

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURŞUNA DİRENÇLİ ÇEVRE İZOLATI OLAN  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS*'İN BİYOKİMYASAL VE  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YASİN AKTAN

NİSAN 2012

**Biyoloji Anabilim Dalında** Yasin AKTAN tarafından hazırlanan Kurşuna Dirençli Çevre İzolatı Olan *Enterococcus faecalis*'in Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Ortak Danışman

Doç. Dr. Sema TAN

Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

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

Üye : Prof. Dr. İlhami TÜZÜN \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Mustafa TÜRK \_\_\_\_\_

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

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### KURŞUNA DİRENÇLİ ÇEVRE İZOLATI OLAN *Enterococcus faecalis*'in BIYOKİMYASAL ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

AKTAN, Yasin

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sema TAN

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Nisan 2012, 94 sayfa

Mikroorganizmalar toksik metallere dayanabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Ancak literatürde kurşuna dirençli mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale il sınırları içinden geçen Kızılırmak'tan kurşuna dirençli bakterilerin izole edilmesi ve tanımlanmasıdır. Kurşuna direnç gösteren 33 izolattan minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri  $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$  olan bir izolat seçilmiş, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu sonucu *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. Kurşunun yanı sıra bu izolata alüminyum, baryum, çinko, demir, gümüş, kalay, krom, lityum, nikel, stronsiyum gibi ağır metallere, amikasin, aztreonam ve gentamisin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Yapılan DNA çalışmaları sonucunda *Enterococcus faecalis* suşunun kurşun direnç genlerinin plazmid yerine kromozomal DNA üzerinde olduğu bulunmuştur. Total protein izolasyonu ile bu proteinlerin *Enterococcus faecalis* suşunun kurşun direnç mekanizmasında işlevsel olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kurşuna dirençli bakteri, moleküler karakterizasyon, ağır metal dirençliliği, biyokimyasal karakterizasyon

## ABSTRACT

BIOCHEMICAL and MOLECULAR CHARACTERIZATION

of LEAD-RESISTANT ENVIROMENTAL

ISOLATES of *Enterococcus faecalis*

AKTAN, Yasin

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Sema TAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Bülent İÇGEN

April 2012, 94 Pages

Microorganisms have developed mechanisms of coping with a variety of toxic metals; however, few studies have explored microbial resistance to lead. The aim of present study is to isolate and identify lead-resistant bacteria from the river Kızılırmak along the city Kırıkkale, Turkey. Of thirty-three isolates, one lead-resistant isolate with a minimal inhibitory concentration of 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was isolated and identified as *Enterococcus faecalis* by using biochemical tests and molecular characterization. The isolate was shown to be resistant to other heavy metals like aluminum, barium, zinc, iron, silver, tin, chromium, lithium, nickel, strontium and resistance to the antibiotics amikacin, aztreonam, gentamycin. The lead resistance genes of *Enterococcus faecalis* were found out to be located on the chromosomal DNA rather than the plasmid. Total protein isolation results revealed the importance of these proteins in lead of *Enterococcus faecalis*.

**Key Words:** Lead-resistant bacteria, molecular chracterization, heavy metal resistance, biochemical characterization

## TEŞEKKÜR

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

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

Laboratuvar çalışmalarımnda destek olan çalışma arkadaşlarımdan doktora öğrencisi Fadime YILMAZ'a ve yüksek lisans öğrencisi Gamze TURALI'ya Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve çalışmalarım boyunca emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi beni her konuda destekleyen, sabır gösteren ve her zaman yanımda olan babam Turgut AKTAN'a, annem Ayşe AKTAN'a ve ablam Yasemin AKTAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kaynak özetleri.....	5
1.1.1. Ağır Metaller Nedir.....	9
1.1.2. Ağır Metallerin Özellikleri.....	10
1.1.3. Ağır Metal Atığının Kaynakları.....	12
1.1.4. Ağır Metallerin Çevre Üzerindeki Etkileri.....	16
1.1.4.1. Kurşunun Çevre Üzerindeki Etkileri.....	16
1.1.5. Ağır Metallerin Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	17
1.1.5.1. Kurşunun Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	19
1.1.6. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	19
1.1.6.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	19
1.1.6.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	20
1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	21
1.1.7.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	27
1.1.7.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı.....	29
1.1.7.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması.....	29
1.1.7.4. Ekstrasellüler Alıkonma.....	30
1.1.7.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu.....	31
1.1.8. Çalışmanın Amacı.....	32

<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	34
2.1. Materyal.....	34
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	34
2.1.1.1. Nutrient Agar.....	34
2.1.1.2. Nutrient Broth.....	34
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	34
2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	34
2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	35
2.1.2.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	35
2.1.2.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA).....	35
2.1.2.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS).....	35
2.1.2.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asit).....	35
2.1.2.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	35
2.1.2.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	35
2.1.2.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	35
2.1.2.2.2.2. %10 SDS Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	36
2.1.2.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M).....	36
2.1.2.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu.....	36
2.1.2.2.2.8. İzopropanol Alkol.....	37
2.1.2.2.2.9. %70'lik etanol.....	37
2.1.2.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....	37
2.1.2.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....	37
2.1.2.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	37
2.1.2.2.3.1. Fosfat Tamponu: ( $KH_2PO_4, K_2HPO_4$ ).....	37
2.1.2.2.4. SDS-PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	38
2.1.2.2.5. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	38
2.1.2.2.5.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik).....	39
2.1.2.2.5.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük).....	39

