn) genlerine ek olarak diğer genleri de taşıyan genetik element tipidir. [22]. Bakteriyel transpozonlar insersiyon dizi (IS) elementlerinden büyüktür ve transpozisyonlarıyla ilişkili olmayan protein kodlayan genler içerirler. Tn elementleri bakteriyel plazmitler üzerine çoklu ilaç direnci yerleştirebildiklerinden halen özel ilgi çekmektedirler. R faktörleri adını alan bu plazmitler; ağır metallere, antibiyotiklere ve diğer ilaçlara eş zamanlı olarak direnç oluşturan birçok Tn elementleri içerebilirler. Bu elementler plazmitlerden bakteriyel kromozomlara hareket edebilir ve farklı bakteriyel suşlar arasında çoklu ilaç direncini yayabilirler [53].

Bir transpozon elementinin insersiyon bölgesi eğer bir genin içinde ise, transpozonun eklenmesi mutasyon ile sonuçlanacaktır. Dolayısıyla transpozonlar kromozom boyunca kolayca mutasyon oluşturabilirler. Şekil 1.7’de transpozon Gen 2’nin ortasına doğru hareket eder. Bu durum Gen 2 transpozon tarafından bozulur ve inaktive olur. Transpozon üzerindeki A geni her iki yerde de ifade edilecektir [22].

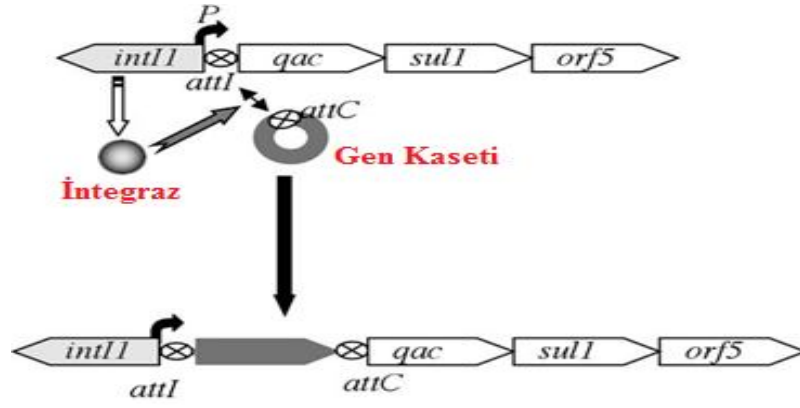


Şekil 1.7. Transpozon mutagenesi [22]

### 1.1.7.3. İntegron

İntegronlar diğerk kaynaklardan gelen genleri yakalayıp ifade edebilen transpozonlardır. Fakat diğerk transpozonlardan farklı olarak, integronlar rastgele insersiyon yapmazlar ve insersiyon bölgesi konusunda oldukça seçicidirler. Bunlar sıklıkla plazmitlere insersiyon yaparlar. İntegronlar plazmitlerin, transpozonların hatta bakteri kromozomlarının bir parçasına dönüşebilirler. Bazı integronlar 5 farklı gen kaseti içerebilirler. Bu tip kasetlerde 40'dan fazla farklı antibiyotik direnç geni ve bazı patojenik bakterilerin virülensi ile ilgili çeşitli genler tanımlanmıştır [22].

İntegronlar konuma özgü gen kodlayan integras (integrase) olarak bilinen rekombinazlardan (recombinase) oluşmuştur, bağlanma bölgesi (att1) ve bu bölgenin aşağısındaki (downstream) genleri ifade eden promotor (p) bulundurur. Şekilde kuaterner amonyum direnç geni *qac*, sülfonamid direnç geni *su11* ve fonksiyonu bilinmeyen *orf5* geni içeren Tip1 integron gösterilmiştir. Genler integras tarafından yürütülen konum-özü rekombinasyonla attI ile attC arasına girebilirler (Şekil 1.8). Gen alımından sonra rekombinasyon bölgeleri yeniden oluşur bu da yeni gen kasetlerinin birleşmesine olanak tanır. Bu yapı bakteri popülasyonları arasında antibiyotik direnç genlerinin transferi ile düzenlenmesine olanak tanır. Antibiyotik genleri diğerk ekolojik avantaj sağlayan genler ile aynı üniteye kümelenebilir. İntegronlar antibiyotik direnç kazanımında büyük role sahip olan modüler yapılardır. Benzer tipteki integron örnekleri insanlarda, hayvanlarda ve doğal habitatlarda da bulunmuştur, bu da gen alan (gen-recruiting) elementlerin farklı ekosistemler arasında geçiş yapabildiğini gösterir [77].



**Şekil 1.8.** İntegron yapısı [77]

### 1.1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Li ve Sn ağır metallerini tolere eden suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Li ve Sn metallerini tolere eden suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK değerleri belirlenmiş ve en yüksek MİK değerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Li ve Sn 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

Çalışmanın deneysel sürecinde aşağıda verilmiş olan materyaller kullanılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1. Nutrient Agar

Stok kültürlerin saklanması için kullanılmıştır.

| <b><u>Bilesimi</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
|------------------------|-------------------|
| Pepton                 | 5 g               |
| Et özütü               | 5 g               |
| Maya özütü             | 1 g               |
| Agar                   | 12 g              |

Besiyeri gerekli miktarda hazırlandıktan sonra 121°C'de 1 Atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

##### 2.1.1.2. Nutrient Broth

İzole edilen bakterilerin; plazmit izolasyonu, üreme eğrisi ve protein izolasyonunda kullanılmıştır.

| <b><u>Bilesimi</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
|------------------------|-------------------|
| Pepton                 | 5 g               |
| Et özütü               | 3 g               |

Besiyeri gerekli miktarda hazırlandıktan sonra 121°C'de 1 Atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

### 2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik disklerinin tamamı merck ve sigma marka olup isimleri ve içerdikleri antimikrobiyal madde miktarı Çizelge 2.1’de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Antibiyogram diskler ve konsantrasyonları

| <b>Antibiyotikler</b>          | <b>Konsantrasyon<br/>(µg/disk)</b> |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Amikacin (AK)                  | 30                                 |
| Amoxicillin/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                                 |
| Netilmicin (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**

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

### **2.1.3.2. Kullanılan Tamponlar**

#### **2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

Bakteri suşlarının plazmit izolasyonu yapılarak profilleri belirlenmiştir.

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

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

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

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

5 N NaOH çözeltisinden 4 mL, %10'luk SDS çözeltisinden 10 mL alınır ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile 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**

| <b><u>Bileşimi</u></b>                 | <b><u>g/L</u></b> |
|--|-------------------|
| Tris                                   | 242 g             |
| Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O | 37.2 g            |
| Glasiyal Asetikasit                    | 57.1 mL           |

Toplam hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

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

##### **2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (1000 mL)**

| <b><u>Bileşimi</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
|------------------------|-------------------|
| Tris                   | 968 g             |
| EDTA                   | 0.032 g           |

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

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

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

##### **2.1.3.2.2.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (100 mL)**

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



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

20 g tartılarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır.

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

4.1 g NaCl tartılarak 90 mL steril suda çözülmüştür ve 10 g CTAB solüsyona eklenerek 65°C'ye kadar ısıtılmıştır. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır.

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

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

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

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

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

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

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

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

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

8.47 g Tris-HCl tartılarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde steril ile tamamlanmıştır. (pH: 8.0)

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

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

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

##### **2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)**

6,8 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8,7 gram K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 Solüsyonlar**

##### **2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon**

0.1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. (pH: 8.0)

##### **2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon**

1.75 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve 1.67 mL Triton X-100 eklenir. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. (pH: 7.6)

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

Çizelge 2.2. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

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

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

Çizelge 2.3. SDS-PAGE çalışma solüsyonları

| Çalışma Solüsyonları                                | Hazırlanışı   |
|---|---|
| Solüsyon A %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid (100 mL) | 29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid tartılıp destile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.   |
| Solüsyon B (4x) (100 mL)                            | 2 M Tris-HCl (pH = 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, destile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.   |
| Solüsyon C (4x) (100 mL)                            | 1 M Tris-HCl (pH = 6.8) 50 mL, %10'luk SDS 4 mL, destile su 46 mL. Buzdolabında saklanır.   |
| Amonyum persülfat %10'luk (5 mL)                    | 0.5 g amonyum persülfat tartılıp destile su ile 5 mL'ye tamamlanır.   |
| Elektroforez Tamponu (1L)                           | Tris (25 µM) 3 g, glisin (192 mM) 14.4 g, SDS (% 0.1) 1 g tartılıp destile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH = 8.3   |
| Örnek Tamponu (5x) 10 mL                            | 1 M Tris-HCl (pH = 6.8) 0.6 mL, %50 Gliserol 5 mL, %10 SDS 2 mL; 0.5 mL 2-merkaptoetanol, %1 Bromfenol mavisi 1 mL; 0.9 mL destile su. Buzdolabında saklanır. |

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

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Solüsyon A        | 7.8 mL   |
| Solüsyon B        | 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    |
| Destile su        | 4.67 mL |
| Amonyum persülfat | 27 µL   |
| TEMED             | 6.6 µL  |

#### 2.1.3.2.7. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonun Hazırlanması

% 0,1 Coomassie Brilliant Blue boya tartılarak, % 12'lik glasiyal asetik asit, % 50'lik metanol ile karıştırılarak çözülür.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri, 41° 30' Kuzey, 36° 05' Doğu koordinatları arasındadır ve 1150 km'den uzun su yatağı, 75.000 km<sup>2</sup> drenaj alanı ve yıllık ortalama 184,2 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> debisi ile Türkiye'nin en uzun nehri olup Kızılırmak Deltası'nı geçerek Karadeniz'e ulaşmaktadır [78].



**Şekil 2.1.** Kızılırmak'ın lokasyonu [79]

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerimizden biridir (Şekil 2.1). Kırıkkale ilinde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehrinin çevresinde bulunmaktadır. Bu işletmelerin faaliyeti sonucu oluşan atık sular ve gazlar çeşitli yollarla nehre ulaşmakta, sonuçta tüm su ekosistemi olumsuz yönde etkilenmektedir [4].