2.1.2.2.6. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Çalışma Alanı.....	40
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	42
2.2.3. Kurşuna Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....	42
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	42
2.2.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	42
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	43
2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği.....	43
2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	44
2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....	44
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	45
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	45
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması.....	46
2.2.13. Plazmit DNA Moleküler Ağırlık Belirlenmesi.....	46
2.2.14. Total Protein İzolasyonu.....	46
2.2.15. Total Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	47
2.2.16. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	47
2.2.16.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	47
2.2.16.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	47
2.2.16.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi.....	48
2.2.16.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması.....	48
2.2.16.5. Protein Bantlarının Yoğunluk (Intensity) Ölçümü.....	48
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>49</b>
3.1. Kurşuna Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	49
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	49
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	51
3.4. Kurşun Dirençli Bakterinin Büyüme Eğrisi.....	51
3.5. Kurşun Dirençli Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri.....	52
3.6. Kurşuna Dirençli Bakterinin Total Proteinini Analizi.....	54
<b>4. TARTIŞMA SONUÇ.....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bakterilerde ağır metallerin toksik etkileri.....	18
1.2. Bakterilerdeki Olası Ağır Metal Direnç Mekanizmaları.....	27
2.1. Kızılırmak'ın Lokasyonu.....	40
3.1. <i>E. faecalis</i> suşunun; Pb içeren ve içermeyen ortamdaki üreme eğrisi.....	52
3.2. <i>E. faecalis</i> suşunun plazmid ve kromozomal DNA lokasyonu.....	53
3.3. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	54
3.4. <i>E. faecalis</i> suşunun total protein profili.....	55
3.5. Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları.....	15
1.2. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri.....	26
2.1. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı.....	38
2.2. SDS-PAGE çalışma solüsyonları.....	38
2.3. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	39
2.4. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	39
2.5. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	41
3.1. Kurşuna dirençli suşların bölgelere göre dağılımı.....	49
3.2. Kurşuna dirençli suşun (Pb06) biyokimyasal özellikleri.....	50
3.3. Kurşuna dirençli suşun metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri.....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cr	Krom
Fe	Demir
Hg	Civa
Li	Lityum
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Sb	Antimon
Sn	Kalay
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Kurşun Nitrat

### KISALTMALAR DİZİNİ

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

## 1. GİRİŞ

Çağımızda doğal dengeyi, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerin başında çevre sorunları gelmektedir. Hızla artan dünya nüfusunun beslenmesi, gelişen endüstrilerin ve daha uygar yaşama düzeyi sağlama amacı ile sürdürülen çabaların istenilmeyen bir sonucu olarak ortaya çıkan bu konu, günümüzde de giderek artan boyutlarda önemini korumaktadır. Çevre kirliliği insanoğlunun var oluşuyla ortaya çıkmış, kentsel büyüme ve endüstriyel gelişmeye paralel olarak da artmıştır. Sonuçta ekosistemin büyük bir bölümünü oluşturan sucul sistem, eninde sonunda atıklar için alıcı ortam olarak kullanılmıştır. Doğal dengeyi bozan bu kirleticiler; organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol ve türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktif maddeler, pestisidler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddeler ve atık ısı olarak gruplandırılabilirler. Bu gruplandırmaya göre ağır metaller, endüstriyel atıklar içinde yer alıp ekosistemi tehdit etmektedir [1-3]. Bunlar her geçen gün büyük miktarlarda doğal ve endüstriyel kaynaklardan, evsel atıklardan, zirai kaynaklardan ve atmosferik kirleticilerden çevreye yayılmakta ve değişik yollarla nehir, göl ve denizlere ulaşmaktadırlar. Sucul ortama giren bu maddeler burada yaşayan gerek hayvansal, gerekse de bitkisel canlılar üzerinde birçok olumsuzluğa sebep olmaktadır [4, 5].

Çeşitli endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan atık suların içinde bazen eser miktarlarda, bazen de yüksek konsantrasyonlarda metaller bulunabilir [6]. Bugün sanayide 40'dan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir [7]. Sulardaki ağır metal kirliliğinin sebeplerinin başında madencilik endüstrisi gelmektedir. Maden cevherlerinden metallerin ayrıştırılması sırasında meydana gelen atıklar, çoğu kez maruz kaldıkları işlemlerle aktifleşerek birer kirlilik kaynağı haline gelmektedir [8]. Bu metal grupları atmosferik etkilerle çözünerek, yeryüzü ve yeraltı sularına geçmekte ve organizmalarda birikerek canlı hayatını tehdit etmektedir [9, 10].

Normal koşullarda ağır metallerin doğadaki düzeyi dūřüktür [11]. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton kadmiyum (Cd), 18800 ton arsenik (As), 3600 ton civa (Hg), 332000 ton kurşun (Pb) atmosfere atılmakta iken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selenyum (Se) (19 kat), Cd (8 kat), Hg, Pb, kalay (Sn) (6 kat), As, nikel (Ni) ve krom (Cr) (3 kat) daha fazladır [12, 13].

Ağır metal kirliliğinin büyük bir yüzdesini Pb ve Hg metal kontaminasyonunun oluşturduğu söylenebilir. Pb ve bileşikleri boru, oluk, tabak, para, boya üretimi ve kozmetik gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [14, 15]. Özellikle Pb'li benzin kullanımı ile çevresel Pb kontaminasyonu artmaktadır. Pb biyolojik olarak parçalanmaz, nontoksik forma çevrilemez. Yerkabuğundan çıkarılan 300 milyon ton Pb'nin yarısı çevreyi kontamine etmiş durumdadır ve günümüzde yıllık Pb üretimi 3.4 milyon tondur ve vücuttaki toplam Pb yükü endüstri öncesi dönemin maksimum 1000 mislidir. Yüksek miktarda ve tekrarlanan Pb kontaminasyonu ağızda metalik tat, mide ağrısı, kusma, sinir sistemi hasarı ve ölüme kadar uzanan sonuçlar doğurabilir. Önemli bir enzim inhibitörü olan Pb, özellikle Se ve sülfür (S<sup>2-</sup>) içeren enzimlerde denatürasyona ve aktivite kaybına neden olmaktadır [16-18].

Doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerin kullanımı ile insanlar bütün organizmaların seçici çevresini değiştirmiştir. Bu, özellikle bakteriler gibi çok kısa üreme zamanlarına sahip organizmalar üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Ağır metallerin ve bazı organik bileşiklerin yaygın üretimi ve kullanımı; çeşitli organik bileşikleri parçalayabilme yeteneği ile ağır metallere karşı direnç içeren belirli genotipler için seçici olan bakteriyel çevreyi değiştirmiştir [19].

Mikroorganizmalardaki metal dirençlilik mekanizmaları; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışında bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücresel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir [20, 21]. Son

zamanlarda çevresel kontaminantların ortamdan uzaklaştırılması amacıyla mikroorganizmaların biyodegradatif özelliklerinden yararlanılmaktadır [22].

Bu çalışmanın amacı; Kırıkkale-Kızılırmak'tan Pb dirençli bakterileri izole ederek, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu yapmaktır.

Kırıkkale, İç Anadolu Bölgesi'nin Orta Kızılırmak Bölümü'nde yer almaktadır [23]. Kırıkkale'de kurulan ilk sanayi kuruluşu 1929'da faaliyete geçen silah sanayisidir. Daha sonra silah fabrikalarının sayısı artmış, barut, silah, prinç ve çelik fabrikaları, 1987 yılında da petrol rafinerisi kurulmuştur [24]. Günümüzde 200.000'i aşan nüfusu ile Türkiye'nin en önemli askeri ve stratejik sanayi tesislerinden silah fabrikaları ile petrol rafinerisi gibi ülkesel ölçekte sanayi yatırımlarının konumlandığı Kırıkkale kentinin gelişimi, 1925 yılında İmalât-ı Harbiye (Silah Sanayi) fabrikalarının kurulması ile başlamıştır. Ancak, tarımsal nitelikli bir kırsal yerleşme alanında, merkezi yönetim kararlarıyla ivme kazandırılan sanayileşme sürecinin getirdiği hızlı büyüme ve kentleşme taleplerinin, kentsel mekân organizasyonları üzerindeki yansımaları, plânsız kentsel gelişme, artan yapı yoğunlukları ve tüketilen çevresel değerler biçiminde olmuştur [25]. Bilindiği gibi sanayileşmenin gelişmekte ve nüfusun hızla artmakta olduğu bölgelerde; çevre sorunları gündeme gelmekte, nehirlere, göllere ve denizlere arıtılmadan akıtılan bol miktardaki ev ve sanayi atıkları, çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmaktadır [26].

Kızılırmak Nehri, Türkiye sınırlarından doğan, Kırıkkale'nin 3-4 km kadar batısından geçen ve tekrar Türkiye sınırları içerisine dökülen en uzun nehirdir, İç Anadolu'nun en doğusunda bulunan Sivas ilinden başlayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e dökülür [27, 28]. Kızılırmak, havzasındaki insan aktiviteleri nedeniyle yüksek miktarda besin elementleri, iz metaller ve diğer bileşiklerin yüklerini taşımaktadır [29]. Ülkemizin en verimli deltalarından olan Kızılırmak Deltası'nda tarımda verimliliği arttırmak için gübre ve ilaç kullanımlarının son derece bilinçsiz olduğu, yeterince bilgi desteği alamadıkları, kendi bilgileri veya kimyasal gübre-ilaç bayilerinin yönlendirmeleri ile hareket ettikleri gözlenmektedir [30].

Kızılırmak ile ilgili olarak literatürde benzer nitelikte yeterince çalışma mevcut değildir. Özer [31] yaptığı yüksek lisans çalışmasında Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen gümüş (Ag) ve stronsiyum (Sr) dirençli bakterilerin biyokimyasal ve genetiksel karakterizasyonunu çalışmıştır. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri ( $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) gösteren Ag'ye dirençli iki bakteri izole etmiş, biyokimyasal testlerine göre *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlamıştır. Her iki suşun da alüminyum (Al), lityum (Li), Sn, Ni ve Sr metallerine dirençli olduğunu belirlemiştir. En yüksek MİK değeri ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) gösteren Sr dirençli iki bakteri izole etmiş, biyokimyasal testlerini dikkate alarak *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır. Her iki suşun da Al, Li, baryum (Ba) ve Ni metallerine dirençli olduğunu saptamıştır. Dolayısıyla yapılan bu çalışma Türkiye için önemli bir nehir olan Kızılırmak ile ilgili literatürdeki eksikliğin giderilmesine katkıda bulunacaktır.

Doğal uyum teorisi [32] göz önüne alındığında, ağır metal toleransına sahip mikroorganizmaları içeren endüstriyel drenaj örnekleri, Kırıkkale sınırlarından geçen Kızılırmak'tan toplanmıştır. Bu amaçla, 12 istasyon belirlenmiştir. Belirlenen 12 istasyondan su örnekleri alınmış, elde edilen izolatların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik düzeylerine bakılmış, plazmit ve protein profilleri belirlenmiştir. Pb dirençli bakterilerde; dirençliliğin plazmit ile bağlantısının olup olmadığı araştırılmış, total protein profili çıkarılmıştır.

## 1.1. Kaynak Özetleri

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metal ve türevlerinin çevrede yaygın olarak bulunması endüstriyel faaliyetlerin doğal bir sonucudur [33]. Sanayi devriminden itibaren ağır metal üretiminin zirai, endüstriyel ve askeri uygulamalarla hızlı bir şekilde artması; özellikle endüstriyel toplumlarda önemli çevre problemlerinden birini ağır metallerin oluşturmaya neden olmuştur. Rafineri, kömür, doğal gaz üretimi, kâğıt ve klor-alkali endüstrileri gibi yüzlerce kaynak ağır metal kirliliğini oluşturmaktadır [34, 35]. Endüstri kuruluşları, ağır metal giderimi için genellikle kimyasal presipitasyon işlemini veya şelat maddelerini kullanmaktadırlar. Asit maden drenajı ve atık su arıtma tesislerinde, ağır metallerin giderimi için genellikle kireç veya peroksit ile pH nötralizasyonu, ters osmoz ve iyon değişimi yöntemleri uygulanmaktadır. Geniş araştırma ve tüm bu metal giderimi için harcanan mali kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda çoğunlukla tercih edilen yöntem, nötralizasyonu takip eden presipitasyon yöntemidir [36]. Genellikle, pH nötralizasyonunun başarılı olabilmesi için malzemelere gerekli reaktif yüzey alanı sağlamak amacıyla ince taneli olması gerekir [37]. Ayrıca, presipitasyon ile oluşan metal hidroksit çamur gibi ikincil atıkların giderilmesinin maliyeti oldukça yüksektir [38]. Bu geleneksel metotlar ile ortamda bulunan metaller tam olarak giderilemeyebilir. Bunun dışında bu tekniklerin; pahalı ekipman ve takip sistemleri gerektirmesi, fazla kimyasal ve enerji ihtiyacının olması, toksik çamur ve diğer atık ürünler oluşturmaya gibi dezavantajları da vardır [39, 40].

Yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı günümüzde metal iyonlarının sulu ortamlardan giderilmesi üzerine farklı teknolojiler geliştirmek önemlidir. Bu konuda geliştirilen yöntemlerden biri de biyosorpsiyon yöntemidir. Atıksulardan toksik ağır metallerin giderilmesinde mikrobiyal biyokütlelerin kullanılması, düşük maliyeti var olan metotlara alternatif oluşturmaktadır. Biyosorpsiyon teknolojisinin avantajları arasında atık sulardaki ağır metal konsantrasyonlarının çok düşük seviyelere indirilmesi, mikroorganizmanın bol miktarda ve kolayca üretilmesi sayılabilir. Bu biyosorbentler metal iyonlarının giderilmesinde yüksek seçiciliğe sahiptirler [41, 42]. Bu yöntem ile çok seyreltik sulardan bile



kirleticiler etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Biyosorpsiyon yönteminin diğer avantajları ise bu yöntemin yerinde uygulanabilen bir yöntem olması, çok özel dizaynlar ve endüstriyel işlemler gerektirmemesi ve birçok sistemle ekonomik bir şekilde birleştirilebilmesidir [43].

Özellikle mikroalgler, bakteri ve mantarların metal uzaklaştırma işlemi için kullanılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [44, 45]. Mikroorganizmalar ile ağır metal giderimi, fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha etkindir ve ağır metallerin gideriminin seçici olarak yapılmasına olanak sağlamaktadır [46].

Aşırı dozda ağır metal; insan, hayvan ve bitkiler için tehlikeli olabilir. Çoğu organizmanın, özellikle bakterilerin detoksifikasyon yetenekleri vardır. Yani mineralizasyon, dönüşüm ve/veya kirleticilerin immobilizasyonunu yapabilirler ve biyosferin sürdürülebilirliğinde, biyojeokimyasal çevrimlerde önemli rol oynamaktadırlar [47]. Doğal ve endüstriyel süreçler nedeniyle ağır metallerin giderek daha fazla oranda bulunmasından dolayı mikroorganizmalar, ağır metal varlığına tahammül için bu ağır metalleri anaerobik solunumda terminal elektron alıcısı olarak kullanma mekanizması geliştirmişlerdir. Şimdiye kadar Cu, Zn, As, Cr, Cd ve Ni gibi metaller için tolerans mekanizmaları tespit edilmiş ve detaylı olarak açıklanmıştır [48]. Yapılan çeşitli çalışmalar, ağır metallerin mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal faaliyetlere etkisinin olduğunu göstermektedir [49]. Uzun ve kısa vadeli stresin örneğin; yüksek sıcaklık, pH veya kimyasal kirlilik gibi etkenlerin suda yaşayan bakteri popülasyonlarının tür çeşitliliğinde ve plazmid insidansını etkilediğine dair çalışmalar yapılmıştır. Bazı mikrobiyal suşlar, direnç için genetik belirleyicilere sahiptir ki bu belirleyiciler, sıklıkla plazmidler üzerinde bulunur. Zehirli kimyasal atıkların olduğu bölgeden izole edilen bakteriler, temiz sulardan izole edilenlere göre daha sıklıkla plazmid DNA'sı içerirler ve antibiyotik dirençliliği gösterirler. Yapılan çalışmalarda, endüstriyel olarak kirli nehirlerde yaşayan *Pseudomonas*'da plazmid insidansının (%18), kirlilik olmayan bölgede yaşayan *Pseudomonas* spp. plazmid insidansına (%7) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur [50]. Çeşitli habitatlarda yapılan çalışmalarda metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmidler [51-54] ve konjugatif transpozonlar [55, 56] üzerinde kodlandığı gösterilmektedir.