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

| <b>Bölge No</b> | <b>Bölge Adı</b>                          | <b>Bölge Koordinatları</b>               |
|-----------------|---|--|
| 1               | Kesikköprü Barajı Girişi                  | 39° 23' 53,41"K, 33° 25' 18,44"D, 775m   |
| 2               | Kesikköprü Barajı Su Tutma Bendi          | 39° 22' 50,98"K, 33° 24' 56,99"D, 819,5m |
| 3               | Erdemli Mah. - Sarımusallı Mevkii         | 39° 26' 54,60"K, 33° 23' 25,53"D, 781m   |
| 4               | Akkoşan Merkez Mevkii                     | 39° 28' 25,39"K, 33° 24' 00,99"D, 801m   |
| 5               | Eğribük - Akkoşan Y. Mevkii               | 39° 32' 26,97"K, 33° 23' 59,54"D, 760m   |
| 6               | Bucakyazı - Sazbucağı Mevkii              | 39° 33' 51,02"K, 33° 24' 38,51"D, 750,5m |
| 7               | Sulubük - 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 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 |

### 2.2.2. Örneklerin Toplanması

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

### **2.2.3. Lityum ve Kalaya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu**

Li ve Sn ağır metallerine dirençli suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Li ve Sn dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı LiCl ve SnCl<sub>2</sub> ağır metalleri içeren nutrient agar ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri dilüsyon yapılarak ekilmiştir. Sırasıyla 37 ve 30°C'de 24 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Li ve Sn dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

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

Li ve Sn dirençli saf kültürler sırasıyla 37 ve 30°C'de 24 saat inkübe edilerek koloni morfolojisine, ve hücre morfolojisi özelliklerine bakılmıştır. Suşların koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkan/yapışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojileri ise, gram boyamayla mikroskop (immersiyon yağıyla ve 100 büyütme objektifle) altında incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlemlenmiştir.

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

Li ve Sn ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda LiCl ve SnCl<sub>2</sub> eklenerek saptanmıştır. Sırasıyla 37 ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petrillerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki ayrı ayrı Li ve Sn metalleri içeren ortamlara ekilmiştir. 24 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.

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

Kızılırmak'tan izole edilen suşların Li ve Sn 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. Li dirençli suşların, literatürde belirtilen konsantrasyonda Cd, Al, Ag, Ba, Cr, Mn, Pb, Co, Fe, Cu, Sn, Ni, Zn, Hg, Sb, Sr ağır metallerine dirençlilikleri tespit edilmiştir. Nutrient agarlı ortama belirlenen konsantrasyonlarda ayrı ayrı ağır metaller eklenmiştir ve izole edilen Li dirençli suşların ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan suşların ortama eklenen metale karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sn dirençli suşlarda ise Li dirençli sularda kullanılan metod uygulanmıştır.

### **2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi**

MİK değerleri belirlenen Li ve Sn metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Li ve Sn metallerinin bulunduğu NB ortamları için de tekrarlanmıştır. Kültürler 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD 600 nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.



### 2.2.9. Plazmit İzolasyonu

İzole edilen Li ve Sn dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu Birnboim ve Doly tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [80].

1. Plazmit izole edilecek bakterilerin 100 mL'lik metal içermeyen Nutrient Broth besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda LiCl ve SnCl<sub>2</sub> metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır.

2. 30°C'de 20 saat kalay ve 37°C'de 24 saat lityum inkübe edilmiştir. İnkübe edilen kültürlerden 1.5 mL alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1.5 mL kültür konularak işlem tekrarlanmış ve süpernatant atılmıştır.

3. Pelletlerin üzerine 100 µL Solüsyon I (Glukoz/ Tris/ EDTA) ilave edilmiştir. Tüplerdeki karışım homojen oluncaya kadar vortekslenir ve 5 dakika buzda bekletilmiştir.

4. Tüpler buz içinden çıkarılıp üzerlerine 200 µL Solüsyon II (NaOH/ SDS) ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5. 150 µL Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit) ilave edilmiştir ve tüpleri birkaç kez alt üst ettikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

6. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı yeni tüpe alınarak pellet atılır.

7. %100'lük etanolden 900 µL tüplere konulmuş ve -20 °C'de bir gece bekletilmiştir.

8. Gece sonunda beklemiş olan solüsyon 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir vesüpernatant kısmı atılmıştır.

9. Pellet üzerine %70'lik etanolden 1 mL eklenerek 15 dakika 13.100 rpm'de santrifüj edilmiştir.

10. 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 Li ve Sn dirençli bakterilerin kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [81].

1. 15 mL'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
2. Pellet üzerine 5.7 µL TE tampon eklenmiştir ve karıştırılmıştır.
3. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz-K ve 30 µL RNAaz eklenerek 60 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır.
5. 800 µL CTAB/ NaCl tanponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir.
6. Kloroform/ izoamil alkol solüsyonunu ekleyerek 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/ kloroform/ izoamil alkol tampon eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8. Pellet üzerine 0.6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Ethanol uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine 200 µL TE tamponu eklenmiştir ve -20°C'de saklanmıştır.

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

%1'lik hazırlanan agaroz jel solüsyonu, yaklaşık 45-50°C'ye soğutulduktan sonra tarak yerleştirilmiş jel kabına dökülmüştür. Polimerize olan jelden tarak çıkarıldıktan sonra 20 µL plazmit DNA örnekleri 5 µL yükleme tamponu ile karıştırılmış ve mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Plazmit DNA'larının moleküler ağırlıklarını hesaplamak amacıyla bir kuyucuğa 3 µl marker DNA (Lambda DNA/ HindIII) yüklenmiştir. Aparata jelin yüzeyini kaplayacak

şekilde yürütme tamponu ilave edilmiş ve 80 V/cm<sup>2</sup> voltaj, 6 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır.

#### **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 1 mM MgSO<sub>4</sub> ile 15 dakika muamele edilerek geri alınmıştır. Jel daha sonra UV transillüminatör üzerine konularak DNA bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır [82].

#### **2.2.13. Plazmit DNA'nın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi**

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

#### **2.2.14. Plazmit Eliminasyonu**

İzole edilen Li ve Sn dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon çalışmaları yapılmıştır [83].

### 2.2.15. Total Protein İzolasyonu

İzole edilen Li ve Sn dirençli bakterilerin total protein izolasyonu Kishore ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [84].

1. 100 mL'lik metal içermeyen Nutrient Broth besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda LiCl ve SnCl<sub>2</sub> metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerinden uzaklaşmak için santrifüj yapılmıştır, süpernatant atılmıştır.
2. Pellet üzerine 5 mL steril su eklenerek 2 kez yıkama işlemi yapılmıştır, süpernatant atılmıştır.
3. Pellet üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır.
4. 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant temiz tüplere alınmıştır.
5. 75 µL örnek üzerine 75 µL örnek tampon ilave edilmiştir.
6. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

### 2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu

İzole edilen Li ve Sn dirençli bakterilerin dış membran izolasyonu Achtman ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır [85].

1. 100 mL'lik metal içermeyen NB (Nutrient Broth) besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonlarda LiCl ve SnCl<sub>2</sub> metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerinden uzaklaşmak için santrifüj yapılmıştır, süpernatant atılmıştır.
2. 10 mL, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır.
3. Parçalanmış hücreler 4°C'de 3000 rpm, 20 dakika santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır.

4. Süpernatant yeni tüplere alınarak 4°C’de, 20.000 rpm, 60 dakika santrifüj yapılmıştır.
5. Pelletler üzerine 150 µL steril su eklenerek -20°C’de 1 gece bekletilmiştir.
6. -20°C’den alınan örnekler 200 µL Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20 dakika bekletilmiştir.
7. Örnekler 20°C’de 2000 rpm, 90 dakika santrifüj yapılmıştır süpernatant atılmıştır.
8. Pelletler üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100 °C’de 5 dakika bekletilmiştir.

#### **2.2.17. Dış Membran ve Total Proteinlerin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi**

Dış membran ve total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Page Ruler Pstained Protein Ladder (250 kDa), marker referans alınarak her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

Dış membran, total protein analizleri Laemmli’ye göre, %4’lük dengeleyici ve %12’lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır [86].

### **2.2.18.1. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

16.7 mL %30'luk Akrilamid/ Bis Akrilamid, 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 aralığına 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 Hazırlanması**

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

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

Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra 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 çözeltilisi içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltilisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dakikalık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [87]. 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 (Gel Logic 2200 Pro) kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [88].

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Lityum ve Kalaya Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak üzerinden 12 farklı bölge belirlenmiştir. Bu bölgelerden alınan su örneklerinden lityum ve kalaya dirençli bakteriler izole edilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi farklı bölgelerden lityuma dirençli toplam 15 suş ve kalaya dirençli toplam 11 suş izole edilerek MİK değerleri saptanmıştır. Lityum için MİK değeri 5000 mgL<sup>-1</sup> olan suş 12. bölgeden izole edildiği için Li12 olarak isimlendirilmiştir. Kalay için MİK değeri ise 160 mgL<sup>-1</sup> olan suş 11. bölgeden izole edildiği için Sn11 olarak isimlendirilmiştir. En yüksek MİK değeri gösteren Li12 ve Sn11 suşları daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak için seçilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Lityum ve kalaya 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 |
| Sn   | + | - | - | - | - | - | - | - | + | +  | +  | +  |
| Li   | + | + | + | + | - | + | + | - | + | +  | +  | +  |

(-), negatif; (+), pozitif

#### 3.2. Bakterilerin Tanımlanması

Li12 ve Sn11 suşları biyokimyasal ve morfolojik testler (Çizelge 3.2) yapılarak tanımlanmıştır.



**Çizelge 3.2.** Lityum ve kalay dirençli suşların biyokimyasal özellikleri

| <b>Biyokimyasal Özellikler</b>     | <b>Kalay Dirençli Suş (Sn11)</b> | <b>Lityum Dirençli Suş (Li12)</b> |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Şekil                              | Basil                            | Kok                               |
| Gram Reaksiyon                     | (-)                              | (+)                               |
| Koku                               | -                                | +                                 |
| Pigment                            | Sarımsak                         | Krem                              |
| Akışkanlık                         | Yapışkan                         | Akışkan                           |
| DP300 (DP3)                        | -                                | +                                 |
| Growthcontrol (GC)                 | +                                | +                                 |
| Asetamid (ACE)                     | -                                | -                                 |
| Eskülin (ESC)                      | +                                | +                                 |
| Plantindican (PLI)                 | +                                | -                                 |
| Üre (URE)                          | -                                | -                                 |
| Sitrat (CIT)                       | -                                | +                                 |
| Malonat (MAL)                      | -                                | +                                 |
| Polymxin B (PXB)                   | -                                | -                                 |
| Laktoz %10 (LAC)                   | -                                | +                                 |
| Maltoz (MLT)                       | -                                | +                                 |
| Mannitol (MAN)                     | +                                | +                                 |
| Ksiloz (XYL)                       | +                                | -                                 |
| Raffinoz (RAF)                     | -                                | -                                 |
| Sorbitol (SOR)                     | -                                | -                                 |
| Sükroz (SUC)                       | +                                | +                                 |
| Inositol (INO)                     | -                                | -                                 |
| Adonitol (ADO)                     | -                                | -                                 |
| Hidrojen sülfür (H <sub>2</sub> S) | -                                | -                                 |
| ONPG (ONP)                         | +                                | -                                 |
| Ramnoz (RHA)                       | +                                | -                                 |
| Arabinoz (ARA)                     | +                                | -                                 |
| Glikoz (GLU)                       | +                                | +                                 |
| Arjinin (ARG)                      | -                                | -                                 |
| Ornithine (ORN)                    | -                                | +                                 |
| Oksidaz (OXI)                      | -                                | -                                 |
| <b>Tanımlanan Türler</b>           | <i>Pantoea agglomerans</i>       | <i>Staphylococcus aureus</i>      |

(-), negatif; (+), pozitif

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi lityum dirençli gram pozitif, kok olan suş *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanırken, kalay dirençli gram negatif, basil olan suş *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır. Her iki suşun eskülin, mannitol, sükröz ve glikoz pozitif olduğu tespit edilmiştir.