Ağır metallere kontamine olmuş toprak ve sularda metabolik aktiviteleri ile ağır metalleri tolere edebilen özellikle *Pseudomonas* cinsine ait türler ve asidofilik mikroorganizmalar gelişebilmektedir [57]. Ağır metal kirliliğine cevap olarak ya metal-indükleyen ve hücreyi koruyabilen yeni proteinler sentezlenir [58] ya da metallere karşı dirençliliği kodlayan plazmidlere sahip metal iyon-dirençli *Staphylococcus aureus* [59] ve *Alcaligenes eutrophus* suşu (*Ralstonia metallidurans*) [60] gibi birçok mikroorganizma gelişebilir. Bakteriyel plazmidler,  $Ag^+$ ,  $AsO_2^-$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $CrO_4^{2-}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Sb^{3+}$ ,  $TeO_3^{2-}$ ,  $Tl^+$  ve  $Zn^{2+}$  gibi toksik metallere karşı direnç sistemlerini kodlarlar [61]. Ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmalar, bu toksik kirleticilere bazı proteinlerin sentezini artırarak veya yapımını azaltarak cevap vermektedir [62]. Birçok alg, fungi ve bakteri türlerinin metal iyonlarını adsorbe ettikleri ya da biriktirdikleri bilinmektedir [63].

Zolgharnein ve arkadaşları tarafından [64], Persian Körfezi'nden su, sediment ve endüstriyel atık su olmak üzere 3 ayrı bölgeden alınan örneklerden ağır metallere dirençli 35 bakteri izole edilmiş, bu bakterilerin, Cu, Pb, Cd ve Zn ağır metal dirençlilikleri test edilmiş ve dirençli olan bakterilerin, diğer bakterilere göre plazmidde sahip olma sıklığı araştırılmıştır. İzolatların yaklaşık %66'sının plazmid taşıdığı belirlenmiştir. En fazla plazmid görülme sıklığı, endüstriyel atık sulardan izole edilen bakterilerde olup, oranı %48 olarak tespit edilmiştir. Deniz sedimentinden izole edilen bakterilerde plazmid sıklığı %30, sudan izole edilen bakterilerde ise bu oran %22 olarak belirlenmiştir. İzolatların hücre içerisine ağır metal alma kapasitelerinin farklı olduğu tespit edilmiş ve en iyi sonuç *Delftia tsuruhatensis* ve *Pseudomonas*'dan elde edilmiştir.

Ansari ve Malik tarafından [65] endüstriyel atık sularla sulanan topraklardan alınan örneklerin ağır metal analizleri yapılmış ve Fe, Cr, Cu, Zn, Ni ve Cd miktarlarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu toprak örneklerinden *Enterobacteriaceae* familyasına ve *Pseudomonas* spp. cinsine ait türler izole ve identifiye etmişler, MİK değerlerini Cd için 200, Zn ve Cu için 400, Ni için 800 ve Pb için 1600  $\mu g mL^{-1}$  derişimlerinde belirlenmiştir.

*Escherichia coli* hücre duvarında ya da hücre zarında, metallere karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturarak metalleri hücre dışında tutar. Böylece, metallere hassas hücrenel komponentler korumuş olur [66]. Diğer bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler, bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır [67]. Metal iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir [68]. Toksik etkilerinin çoğu, biyolojik membrandan hızlı geçiş, intraselüler protein ve nükleik asitlere bağlanma olaylarının sonucudur [69].

Silver ve Nies'in yaptığı çalışmada [70, 71]  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $AsO_2^-$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ag^+$  ve  $Pb^{2+}$  iyonlarının, taşıma sistemleri ile hücreden uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Araştırmacıların yaptığı çalışmalarla belirtilen metaller için şu sonuçlar bulunmuştur:  $K^+$ 'nin *E. coli*'de taşınması için üç kemiosmotik ve bir ATPaz sistemi olmak üzere dört ayrı sistem olduğu belirlenmiştir.  $Mg^{2+}$ 'nin *S. typhimurium*'da taşınımı için bir kemiosmotik ve iki ATPaz sistemi şeklinde üç ayrı sistem mekanizması açıklanmıştır.  $Mn^{2+}$ 'nin taşınması için Gr (-) ve Gr (+) bakterilerde kemiosmotik ve ATPaz sisteminin bulunduğu belirlenmiştir.  $Zn^{2+}$ 'nin *E. coli*'de taşınmasında ATPaz sistemi olduğu yeni yapılan çalışmalarla bulunmuştur.  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'nin Gr (+) bakterilerde bir fosfor-aspartat ara geçiş bileşiği oluşturulmasıyla beraber P-tipi ATPaz tarafından pompalandığı belirlenmiştir.  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$ 'nin Gr (-) bakterilerde taşınması için membrandaki üç polipeptid kompleksi olan karmaşık bir iç membran proteini (CzcA), bir dış membran proteini (CzcC) ve membran proteini (CzcB) ile ilişkili protein tarafından aktifleştirilen iki değerlikli katyon/2  $H^+$  antiporter pompalama sistemi tarafından uzaklaştırıldığı belirlenmiştir.  $PO_4^{3-}$ 'ün taşınımında *E.coli* ve *Bacillus*'ta Pit (kemiosmotik) ve Pst (ABC-ATPaz) sistemlerinin varlığı belirlenmiştir.  $SO_4^{2-}$ 'nin taşınmasında *S. typhimurium*'da beş bileşenli ABC-ATPaz sisteminin olduğu belirlenmiştir.  $AsO_4^{3-}$ ,  $AsO_2^-$ ,  $SbO^+$ 'nın taşınımında *Mycobacterium leprae*'de  $AsO_4^{3-}$ 'ün enzimatik ArsC sistemi tarafından  $AsO_2^-$  indirgenildiği belirlenmiştir. *Mycobacterium leprae*'de  $AsO_2^-$  ve  $SbO^+$ 'nın tek başına kemiosmotik fonksiyonu olan membran proteini ArsB tarafından veya beraberinde ATPaz proteini olan ArsA ile hücre dışına

pompalandığı da açıklanmıştır.  $Ag^+$ 'ya dirençlilik gösteren bakterilerin  $Ag^+$  taşınmasında üç polipeptid içeren P-tipi ATPaz kemiosmotik değiştirici pompalama sisteminin etkin olduğu saptanmıştır.  $Pb^{2+}$  taşınmasında *Alcaligenes* spp.'de katyona özel P-tipi ATPaz sistemi olduğu belirlenmiştir.  $Fe^{3+}$ 'ün *E. coli*'de taşınması için Fe'nin farklı değerliklerine özgül şelat yapabilen siderofor bileşikleri tarafından oluşturulan en az beş ayrı sistemin etkin olduğu anlaşılmıştır.  $Hg^{2+}$ 'nin taşınımında *Bacillus* spp.'de organomerküriyalliyaz enzimatik zehirsizleştirme mekanizmasının olduğu belirlenmiştir.  $Cu^{2+}$ 'nin taşınmasında *Pseudomonas* spp.'de, bir iç membran proteini, bir dış membran proteini ve iki periplazmik bakır bağlayıcı protein içeren dört kompleksli bir polipeptidin etkin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında kromozomal olarak kodlanan P-tipi ATPaz taşıma sisteminin  $Cu^{2+}$  veya  $Cu^+$ 'ya kısmi direnç sağladığı araştırmacıların yaptığı çalışmalarla belirlenmiştir.

Pardo [72] tarafından yapılan çalışmada,  $-40\text{ }^{\circ}C$ 'den  $-50\text{ }^{\circ}C$ 'ye kadar soğutulmuş inaktive edilen *Pseudomonas putida*'nın  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'yi bağlayabildiği gösterilmiştir [72]. Chang ve arkadaşlarının [73] yaptığı benzer bir çalışmada, inaktif *P. aeruginosa*'nın Pb, Cu ve Cd'yi bağladığı tespit edilmiştir.

Uğur ve Ceylan [74] tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* cinsine ait bakterilerin Cr ve Pb'ye dirençli, Ag'ye ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir [74]. Richards ve arkadaşlarının [75] yaptığı bir çalışmada ise *Frankia* suşlarının çoğunun  $AsO_4^{3-}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $SeO_4^{2-}$  ve  $CrO_4^{2+}$ 'ye dirençli oldukları tespit edilmiştir.

### 1.1.1. Ağır Metal Nedir?

Periyodik tablonun 2A grubundan 6A grubuna kadar geniş bir alanda yer alan elementler, ağır metaller olarak tanımlanmaktadır [76].

Ağır metal terimi, düşük konsantrasyonlarda zehirli ya da toksik olan, nispeten yüksek bir yoğunluğa sahip metalik kimyasal elementler için kullanılır. Gerçekte

ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ten daha yüksek olan metaller içindir. Ağır metaller yer kabuğunun doğal bileşenleridir, yıkılamazlar ve yok edilemezler [77, 78]. Bu gruba Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Hg ve Zn olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yerkürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar [78].

Her ne kadar metaller yoğunluk değerinden hareketle gruplandırılmaya ve ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri, biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır. Bir elementin yoğunluğu aslında periyodik sistemdeki yerinin, kimyasal özellikleri de elementin ait olduğu grubun fonksiyonudur. Metallerin ekolojik sistem üzerine etkilerinden bahsederken aslında metalin ait olduğu grubun ele alınması ve bu özelliğin vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır [79].

### 1.1.2. Ağır Metallerin Özellikleri

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonlarının redoks tepkimelerine girebilen ve giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmaktadır [80]. Ağır metaller çevrede jeolojik ve biyolojik olarak transformasyonlara uğrayabilmektedirler [81]. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır [80]. Örneğin  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^{1+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  gibi metaller esansiyeldir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobesein olarak redoks tepkimelerinde moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Au}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi olmadığı gibi mikroorganizmalara toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler [80, 21]. Bunların parçalanması ve taşınması sonucunda buldukları yerlerden çok uzaklarda birikerek konsantrasyonları artabilmektedir. Grönland buzullarında Pb

konsantrasyonunun geçmiş yillara göre çok fazla artması, bu metalin yeniden dağıldığının ve taşındığının bir göstergesidir [81].

Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Ağır metallerin çevredeki jeolojik nedenlerle oluşan doğal dağılım deseni son yıllarda insanların neden olduğu etki ile önemli ölçüde değişmeye başlamıştır [82, 83]. Ağır metaller, çok çeşitli kaynaklardan ortaya çıkabilmeleri, yaygın kirlenme nedeni oluşturmaları, evre koşullarına dayanıklı olmaları, daima biyolojik sistemlere yönelik etki göstermeleri ve kolaylıkla besin zincirine girerek canlılarda artan yoğunluklarda birikebilmeleri nedenleriyle diğer kimyasal kirleticiler arasında ayrı bir önem taşırlar [84]. Bazı metaller canlılar için önemli olmalarına rağmen, belirli bir derişimden sonra canlı bünyesinde birikip toksik etki oluşurmaktadırlar [85]. Metalik kirlenmelerin çoğu sularda toplanır. Sularda toplanma, sularda çözünme şeklinde olabileceği gibi çözünmeden suların dibinde toplanma şeklinde de olabilir [86]. Metaller sularda serbest iyonlar, organik ve inorganik bileşikler ve partikül maddelere adsorbe olmuş bir şekilde bulunurlar [87]. Adsorbe olarak ken (sediment) ağır metal iyonu ve bileşiklerinin çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylarla tekrar değişik yükseltgenme basamaklarına sahip iyonik formlara dönüşerek toksik etki yaptıkları ifade edilmektedir [88]. Bu şekilde bir kirlenme şehir, endüstriyel ve zirai atıklarından ileri geldiği gibi herhangi bir yolla atmosfere verilen metalik maddelerden de gelebilir [86].