### 3.3. Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profili

#### 3.3.1. Lityum Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

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

**Çizelge 3.3.** Lityum dirençli *S. aureus* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

| Metal Formu  | Konsantrasyon (mg/L) | Dirençlilik Profili |
|--|----------------------|---------------------|
| Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 195                  | S                   |
| Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | 1200                 | S                   |
| MnSO <sub>4</sub>                                  | 1000                 | S                   |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 825                  | S                   |
| FeCl <sub>3</sub>                                  | 450                  | S                   |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 450                  | S                   |
| K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | 1400                 | S                   |
| AgNO <sub>3</sub>                                  | 8                    | R                   |
| Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 750                  | S                   |
| SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 160                  | R                   |
| NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 395                  | R                   |
| AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 300                  | R                   |
| BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 2700                 | R                   |
| CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9 H <sub>2</sub> O | 1100                 | S                   |
| Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | 2000                 | R                   |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 750                  | S                   |

R, dirençli; S, duyarlı

Li dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun ise Çizelge 3.4’de gösterildiği gibi ampicilin, aztreonam gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacilin ve trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir.

**Çizelge 3.4.** Lityum dirençli *S. aureus* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

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

R, dirençli; S, duyarlı

### 3.3.2. Kalay Dirençli *Pantoea agglomerans* Suşunun Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

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

**Çizelge 3.5.** Kalay dirençli *P.agglomerans* suşunun çoklu metal dirençlilik profili

| Metal Formu  | Konsantrasyon (mg/L) | Dirençlilik Profili |
|--|----------------------|---------------------|
| Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 195                  | S                   |
| Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | 1200                 | R                   |
| MnSO <sub>4</sub>                                  | 1000                 | S                   |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 825                  | S                   |
| FeCl <sub>3</sub>                                  | 450                  | S                   |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 450                  | S                   |
| K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | 1400                 | R                   |
| AgNO <sub>3</sub>                                  | 8                    | R                   |
| Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 750                  | S                   |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | 750                  | S                   |
| LiCl   | 5000                 | R                   |
| AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 300                  | R                   |
| BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 2700                 | R                   |
| CrN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> 9 H <sub>2</sub> O | 1100                 | S                   |
| Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | 2000                 | R                   |
| NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 395                  | S                   |

R, dirençli; S, duyarlı

Sn dirençli *Pantoea agglomerans* suşunun Çizelge 3.6’da gösterildiği gibi bacitracin, oxacillin ve trimeth-sulfa antibiyotiklerine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir.

**Çizelge 3.6.** Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun antibiyotik dirençlilik profili

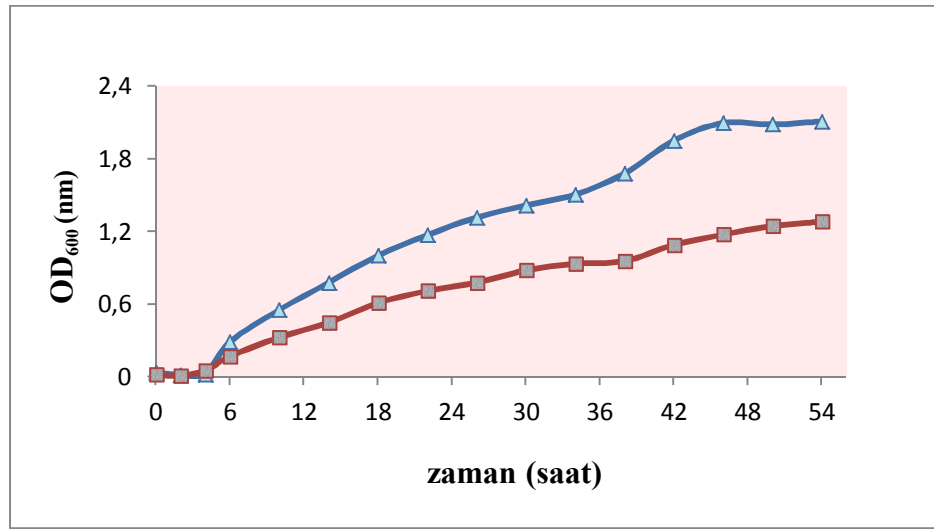
| <b>Antibiyotikler<br/>(µg/disk)</b> | <b>Dirençlilik<br/>Profili</b> |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Amikacin (30)                       | S                              |
| Amoxycilli/CA (20/10)               | S                              |
| Ampicilin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

R, dirençli; S, duyarlı

### 3.4. Bakterilerin Üreme Eğrisi

#### 3.4.1. Lityum Dirençli Bakterinin Üreme Eğrisi

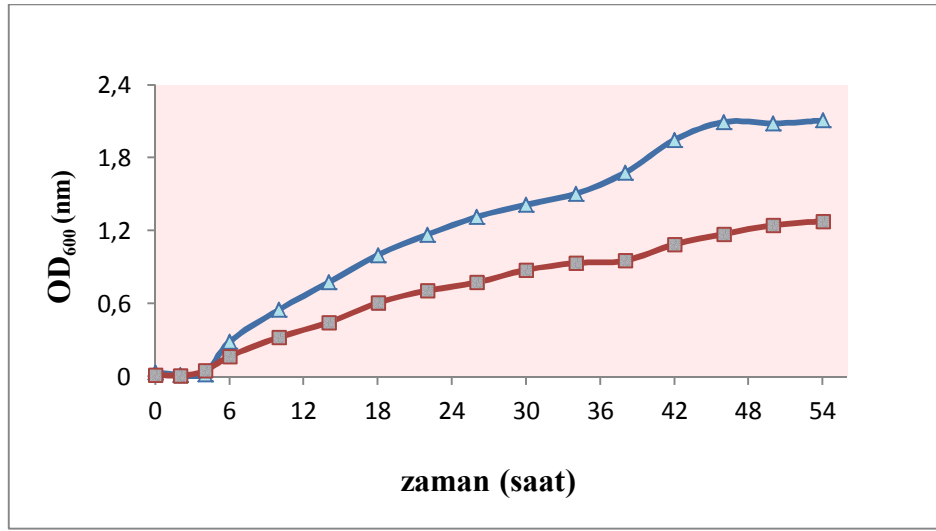
Lityuma dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun metal içeren ve metal içermeyen ortamlarda üreme eğrisi belirlenmiş ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Lityum içeren ortamdaki OD’nin lityum içermeyen ortamdakine kıyasla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. *S. aureus* suşunun —▲— lityum içermeyen ve —■— lityum içeren ortamdaki üreme eğrisi

### 3.4.2. Kalaya Dirençli Bakterinin Üreme Eğrisi

Kalaya dirençli *Pantoea agglomerans* suşunun metal içeren ve metal içermeyen ortamlarda üreme eğrisi belirlenmiş ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir. *P. agglomerans* suşunun kalay içermeyen ortamda log fazına erken geçerken, kalay içeren ortamda 10 saatlik bir gecikmeden sonra log fazına geçtiği tespit edilmiştir. Kalay içeren ortamda log fazına geç girildiği halde OD’nin kalay içermeyen ortama göre yaklaşık 2 katına çıktığı gözlemlenmiştir. Bu durum kalayın *P. agglomerans* suşu üzerinde uzun bir lag fazından sonra indükleyici bir etki yaptığı şeklinde yorumlanmıştır.



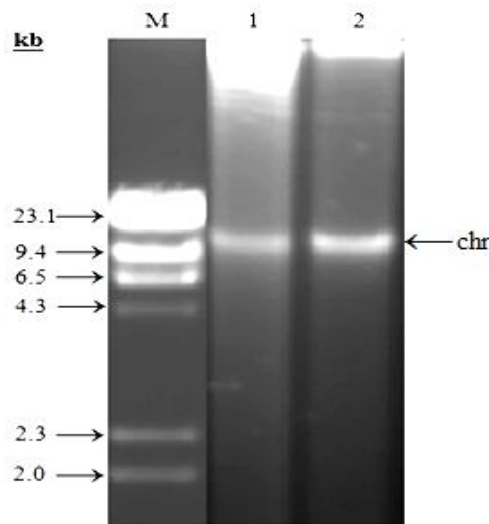
Şekil 3.2. *P. agglomerans* suşunun —▲— kalay içermeyen ve —■— kalay içeren ortamdaki üreme eğrisi

### 3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Lityum ve kalay dirençli suşların metal dirençliliği ile plazmit profilleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit ve kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır.

#### 3.5.1. Lityum Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Lokasyonu

Lityum dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun plazmit DNA profili çıkarılarak kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.3’de gösterildiği gibi *S. aureus*’un suşunun lityum içeren ve içermeyen her iki ortamda da plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *S. aureus* suşunda lityum direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



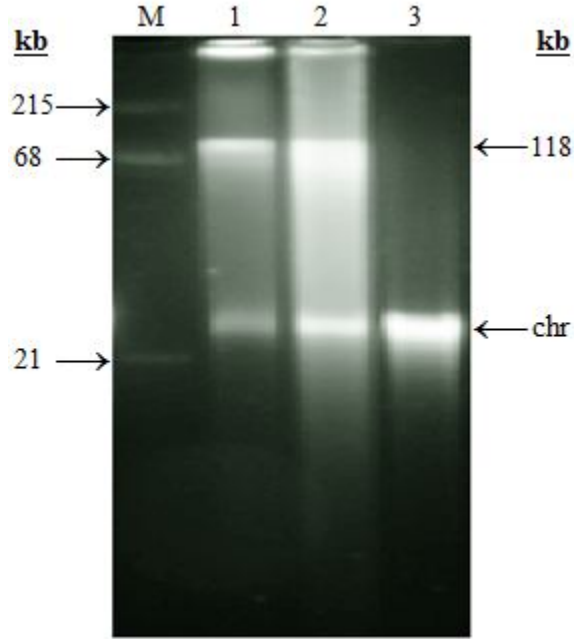
**Şekil 3.3.** *S. aureus* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

(M, marker (Lambda DNA/ HindIII); 1, lityum içermeyen ortam; 2, lityum içeren ortam; chr, kromozomal DNA)



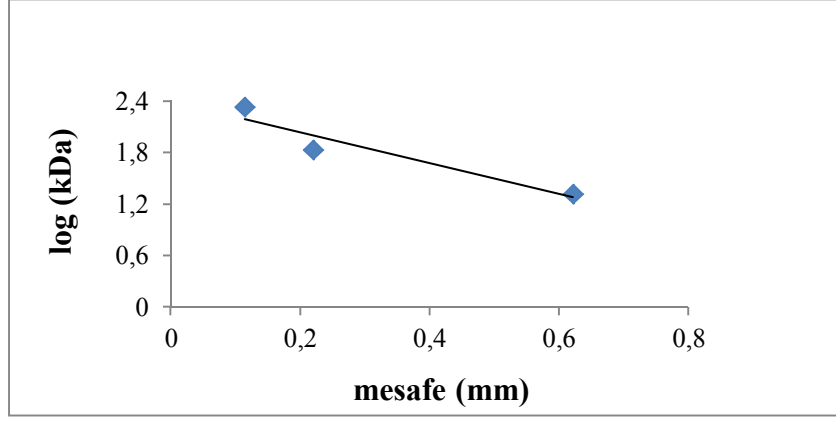
### 3.5.2. Kalay Dirençli Bakterinin Plazmit DNA Profili ve Kromozomal DNA Analizi

Kalay dirençli *Pantoea agglomerans* suşunun plazmit DNA profili çıkartılmış ve kromozomal DNA lokasyonu belirlenmiştir. Şekil 3.4’de gösterildiği gibi *P. agglomerans* suşunun kalay içeren ve içermeyen ortamda 118 kb boyutunda büyük moleküler ağırlıkta bir plazmit tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu çalışmaları sonrasında 118 kb boyutundaki plazmiti elimine edilmiş olan *P. agglomerans* suşunun kalay ve oxacilline dirençliliğini koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kalay ve oxacilline direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.4.** *P. agglomerans* suşunun plazmit DNA profili ve kromozomal DNA lokasyonu

(M, marker (*Agrobacterium tumefaciens*); 1, kalay içermeyen ortam; 2, kalay içeren ortam; 3, plazmit eliminasyon sonrası; chr, kromozomal DNA)



**Şekil 3.5.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

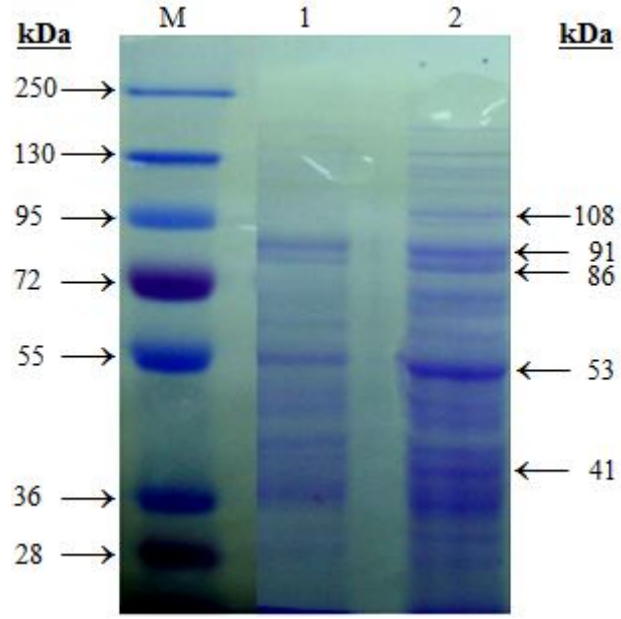
*Agrobacterium tumefaciens* suşunun moleküler ağırlığı bilinen plazmitleri marker olarak kullanılarak her jel için standart eğri oluşturulmuş ve moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmitlerin moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Şekil 3.5).

### **3.6. Bakterilerin Dış Membran Protein ve Total Protein Analizi**

Lityum ve kalay dirençli suşların metal içeren ve içermeyen ortamlardaki dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir.

#### **3.6.1. Lityum Dirençli Suşun Total Protein Analizi**

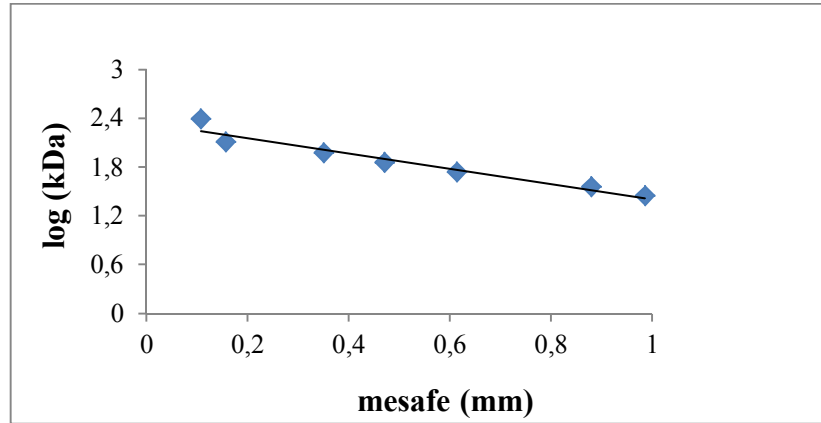
Lityum dirençli *S. aureus* suşunun total protein profilleri belirlenmiştir. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi her bir jel için ayrı olarak elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Total protein analizi sonucu *S.aureus* suşunun lityum içeren ortamda 108, 91, 86, 53, 41, 36 kDa boyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla 25, 1.5, 1.8, 1.9, 2.0 ve 2.2 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda özellikle 108 kDa ağırlığındaki protein başta olmak üzere diğer total proteinlerinde lityum dirençliliğinde etkin rol oynadığı belirlenmiştir.



**Şekil 3.6.** Lityum dirençli *S. aureus* suşunun total protein profili

(M; marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 250 kDa), 1; lityum içermeyen ortam, 2; lityum içeren ortam)

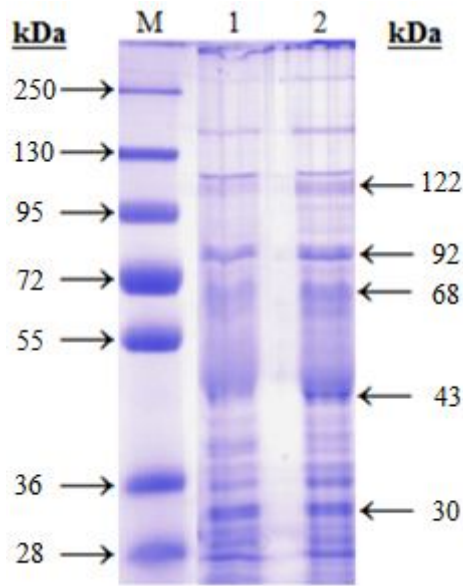
Şekil3.6.'da gösterilen marker referans alınarak söz konusu jel için Şekil 3.7.'de gösterilen standart eğri çizilmiş ve molekül ağırlıkları bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlıkları tespit edilmiştir.



**Şekil 3.7.** Total proteinlerin moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### 3.6.2. Kalay Dirençli Suşun Total ve Dış Membran Protein Analizi

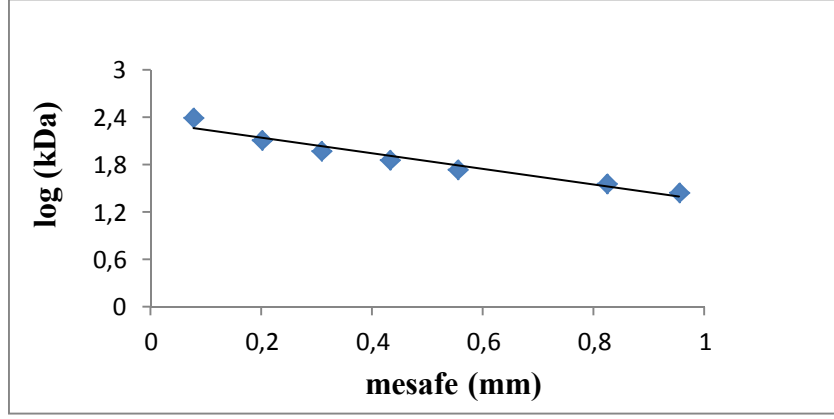
Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun total ve dış Membran protein profilleri belirlenmiştir. Total protein analizi sonucu *P. agglomerans* suşunun kalay içeren ortamda 122, 92, 68, 50, 36, 32 ve 28 kDaboyutundaki proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla 2.8, 1.4, 1.8, 2.1, 2.8, 1.1 ve 1.1 kat artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.8). Bu sonuçlar doğrultusunda kalay dirençliliğinde özellikle 122, 68, 50 ve 36 kDa ağırlığındaki proteinlerin etkin rol oynadığı belirlenmiştir.



**Şekil 3.8.** Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun total protein profili

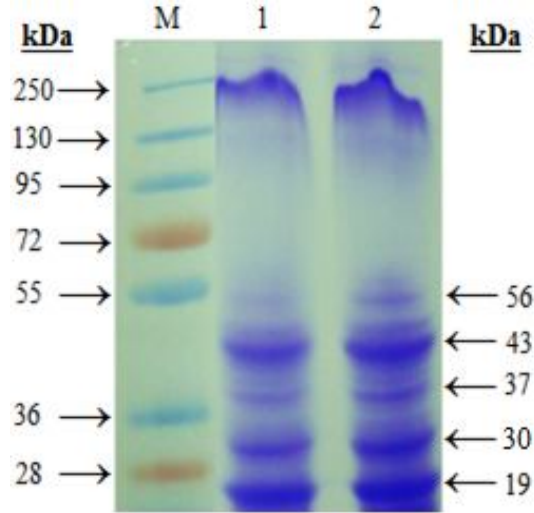
(M; marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 250 kDa), 1; kalay içermeyen ortam, 2; kalay içeren ortam)

Protein marker referans alınarak her bir jel için elde edilen standart eğriden moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları tespit edilmiştir (Şekil 3.9).