Özellikle sanayi kökenli atıksularla, toprak ekosistemine ulaşan ağır metaller ve iz elementler, toprak tarafından tutulmaktadır. Bu metallerin toprak içindeki çözünürlüğü, toprak pH'ı tarafından kontrol edilmektedir. Ağır metaller toprakta genellikle düşük pH'larda daha fazla çözünmektedir. Topraklarda fazla miktarda biriken ağır metaller, sığ, kaba bünyeli (kumlu) ve organik madde içeriği düşük topraklarda pH'a bağlı olarak topraktan yıkanıp yeraltı sularına da karışabilmektedirler [89].

Ağır metallerin topraklardaki biyokimyasal reaksiyonları etkilemeleri sonucunda organik madde mineralizasyonu, solunum aktivitesi, enzim aktiviteleri ve nitrifikasyon olayı etkilenebilmektedir. Toprak verimliliğindeki önemleri nedeniyle, mikroorganizmaların CO<sub>2</sub> üretimi, topraktaki enzim aktiviteleri ve nitrifikasyon olayı, ağır metallerin etkilerini inceleyebilmek için duyarlı indikatörler olarak tanımlanmaktadır. Ağır metallerin topraktaki biyolojik prosesler üzerine toksik etkisi, onların mobiliteleeri, topraktaki konsantrasyonları, ana materyalin kimyasal bileşimi, toprak bileşimi ve bileşimin çözünürlüğüne bağlıdır [89].

### **1.1.3. Ağır Metal Atığının Kaynakları**

Gelişen teknoloji ile birlikte her gün yeni kirlilik faktörleri gündeme gelmekte olup, bunlar içerisinde ağır metaller ilk sıralarda yer almaktadır [90]. Son yıllarda hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşme sonucu özellikle sucul ortamda toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren pek çok çalışma vardır. Kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların sedimentlerinde geniş yayılım gösterirler. Bu mineraller doğal olarak o yapının bir parçası olmaları veya insan faaliyetleri sonucunda yoğun olarak üretilip taşınmaları sonucunda oralarda bulunurlar [91, 92].

Ağır metal kirliliğinin çeşitli nedenleri vardır; insan kaynaklı ya da doğal kaynaklı olabilirler [93]. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları incelendiğinde doğal çevirimlerden ziyade çevreye yayılımda insan elinin daha etkili olduğu gözlenmektedir [94]. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların eksoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken, ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer alabilir [93]. Ağır metallerin doğaya yayılımında en önemli etkenler sanayi kuruluşlarıdır. Endüstriyel üretimler arasında çimento, demir-çelik, termik santraller, cam, çöp ve atık çamur yakma tesisleri gibi alanlar önde gelmektedir [94].

Sudaki insan kaynaklı ağır metallerin kaynağı çoğunlukla kömür madenciliği, maden cevherleri üretim ve imalatı ile kentsel atıklardır [95]. Maden cevherlerinden metallerin ayrıştırılması sırasında meydana gelen atıklar, çoğu kez maruz kaldıkları işlemlerle aktifleşerek birer kirlilik kaynağı haline gelmektedir [8]. Bu metal grupları atmosferik etkilerle çözünerek, yeryüzü ve yeraltı sularına geçmekte ve organizmalarda birikerek canlı hayatını tehdit etmektedir [9, 10]. Sulara karışan atık ve artıkların içerdiği sanayi kaynaklı siyanür (CN<sup>-</sup>), Cu, Hg, Pb, Cd, As vb. inorganik bileşikler, tarımsal uygulamalardan kaynaklanan kimyasal gübre artıkları, pestisit artıkları ve deterjanlar doğal parçalanmaya dayanıklı maddelerdir [96, 97]. Ağır metaller tarafından oluşturulan su kirliliği, hem bu elementlerin jeokimyasal döngüsü, hem de çevre sağlığı için önemli bir faktördür [95]. Atık sulardaki ağır metallerin bir kısmı arıtma çamurunda bulunurlar. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ile içme ve kullanma sularına ve diğer besin kaynaklarına ulaşabilirler [94]. Ağır metallerin yarattığı en önemli problem, bu metallerin besin zincirinde akümüle olarak insana kadar ulaşması ve doğada kalıcı olmasıdır [93].

Akarsu kaynaklarındaki doğal olan ağır metal kirliliğinin en önemli kaynaklarından biri, toprak erozyonu sonucu sulara karışan katı madde (sediment) ve organik maddelerdir. Ağır metaller bitkilerin büyümesi için gerekli ise de belirli bir konsantrasyondan sonra hem bitkiler, hem de mikroorganizmalar için toksik olmaktadır. Ağır metallerle ilgili bir başka önemli risk ise bu maddelerin uzun vadede toprakta birikim yapmasıdır. Ağır metaller, toprağın absorpsiyonu, kimyasal reaksiyon ve iyon değişimi sonucu toprakta tutulur. Özellikle yağışların yoğun olduğu aylarda sulara karışan sediment, organik ve inorganik maddeler ağır metal miktarında önemli rol oynamaktadır [98].