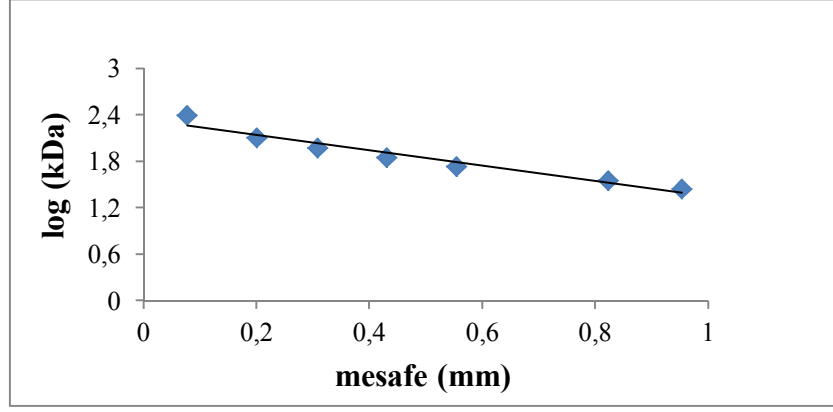
**Şekil 3.9.** Total proteinlerin moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

Dış membran protein analizi sonucunda *P. agglomerans* suşunun kalay içeren ortamda 56, 43, 37, 30, 19 kDa boyutundaki proteinlerin ekspresyonlarında sırasıyla 1.7, 1.2, 1.8, 2.9, 2.0 kat artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.10). Bu sonuçlar doğrultusunda kalay dirençliliğinde özellikle 56, 37, 30 ve 19 kDa ağırlığındaki dış membran proteinlerinin etkin olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.10.** Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun OMP profili

(M; marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 250 kDa), 1; kalay içermeyen ortam, 2; kalay içeren ortam)



**Şekil 3.11.** OMP moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

Protein marker referans alınarak her bir jel için ayrı olarak elde edilen standart eğriden moleküler ağırlıkları bilinmeyen dış membran proteinlerin molekül ağırlıkları tespit edilmiştir (Şekil 3.11).

#### 4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kızılırmak üzerinde belirlenmiş koordinatlardan alınmış örneklerinden lityuma dirençli onbeş, kalaya dirençli onbir suş izole edilmiştir. Bu suşlar içerisinde MİK değeri  $5000 \text{ mgL}^{-1}$  ile en yüksek lityum direnci gösteren ve 12. bölge olarak adlandırılan Irmak Mevkii'den izole edilen suş seçilmiştir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak Li12 suşu *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır. MİK değeri  $160 \text{ mgL}^{-1}$  ile en yüksek kalaya dirençliliği gösteren ve 11. bölgede bulunan mezbahane ve makine kimya fabrikalarının yakın olduğu yerden izole edilen suş seçilmiştir. Morfolojik özellikleri ve biyokimyasal test sonuçları dikkate alınarak Sn11 suşu *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır.

Lityum doğada bol miktarda bulunur. Bazı ülkelerdeki göllerde Li miktarları; Salar de Atacama; 1500 ppm, Zabuye; 970 ppm, Salar del Hombre; 600 ppm, Silver Peak; 200 ppm, Scarles Lake; 83 ppm, Great Salt Lake; 60 ppm, Dead Sea'de ise 20 ppm olduğu belirlenirken [89, 90], ülkemizdeki göllerde Li miktarı 40 ppm'i aşmadığı görülmüş olup, Tuz Gölünde 325 ppm lityum tespit edilmiştir [91]. Kızılırmak'ta 2011-2012 yıllarında mevsimsel periyotlarla alınan su örneklerinin metal analiz sonuçlarına göre lityum ortalama 0.045 ppm olarak tespit edilmiştir.

Lityum suya toprak, idrar ve temizlik suyu olmak üzere başlıca üç kaynaktan ulaşır. İçme sularında iz element olarak LiCl tuzu bulunduğu belirlenmiştir [92]. Lityum toksik olmayan elementler arasında yer almaktadır. Literatür çalışmalarına baktığımızda lityumun toksitesi hakkında fazla bir çalışma olmadığı görülmüştür.

Stafilokoklar; insan ve hayvanlar için fırsatçı patojendir. İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde kolonize olurlar. *S. aureus* normal insanların, hastanede çalışanların ve tedavi altındaki hastaların %70'nin burun mukozasına kolonize olur. *S. aureus*'un neden olduğu hastalıkların çoğunda *S. aureus* suşunun yayılımı yüksek miktarda ekstraselüler proteinlerin üretimi ile gerçekleşmiştir [94]. Abdelatey ve arkadaşları [93], topraktan izole ettikleri  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Co}^{2+}$  dirençli bakterileri tanımlamıştır. *S.*

*aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* gibi gram pozitif bakteriler ve *Pseudomonas* sp., *Bordetella* sp. gibi gram negatif bakteriler tespit etmişlerdir.

Shukla ve arkadaşlarının [95], yapmış oldukları çalışmada nehirden aldıkları su örneklerinin tanımlanması için 16S rRNA gen sekansı yapılmış ve *Staphylococcus* türleri tanımlanmıştır.

Baker ve arkadaşları [96], yaptıkları çalışmada klinikten *S. aureus* suşlarını izole edip, bu suşların bakır dirençlilik mekanizmasını araştırılmışlardır. *S. aureus* bakır direncinin her stafilokok izolatında aynı olmadığı gösterilmiştir. İlk defa insanlardan izole edilmiş patojen bakterilerde plazmit kaynaklı bakır direnci rapor edilmiştir. *S. aureus* hem kromozomal hem de plazmit kodlu bakır homeostazi mekanizmalarını bakırlı ortamda regüle ettiği belirtilmiştir.

Stafilokoklar yaşadığımız çevrede yaygın olarak bulunmakta olup, aynı zamanda insan normal florasının da üyesidirler. İnsan deri ve mukozaları başta olmak üzere birçok vücut bölgesinde geçici flora üyesi olarak *S.aureus* bulunabilir. Doğumdan itibaren umblikus, perine ve deriye kolonize olur. Daha sonraki yıllarda özellikle buruna yerleşir. Sağlıklı kişilerde *S.aureus* taşıyıcılığı, başta burun olmak üzere perine ve aksillada kolonizasyon şeklindedir. *S.aureus*' un nazal kolonizasyonu ise en sık vestibulum nazal bölgesindedir [119].

Bu çalışma kapsamında kalayın inorganik formu olan SnCl<sub>2</sub> bileşiği kullanılmıştır. Literatür çalışmalarına bakıldığında inorganik kalay bileşikleri hakkında sadece birkaç ekzotoksikolojik çalışma yayınlanmıştır ve genellikle toksisite değeri düşük olarak tanımlanmıştır. Çalışmalarda genellikle toksitesi daha fazla olduğu için organokalay bileşikleri kullanılmıştır.

Duydu [98], yapmış olduğu derlemede organokalay bileşiklerinin gemi gövdelerinin boyanmasında kullanılan boyalara ilave edilmesiyle oluşan çevre problemlerini araştırmıştır. Deniz trafiğinin yoğun olduğu bölgelerde yüksek tributilkalay (TBT)



konsantrasyonları nedeniyle önemli deniz ürünleri olan istridye ve midyelerde deformasyonlar gözlenmiştir. Yat limanlarındaki TBT konsantrasyonları mevsimlere göre incelenmiş ve özellikle yaz aylarında kış aylarına göre % 60 oranında daha yüksek değerler elde edilmiştir (646 ngL<sup>-1</sup>). Çevre sularında kabul edilebilir konsantrasyonlar TBT için 20 ngL<sup>-1</sup>, kalay için ise 8 ngL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

Heinz Rüde [99], yaptığı bir çalışmada kalayın inorganik kalay bileşikleri ve organokalay bileşiklerinin biyo-uygunluk literatürünü gözden geçirmektedir. Metalik kalay ve inorganik kalay bileşiklerinin toksisitesi düşüktür. Sucul sistemlerde kalayın biyo-uygunluk potansiyeli tamamen çözülmüş iyon türlerine bağlı olduğu görülmüştür. Bazı araştırmalar sonucu kalay, insan için gerekli iz elementtir. Ancak organokalay bileşiklerinin toksikolojik etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle triorganokalay bileşiklerinin biyosid olarak kullanımı toksik olduklarını göstermektedir. Organokalay bileşikleri sucul organizmalarda her yerde görülebilen bir dağılıma sahiptir. Organizmalardaki biyokonsantrasyon ve ekzotoksisite, biyo-uygunluk fraksiyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir.

Adıyaman Koltuksuz [100] yapmış olduğu çalışmada sağlıklı armut ağaçlarından izole ettiği toplam 167 *P. agglomerans* ve *P. fluorescens* izolatından 31'i ham armut meyvelerinde ve koparılmış armut çiçeklerinde *Erwinia amylovora* enfeksiyonlarını %80-%100 oranında engelleyerek hastalık için önerilen en etkili bakterisit olan streptomisinden daha başarılı bulunmuştur.

Yapılan birçok çalışmada hava, toprak ve sudaki inorganik kalay konsantrasyonun genellikle düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (yüksek seviyede kalay mineralini bulduran bölgeler ve kalay işleme yapılan yerler hariç). Bulten ve arkadaşlarının [101], yapmış olduğu çalışmada bitki, hayvan ve insan orijinli kalay toksisitesi belirtilmemiştir. İnorganik kalay tuzlarının değerlendirilmesi, organizmalarda düşük toksisitesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Organizmaya giren bu ufak miktar daha sonra idrar ile atılmıştır.

Organokalay bileşiklerini içeren geniş çaplı araştırmalar göstermiştir ki; TBT, sucul ekosistemler için bilinen en toksik bileşiktir. TBT'nin yaygın kullanımı, sucul ekosistemde ciddi çevresel sorunlara neden olduğu belirtilmiştir. TBT içeren organokalay örnekleri genellikle alev fotometrik belirleyicili gaz kromatografisi (GC-FPD) ile incelenmiştir [102].

Jeong ve arkadaşlarının [102], yaptıkları çalışmada körfezden izole ettikleri tributilkalay dirençli suşları 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Bu suşlar; *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *E. agglomerans*, *Pantoea* sp., ve *Alcaligenes* sp. olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada TBT dirençli *Pantoea* sp. tanımlanırken bizim çalışmada kalaya dirençli *P. agglomerans* suşu tanımlanmıştır.

Yoğun tarım, aşırı gübre kullanımını zorunlu kılmaktadır. Yüksek verim için fazla girdi kullanan tarım sistemleri çevresel problemlere ve doğal kaynakların tükenmesine yol açmaktadır. Gübre uygulamasını minimum, bitki gelişme ve beslenmesini maksimum düzeye çıkarmak amacıyla rizosferden seçilmiş farklı mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) bitki gelişimine faydalı etkileri nedeniyle biyolojik gübre (BG) olarak kullanılmaktadır. Farklı bitkilerde test edilen bitki gelişmesini teşvik edici bakterilerden *P. agglomerans* hıyar için % 14 meyve verimi, %50 meyve sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir [120].

Ticari metaller nehirlere doğal ya da insan kaynaklı girebilir. Genellikle etkilenmemiş çevrelerde, metallerin çoğunun konsantrasyonu çok düşüktür. Bu metaller doğal madenlerden ve havadan gelmektedir. Başlıca insan kaynaklı ağır metal kirlenmesi maden ocaklarından, ağır metal dirençli atık maddelerden, tarım alanlarında geliş güzel kullanılan ağır metal içerikli atık maddelerden ve farklı endüstrilerde kullanılan ağır metallerden gelmektedir [103]. Reza ve Singh [104], tarafından yapılmış çalışmada Brahmani nehrinde çeşitli zamanlarda aldıkları su örneklerinin ağır metal konsantrasyonlarına bakılarak su kalitesini tespit etmişlerdir.

Kalay ve arkadaşları ile Yazkan ve arkadaşlarının [105, 106], yapmış oldukları çalışmalar incelendiğinde, son yıllarda hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşme sonucu özellikle sucul ortamda toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren birçok çalışmanın olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metallerin, metal bileşiklerinin ve çeşitli minerallerin; göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş yayılım gösterdikleri ortaya konulmuştur.

Rether [107], yapmış olduğu çalışmada insan ve endüstriyel faaliyetler sonucunda atmosfere atılan ağır metal miktarları belirlenmiştir. Doğal çevrimler sonucu yıllık 7600 ton Cd, 18800 ton arsenik, 3600 ton civa, 332000 ton kurşun atmosfere atılmakta iken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selenyum (19 kat), kadmiyum (8 kat), civa, kurşun, kalay (6 kat), arsenik, nikel ve krom (3 kat) ) daha fazla olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ağır metallerin çevreye yayılımına da etken olan en önemli endüstriyel faaliyetlerin çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleri olduğu ifade edilmektedir.

Metal ihtiva eden çevrelerdeki selektif baskılar, tüm toksik metallere karşıbelli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu direnç mekanizmalarının büyük bir kısmı plazmit kökenlidir. Bu konuda çalışılan mikroorganizmalar daha çok, *Staphylococcus*, *E.coli*, *P. aeruginosa* ve *Bacillus* türlerini kapsamaktadır. Dirençlilik *Bacteroides* ve *Clostridium* türlerinde de civa ve organo civalar için dirençlilik bildirilmiştir [1].

Lityum dirençli *S. aureus* bakterinin antibiyotik ve diğer ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profilleri incelenmiştir. *S. aureus*'un Ag, Sn, Ni, Al, Ba, Sr gibi metallere ve ampisilin, aztreonam gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacilin, trimethsulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Narasimhulu ve arkadaşlarının [108], yaptıkları çalışmada atık sulardan izole edilen bakteri suşlarının ağır metallere ve antibiyotiklere karşı dirençliliği üzerine çalışma yapılmıştır. Cu, Co, Ni, C, Pb ve Cd ağır metallerine dirençli suşlar izole edilmiş ve bunların MİK değerlerine bakılmıştır. Suşların en fazla kroma karşı direnç gösterirken, en az nikel karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu suşların kanamisin, amoksisilin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençliliklerine bakılmış, bu suşlar maksimum amoksisiline karşı direnç gösterirken, minimum direnci ise kanamisine karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Matyar ve arkadaşlarının [110], İskenderun Körfezi'nde yapmış oldukları çalışma incelendiğinde, *Aeromonas* sp. izolatlarının yüksek oranda sefazolin ve trimetofrin-sülfamethaksol'a (%66,6), *Pseudomonas* sp. izolatlarının ise sefazolin (%84,8) ve sefaroksim'e (%71,7) karşı direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *Aeromonas* sp. izolatlarının %98,3'ünün, *Pseudomonas* sp. izolatlarının ise %75,4'ünün bakıra karşı direnç gösterdiği de belirlenmiştir. Thimm ve arkadaşları [111], atık sular ile sulanmış arazilerde bazı antibiyotiklere karşı yüksek miktarlarda dirençli olan *E. coli* suşları tespit edilmiştir.

Farkas ve arkadaşlarının [109], Po nehrinde yaptıkları bir çalışma ile son on yıldaki çalışmaların verilerini karşılaştırdığında 10 yılda Cd, Cu, Ni, Pb, Zn metallerinin yüzey sediment kirliliğinde sürekli bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir.

Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun ağır metallere karşı çoklu dirençlilik profili ve antibiyotik dirençlilik profilleri incelenmiştir. *P. agglomerans*'ın Pb, Sb, Ag, Li, Al, Ba, Sr gibi metallere ve bacitracin, oxacillin, trimeth-sulfa gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Goñi-Urriza ve arkadaşlarının [112] yapmış oldukları çalışma da kentsel kirliliğin nehirlerdeki bakteri populasyonlarında antibiyotik dirençlilik oranını arttırdığı belirlenmiştir. Nehirden izole edilen *Enterobacteriaceae* sp. (110) suşlarının %72'sinin, *Aeromonas* sp.(118) suşlarının ise %20'sinin nalidiksik aside karşı

dirençli olduğunu tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* sp. izolatlarının tetrasikline %24.3, beta-laktamlara %20.5 dirençli olduklarını, *Aeromonas* sp. izolatlarının ise tetrasikline %27.5, co-trimoksazole %26.6 dirençli oldukları belirlenmiştir.

Lityum ve kalay dirençlilik genlerinin plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkisini belirlemek amacıyla Li ile Sn dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, Li dirençli *S. aureus* suşunun lityum içeren ve içermeyen ortamda da plazmit bulundurmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu suşun lityum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Aktan [114], yapmış olduğu çalışmada Kızılırmak'tan MİK değeri  $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$  olan kurşuna dirençli *Enterococcus faecalis* suşunu tanımlamıştır. Kurşunun yanı sıra bu izolatın Al, Ba, Zn, Fe, Ag, Sn, Cr, Li, Ni, Sr ağır metallerine ve amikasin, aztreonam, gentamisin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Yapılan DNA çalışmaları sonucunda *E. faecalis* suşunun kurşun direnç genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Özer [116], Kızılırmak'daki ağır metaller üzerine yaptığı çalışmada MİK değeri  $8 \text{ mg L}^{-1}$  olan gümüşe dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları ile MİK değeri  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  olan stronsiyuma dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarını izole etmiştir. Aynı zamanda çoklu metal dirençlilik profillerine bakılmıştır. Ag dirençli suşlar Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine direnç gösterirken, Sr dirençli suşlar Al, Li, Ba, Ni metallerine direnç göstermiştir. Ag dirençli *P. putida* suşunun gümüş dirençlilik genlerinin plazmit DNA üzerinde olduğu, *K. pneumoniae* suşunun ise kromozomal DNA üzerinde olduğunu tespit edilmiştir. Sr dirençli *S. paucimobilis*, *P. fluorescens* suşlarının ise metal dirençliliği kromozomal DNA üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Kalay dirençliliği gösteren *P. agglomerans*'ın metal içeren ve metal içermeyen her iki ortamda da 118 kb büyüklüğünde mega bir plazmit içerdiği belirlenmiştir. Plazmiti elimine edilen *P. agglomerans*'ın kalay ve oxacilline dirençliliğinin kaybolmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kalay ve oxacilline dirençliliğinin *P. agglomerans* suşu için kromozomal DNA kökenli olduğu belirlenmiştir.

Metallere karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayat başladıktan hemen sonra gelişmiştir. Çünkü bakterilerin geliştiği ortamlarda metaller her zaman var olmuşlardır. Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü her iki tip dirençte organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmit kökenli olabilmektedir [1]. Antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin çoğunun karşılaştırması genellikle bir operonda kümelenmiş, birlikte transkripte olabilen, işlevsel olarak bağlantılı bir çok genlerle yapılmaktadır. Bunlar normalde metal bağlama, taşıma, çıkartma veya detoksifikasyon fonksiyonlarının belirlenmesinde olduğu gibi çok küçük bir düzenleyici gen içerirler. Karakterize edilmiş civa dirençlilik genlerinin çoğu (genelde mer genleri olarak adlandırılırlar) plazmit kökenlidir. Bununla birlikte, homolog kromozomal genlerin çoğunluğu gram-pozitif olan bazı bakterilerde bulunmuştur. Mer dirençlilik genlerinin bir çoğu transpozonlar üzerinde de tespit edilmiştir [113].

Çalışmamızda lityum dirençli *S. aureus* suşunun metal içeren ve metal içermeyen ortamlarda total protein profili incelenmiştir. Li içeren ortamda total protein ekspresyonunda 108, 91, 86, 53, 41, 36 kDa boyutlarındaki bantlar sırasıyla 25, 1.5, 1.8, 1.9, 2, 2.2 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde *S. aureus* suşunun lityum dirençliliğinde total proteinlerin aktif rol aldığı düşünülmektedir. Kalay dirençli *P. agglomerans* suşunun total ve dış membran protein profilleri incelenmiştir. Sn içeren ortamda total protein ekspresyonunda 122, 92, 68, 50, 36, 32, 28 kDa boyutlarındaki bantlar sırasıyla 2.8, 1.4, 1.8, 2.1, 2.8, 1.1, 1.1 kat artış olduğu tespit edilmiştir. Dış membran proteinin Sn içeren ortamda 56,

43, 37, 30, 19 kDa boyutundaki protein bantlarının ekspresyonlarında sırasıyla 1.7, 1.2, 1.8, 2.9, 2 kat artış olduğu belirlenmiştir. Ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmalar bu toksik kirleticilere bazı proteinlerinin ekspresyonunu artırarak ya da bazı proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak cevap vermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda *P. agglomerans* suşunun kalay dirençliliğinde her iki proteinin de etkin rol aldığı düşünülmektedir.

Turalı [115], 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.

Aktan [114], Kızılırmak'dan izole ettiği kurşun dirençli *Enterococcus faecalis* suşunun total protein analiz sonuçları kurşun varlığında bazı proteinlerin ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir.

Özer [116], yapmış olduğu çalışmada gümüşe 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 gümüş ve stronsiyumun total ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunda bir artış göstermiştir. Plazmit eliminasyon çalışmaları yapılarak dış membran ve total proteinlerinin ekspresyonlarında bir azalış olduğu tespit edilmiştir.

Laplace ve arkadaşları [117] Cd'nin bulunduğu ortamda *E. faecalis* kültürlerinin çeşitli proteinlerinin sentezinde artış olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis*'in *csrA* geninin moleküler klonlama ve karakterizasyonu Cd eklendikten sonra yapılmıştır. Buna ek olarak, düşük Cd konsantrasyonunun bile *csrA* ekspresyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca *E. faecalis* izolatlarındaki *csrA* gen ifadesinin Cu, Cd, Hg, Mn ve Pb ağır metallerinin bulunduğu toksik stres ortamında indüklenebilir gen potansiyeline sahip olduğunu da belirlemişlerdir.

Metal direnç yollarında stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini arttırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir [118].

Bu tez çalışması ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen lityum ve kalay dirençli suşlar biyokimyasal ve genetiksel özellikleri bakımından incelenmiştir. Biyokimyasal özellikleri esas alınarak lityum ve kalay 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. Literatürde Kırıkkale-Kızılırmak'tan metal dirençli bakterilerin izole edilmesi ile ilgili sınırlı sayıda kaynak mevcuttur [114-116]. Bu bakımdan yapılan bu çalışma konuda suyla ilgili literatürdeki eksikliğin giderilmesine yönelik katkıda bulunulduğu düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Sevgi E., Ağır Metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [2] Güler Ç., Çobanoğlu Z., Su Kirliliği. 11-12. Aydoğdu Ofset, Ankara, 1994.
- [3] Jiries, A., Vehicular Contamination of Dust in Amman, Jordon. The Environmentalist. 23: 205-10, 2003.
- [4] Çavuşoğlu, K., Gündoğan Y., Çakır Arıca Ş., Kırındı T., *Mytilus* sp. (midye), *Gammarus* sp. (nehir tırnağı) ve *Cladophora* sp. (yeşil alg) Örnekleri Kullanılarak Kızılırmak Nehrindeki Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması. BAÜ FBE Dergisi. 9(1): 52-60, 2007.
- [5] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme., F.W., Microbial ,Resistance to Metals in the Enviroment. Ecotoxicology and Enviromental Safety. 45: 198-207, 2000.
- [6] Nies, D.H., Efflux-Mediated Heavy Metal Resistance in Prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews. 27: 313-339, 2003.
- [7] Koçberber Kılıç N., Dönmez G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. 6(2): 27-33, 2008.
- [8] Jianlong, W., Biosorption of Copper(II) by Chemically Modified Biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry. 37: 847-850, 2002.
- [9] Gupta, V.K., Rastogi, A., Saini, V.K., Jain, N., Biosorption of Copper(II) from Aqueous Solutions by *Spirogyra* species. Journal of Colloid and Interface Science. 296(1): 59-63, 2006.

- [10] Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., Egwurugwu, J.N., Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects, *International Journal of Physical Sciences*, 2(5): 112-118, 2007.
- [11] Evangelou, V.P., *Environmental Soil and Water Chemistry, Principles and Applications*. John Wiley&Sons, Including, 1998.
- [12] Adedeji O.B., Adeyemo O.K., Oyedele M.O., Heavy Metals in Snail and Water Samples From Alaro River in Oluyole Industrial Area of Ibadan Southwestern Nigeria. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation Research*. 6(2): 115-121, 2011.
- [13] Taylan Z.S., Böke Özkoç H., Potansiyel Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesinde Akuatik Organizmaların Biokullanılabilirliği. *BAÜ FBE Dergisi*. 9(2): 17-33, 2007.
- [14] Rainbow, P.S., Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 183-192, 1995.
- [15] Gündüz, T., Çevre Sorunları. 1. baskı, A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara. s: 131-148, 1994.
- [16] Nies, D.H., Microbial Heavy-Metal Resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology Mini-Review*. 51: 730-750, 1999.
- [17] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., Microbial Resistance to Metals in the Enviroment. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. 45: 198-207, 2000.
- [18] Çalışkan, E., Asi Nehri'nde Su, Sediment ve Karabalık (*Clarias Gariepinus* Burchell, 1822)'ta Ağır Metal Birikiminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 2005.

- [19] Rai, P.K., Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation Using Wetland Plants: An Ecosustainable Approach. *International Journal of Phytoremediation*. 10: 133–160, 2008.
- [20] Lobban, C.S., Harrison, P.J., *Saeweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. 366p, 1997.
- [21] Matyar, F., Kaya, A., Dinçer, S., Antibacterial Agents and Heavy Metal Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated From Seawater, Shrimp and Sediment in Iskenderun Bay, Turkey. 407: 279–285, 2008.
- [22] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Çeviri: Çökmüş C., *Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
- [23] Zeng, X., Tang, J., Yin, H., Liu, X., Jiang, P., Liu, H., Isolation, Identification and Cadmium Adsorption of a High Cadmium-Resistant *Paecilomyces lilacinus*. Pp: 6525-6533, 2010.
- [24] Suranjana (Arora) Ray and Manas Kanti Ray, Bioremediation of Heavy Metal Toxicity-With Special Reference to Chromium. *Al Ameen Journal of Medical Sciences Review*. 2(2): 57-63, 2009.
- [25] Gürbüz, M., G., Bakır(II) Ve Nikel(II) İyonlarının *Enteomorpha Prolifera*'ya Biyosopsiyonunda Denge, Kinetik ve Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2006.
- [26] Wackett, L.P., Dodge, A.G., Ellis L.B.M., Microbial Genomics and the Periodic Table. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 647–655, 2004.
- [27] McKay, G., *Use of Adsorbents for the Removal of Pollutants from Wastewaters*, CRC Press, USA, 1996.

- [28] Siegel, F.R., Environmental Geochemistry of Potential Toxic Metals. Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2002.
- [29] Gültekin, A.H., Nadir Metal Yatakları Jeolojisi, LT.Ü. Maden Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği. Sayı:52, 1998.
- [30] [http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden\\_kullanim](http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanim) (Erişim Tarihi: 06. 04. 2012)
- [31] Filiz, E., Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Adsorbanlarla Sulardan Ağır Metal Giderimi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.
- [32] [http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden\\_kullanim#kalay](http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanim#kalay) (Erişim Tarihi: 06. 04. 2012)
- [33] Sağ, Y., Kaya, A., Ağır Metal İyonlarının *R. arrhizus*'a Çok Bileşenli Biyosorpsiyonunun İncelenmesi. Tübitak Ydabçag-525, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara. 1-14, 1999.
- [34] Yılmaz, P., Sulu Ortamlardan Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Yoluyla Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara. 1-17, 2006.
- [35] Akçelik, Ö., Ağır Metallerin *Saccharomyces cerevisiae* Mikroorganizmasıyla Biyosorpsiyonunun Ortam Koşullarına Bağlı Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [36] Nataraj S.K., Sridhar S., Shaikha I.N., Reddy D.S., Aminabhavi T.M., Membrane-Based Microfiltration/Electrodialysis Hybrid Process for the Treatment of Paper Industry Waste Water. Separation and Purification Technology. 57: 185-195, 2007.

- [37] Gupta R., Mahapatra H., Microbial Biomass: An Economical Alternative for Removal of Heavy Metals from Waste Water. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41: 945-966, 2003.
- [38] Volesky, B., Detoksification of Metal-Bearing Effluents: Biosorption for the Next Century. *Hydrometallurgy*. 59: 203-216, 2001.
- [39] Chatterjee, S., Chattopadhyay, P., Roy, S., Sen, S.K., Bioremediation: A Tool for Cleaning Polluted Environments. *Journal of Applied Biosciences Review*. 11: 594-601, 2008.
- [40] Kavamura, V.N., Esposito, E., Biotechnological Strategies Applied to the Decontamination of Soils Polluted with Heavy Metals. *Biotechnology Advances Research Review*. 28: 61-69, 2010.
- [41] Gavrilesco, M., Removal of Heavy Metals from Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 4(3): 219-232, 2004.
- [42] Sağlam, N., Cihangir, N., Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*. 11: 157-161, 1995.
- [43] Jagadevan S., Mukherji S., Successful In-Situ Oil Bioremediation Programmes- Key Parameters. *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 495-501, 2004.
- [44] Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Woiciechowski A.L., Thomaz-Soccol V., Correia C.T., Pandey A., Bioremediation-An Important Alternative for Soil and Industrial Wastes Clean-Up. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41 (9): 1030-1045, 2003.

- [45] İlhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kilicarslan, S., Ozdag, H., Removal of Chromium, Lead and Copper Ions From Industrial Waste Waters by *Staphylococcus saprophyticus*. Turkish Electronic Journal of Biotechnology. 2: 50-57, 2004.
- [46] Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y., Aksu, Z., Bioaccumulation of Cu(II), Pb(II) and Cr(VI) by Growing *Aspergillus Niger*. Process Biochemistry. 38: 1647-1651, 2003.
- [47] Nakiboğlu, T., Deri Endüstrisi Atıksularından Kromun Çeşitli Alglerle Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
- [48] Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y., Güzel, F., Removal of Copper, Nickel, Cobalt and Manganese from Aqueous Solution by Kaolinite. Water Research. 37 (4): 948-952, 2003.
- [49] Acosta, M.P., Valdman, E., Leite, S.G.F., Battaglini, F., Ruzal, S.M., Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and Their Exopolysaccharide. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21: 1157-1163, 2005.
- [50] Horan, N. J., Biological Wastewater Treatment Systems, Theory and Operation. John Wiley & Sons, Chichester: England, 1990.
- [51] Demirtürk, N., Demirdal, T., Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Kocatepe Tıp Dergisi. 5: 17-21, 2004.
- [52] Austin- Baker, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance. Trends in Microbiology. 14(4): 176-182, 2006.

- [53] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Genetik Kavramlar. 8. Baskı, Çeviri Ed. Öner, C., Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
- [54] Balcı R.S., Seyhan Baraj Gölünün Bakteriyojik Kirlilik Düzeyinin Belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik Dirençliliği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [55] Rajbanshi A., Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant. *Our Nature*. 6: 52-57, 2008.
- [56] Zarakolu, P., Mikroorganizmalarda Direnç Mekanizması Olarak Aktif Pompa Sistemleri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, 2003.
- [57] Webber, M.A., Piddock, L.J.V., The Importance of Efflux Pumps in Bacterial Antibiotic Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 9-11, 2003.
- [58] Silver, S., Misra, T.K., Bacterial Transformation of and Resistances to Heavymetal. *Basic Life Sciences*. 28: 23-46, 1984.
- [59] Ji, G., and Silver, S., Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concer. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 61-168, 1995.
- [60] Nies, D.H., Silver, S., Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistances. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 186-199, 1990.
- [61] Archer G.L., Niemeyer D.M., Origin and Evolution of DNA Associated with Resistance to Methicillin in Staphylococci. *Trends Microbiology*. 2: 343-347, 1994.
- [62] Choudhury, R., and Srivastava, S., Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria, <http://www.ias.ac.in/currsci/oct102001/768.pdf>, 2007.

- [63] Tunner, J.S., Robinson, N.J., Cyanobacterial Metallothioneins: Biochemistry and Molecular Genetics. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 119-125, 1995.
- [64] Trevors, J.T., Stratton, G.W., Gadd, G.M., Cadmium Transport, Resistance and Toxicity in Bacteria, Algae, and Fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 32(6): 447-464, 1986.
- [65] Mergeay, M., Towards an Understanding of the Genetics of Bacterial Resistance. *Trends Biotechnology*. 9: 17-24, 1991.
- [66] Deng, X., Li, Q.B., Lu, Y.H., Sun, D.H., Huang, Y.L., Chen, X.R., Bioaccumulation of Nickel from Aqueous Solutions Bygenetically Engineered *Escherichia coli*. *Water Research*. 37: 2505–2511, 2003.
- [67] Lemire, J., Auger, C., Bignucolo, A., Appanna, V.P., Appanna, V.D., Metabolics Strategies Deployed by *Pseudomonas fluorescens* to Combat Metal Pollutants: Biotechnological Prospects. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Formatex, Current Research. 177-187, 2010.
- [68] Silver, S., Genes for all Metals – A Bacterial View of the Periodic Table the 1996 Thom Award Lecture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 20(1): 1-12, 1998.
- [69] Brown, T.,A., Çeviri Coral, G., Ünalđı Coral, N., Gen Klonlama, s.s. 322, 2005.
- [70] Mills, S., Mc Auliffe, O.E., Coffey, A. Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Plasmids of Lactococci-Genetic Accessories or Genetic Necessities?. *FEMS Microbiology. Review*. 30(2): 243-273, 2006.



- [71] Dmowski, M., Sitkiewicz, I., Ceglowski, P., Characterization of a Novel Partition System Encoded by the c and d Genes from the Streptococcal Plasmid pSM19035. *Journal of Bacteriology*. 188 (12): 4362-4372, 2006.
- [72] Silver, S., Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid*. 27 (1): 1-3, 1992.
- [73] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J., Hobman, J.L., Wilson, J.R., Mercury Transport and Resistance. *Biochemical Society*. 30: 715-718, 2002.
- [74] Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L., Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 104-126, 2000.
- [75] Yang, X., Jin, X., Feng, Y., Islam, E., Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance in Plants. *Journal of Integrative Biology*. 47, 1025-1035, 2005.
- [76] Sadhukhan, P.C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K., Mandal, A., Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. *Environmental Pollution*. 97(1-2): 71-78, 1997.
- [77] Martinez J.L., Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants. *Environmental Pollution*. 157: 2893–2902, 2009.
- [78] Yılmaz, M., <http://www.cevreorman.gov.tr/sulak/sulakalan/kizilirmak.htm>, (Erişim Tarihi: 04.03.2011).
- [79] <http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C4%B1z%C4%B1l%C4%B1rmak>, (Erişim Tarihi: 22.06.2012)

- [80] Birnboim, H.C., Doly, J., A rapid alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523, 1979.
- [81] Cutting, S.M., and Horn, P.B., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus*. 27-74, UK, 1990.
- [82] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. 545, 1982.
- [83] 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.
- [84] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total Soluble Protein and Membrane Lipopolysaccharide Profiles in Differentiating *Rhizobium* Isolates, *Microbios*. 86: 143-156, 1996.
- [85] 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(1): 315-335, 1983.
- [86] Laemli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-684, 1970.
- [87] Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, 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.
- [88] Mukhallad A.M., Malcolm P.S., The Distribution of Heavy-Chain Isoforms of Myosin in Airways Smooth Muscle from Adult and Neonate Humans. *Biochemical Journal*. 260: 421-426, 1989.

- [89] Daniel P.K.M., Marshall W.S., John R.P., Conrad W., Lithium and Lithium Compounds. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 15: 434-462, 2004.
- [90] M.Sailer, "Lithium Takes Charge", Industrial Minerals. s. 37, 2000.
- [91] Büyükburç, A., Lityum: Gelecekte Önemi Artacak Mı?. Eti Holding AR- GE Daire Başkanlığı, Haziran 2003.
- [92] Samsunlu, A., Çevre Mühendisliği Kimyası, Sam-Çevre Teknolojileri Yayınları, 4. Baskı, İstanbul, 373, 1999.
- [93] Abdelatey, L.M., Khalil W.K.B., Ali, T.H., Mahrous, K.F., Heavy Metal Resistance and Gene Expression Analysis of Metal Resistance Genes in Gram Positive and Gram-Negative Bacteria Present in Egyptian Soils. Research, Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation. 6(2): 201-211, 2011.
- [94] Köse Akıner, E.G., Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin ve Vankomisin Dirençliliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [95] Shukla, P., Srivastava, S., Srivastava, R., Rawat, A. K., Sequencing of 16S rRNA Gene for Identification of *Staphylococcus* Species in Water Sample. Research. 5(29): 5142-5146, 2011.
- [96] Baker, J., Sengupta, M., Jayaswal, R.K., Morrissey, J.A., The *Staphylococcus aureus* CsoR Regulates Both Chromosomal and Plasmid-Encoded Copper Resistance Mechanisms. Environmental Microbiology. 13(9): 2495-2507, 2011.
- [97] Nies D.H., Microbial Heavy-Metal Resistance. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 730-750, 1999.

- [98] Duydu, Y., Organokalay Bileşiklerinin Yarattıkları Önemli Çevre Sorunları. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. 22: 1-2, 1993.
- [99] Heinz Rüdél, Special Issue on Methodologies for Assessing Exposures to Metals: Speciation, Bioaccessibility and Bioavailability in the Environment, Food and Feed. Ecotoxicology and Environmental Safety. 56(1): 180-189, 2003.
- [100] Adıyaman Koltuksuz, T., Tarımda Biyolojik Savaşımında Kullanılabilecek Biyopreparat Formulasyonlarının Büyük Ölçekte Üretilmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2007.
- [101] Bulten and Meinema, E.J., Bulten, H.A., Meinema Tin E. Merian (Ed.), Metals and their Compounds in the Environment. Wiley-VCH, Weinheim. pp. 1243-1259, 1991.
- [102] Jeong, B.G., Hong, S.W., Choi, Y.S., Kumaran, R.S., Kim, M., Kim, S., Kim, H.J., Isolation of Tributyltin Chloride Resistance Bacteria and Rapid Electrochemical Determination of Bacterial Organotin Degradation Activity. Korean Chemical Society. 32(1): 356-358, 2011.
- [103] Karbassi, A.R., Monavari, S.M., Nabi Bidhendi, G.R., Nouri, J., Nematpour, K., Metal Pollution Assessment of Sediment and Water in the Shur River. Environmental Monitoring and Assessment. 147 (1-3): 107-116, 2008.
- [104] Reza, R., Singh, G., Heavy Metal Contamination and its Indexing Approach for River Water. International Journal of Environmental Science and Technology. 7(4): 785-792, 2010.
- [105] Kalay, M., Koyuncu, C.E., Dönmez, A.E., Comparison of Cd Levels in the Muscle and Liver Tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* Caught from the Mersin Gulf. (In Turkish) Ekoloji Dergisi. 13(52): 23-27, 2004.

- [106] Yazkan, M., Özdemir, F., Gölükçü, M., Cu, Zn, Pb and Cd Contents in Some *Molluscs* and *Crustacea* Caught in the Gulf of Antalya (In Turkish). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 28: 95-100, 2004.
- [107] Rether, A., Entwicklung und Charakterisierung Wasserlöslicher Benzoyl Thioharnstoff Funktionalisierter Polymere Zur Selektiven Abtrennung Von Schwermetallionen Aus Abwässern Und Prozesslösungen, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, Almanya, 2002.
- [108] Narasimhulu, K., Rao, P. S., Vinod, A. V., Isolation and Identification of Bacterial Strains and Study of their Resistance to Heavy Metals and Antibiotics Journal of Microbial & Biochemical Technology. 2: 074-076, 2010.
- [109] Farkas, A., Erratico, C., Vigano, L., Assessment of the Environmental Significance of Heavy Metal Pollution in Surficial Sediments of the River Po. Environmental Sciences. 68(4): 761-768, 2007.
- [110] Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y., Eraslan, B., *Aeromonas* and *Pseudomonas*: Antibiotic and Heavy Metal Resistance Species from Iskenderun Bay, Turkey. Environmental Monitoring and Assessment, 167: 309-320, 2010.
- [111] Thimm, T., Hoffman, A., Fritz, I., Tebbe, C.C., Contribution of the Earthworm *Lumbricus rubellus* (Annelida, Oligochaeta) to the Establishment of Plasmids in Soil Bacterial Communities. Microbial Ecology. 41 (4): 341-351, 2001.
- [112] Goñi-Urriza, M., Captepuay, M., Aprin, C., Raymond, N., Caumette, P., Quentin, C., Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Applied and Environmental Microbiology. 66(1): 125-132, 2000.

- [113] Wiener, P., Müller-Graf, C., Barcus, V., Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research. *Reviews in Undergraduate Research*. 2: 1-6, 2003.
- [114] Aktan, Y., Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [115] Turalı, G., Bakır ve Kroma Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012.
- [116] Özer, G., Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2011.
- [117] Laplace, J.M., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y., Cloning, Characterization and Expression of an *Enterococcus faecalis* Gene Responsive to Heavy Metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 685-689, 2000.
- [118] Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., Gade, W.N., Role of Proteins in Resistance Mechanism of *Pseudomonas fluorescens* Against HeavyMetal Induced Stress with Proteomics. *Approach Journal of Biotechnology*. 126: 374-382, 2006.
- [119] Ünver, S., Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Çalışan Hemşirelerde Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı ve Aile İçi Bulaşa Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2008.
- [120] Çakmakçı, R., Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 36(1): 97-107, 2005.