Sucul ortamlarda ağır metaller, koloidal, partikül (hidroksitler, oksitler, silikatlar, sülfürler veya kil, silis ve organik maddeler üzerine absorplanmış) veya az da olsa çözünmüş formda bulunurlar. Çözünmüş formda bulunan metaller, genellikle iyon ve şelat şeklindedir. Metallerin çözünürlükleri, buldukları ortamın pH değerine bağlıdır. Doğal sulardaki metallerin davranışları, sediment ve askıdaki sediment kompozisyonları ile suyun kimyasının bir fonksiyonudur. Suyun kimyasını, metallerin sediment tarafından absorplanması veya tekrar su kolonuna bırakılma



hızları belirler. Yüzey su sistemlerindeki ağır metaller, genellikle insanın neden olduğu kirliliklerden ve doğal kaynaklardan ileri gelmektedir. Günümüzde, doğal kaynaklardan gelen ağır metal seviyeleri çok düşük seviyededir [99].

Atmosferik etkilerle ortaya çıkan ağır metal kirlenmesinde Pb'ye özel bir önem verilmekte ve Pb kirliliğinin %95 oranında Pb katkılı benzin tüketen motorlu taşıtlardan kaynaklandığı bilinmektedir [100].

Pb doğada inorganik ve organik halde bulunmaktadır. İnorganik Pb bileşikleri saf metal, bileşik ve alaşım olarak bulunur. Organik Pb bileşikleri ise kurşun alkileri olarak bulunur ve bunlar kaynama noktaları düşük olduğundan kolaylıkla buharlaşır ve havaya karışırlar [101]. Pb'ye belli oranda katılan tetra etil kurşun motordaki vuruntu sayısını etkin bir şekilde ayarlayabilmektedir. Tetra etil kurşunun ayrışmasından etil radikali ve Pb metali oluşur. Pb metali yanma gazları ile havaya atılmaktadır [102]. Pb'nin toprağa ve atmosfere geçişi farklı yollarla olmaktadır. Bunlar termik santrallerin, endüstri kuruluşlarının bacalarından ve taşıtların egzozlarından çıkan dumanlar, lehim, akü, boya, elektrik ve petrol sanayine ait atıklar ile pestisitlerdir [103, 104].

Çok çeşitli endüstriyel baca gazları, şehir içi ve şehirlerarası taşıt trafiği, ağır metaller yönünden havanın kirlenmesine yol açmaktadırlar. Daha sonrada bu elementlerin yağışlarla toprağa iletilmesi, bazı yörelerde ağır metal içeriği zengin olan akarsuların sulama amacı ile kullanılması, yapay gübreler ve pestisitlerden bulaşmalar toprakta ağır metal birikimini arttıran önemli uygulamalardır [105]. Toprakların ağır metallerle kirlenmesi, ağır metal içeren kayaçların çeşitli nedenlerle çözünerek su ve toprak ortamına taşınmasıyla da olabilmektedir [106]. Toprağın ağır metaller açısından kirlenmesinde kanalizasyon suları ile arıtma ünitelerinin sıvı ve katı atıkları da son derece önemlidirler. Bu tip maddelerin tarım arazilerine boşaltılması toprakta ve bitkisel ürünlerde ağır metal kirlenmesine neden olmaktadır. Kanalizasyon akıntılarının kimyasal yapısı, zaman ve yere göre büyük farklılıklar göstermektedir. Bu akıntıların kimyasal bileşimi, kanalizasyona ulaşan akıntıların cinsine bağlıdır [105].

Havaya, toprağa ve suya karışan metaller; bitkiler ve hayvanlar üzerinden besin zinciri ile insanlara ulaşmaktadır. Vücutta bulunan metal konsantrasyonları eşik değerlerini aştığı andan itibaren zararlı etkilerini göstermeye başlar. Ancak etkileri konsantrasyonları yanında, metal iyonunun yapısına, çözünürlük değerine, kimyasal yapısına, redoks ve kompleks oluşturma yeteneğine, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına ve lokal pH değerine bağlıdır [99].

**Çizelge 1.1.** Ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları [12, 87, 107-138].

Sanayi Dalı	Ag	Al	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Li	Mn	Ni	Pb	Sb	Sn	Sr	Zn
Akü İmali													+	+			+
Alaşımalar	+	+		+	+	+		+			+	+	+	+	+		+
Boya Sanayi	+		+	+	+	+	+		+		+	+	+	+			+
Cam Sanayi			+	+		+				+	+		+		+	+	+
Çimento				+		+											+
Deri Sanayi						+											
Dişçilik	+								+								
Elektrik-Elektronik		+		+	+	+	+		+		+	+	+			+	+
Fotoğrafçılık	+					+											
Gemi Sanayi				+		+		+				+		+			
Gübre ve Tarım İlaçları	+	+		+		+	+	+	+		+	+	+				+
İnşaat Sanayi		+				+	+	+			+		+				+
Kağıt Sanayi						+	+		+			+	+				+
Kimya Sanayi		+	+	+		+	+		+		+	+		+	+	+	+
Kuyumculuk	+						+					+					
Lastik Sanayi			+														+
Matbaacılık						+							+	+	+		
Metal Kaplamacılık				+	+	+	+					+			+		+
Metalürji		+				+	+				+		+				
Otomotiv Sanayi		+		+	+	+	+	+				+	+		+		+
Para Yapımı	+						+					+					
Petrol Sanayi				+	+	+	+	+	+		+	+	+		+		+
Pil Üretimi	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+				+
Plastik Sanayi				+								+	+	+			
Silah Sanayi		+				+	+						+	+		+	
Seramik Sanayi					+	+				+	+		+	+		+	
Tekstil				+		+						+		+			
Termik Enerji				+		+	+	+	+			+	+		+		+
Uçak Sanayi		+				+						+			+		

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

Günümüzde su ekosistemlerinin ağır metallerle kirlenmesi en kritik çevresel sorunlardan biridir [139, 140]. Ağır metaller, beslenme zinciri içerisinde üst seviyelere doğru birikme eğilimindedirler. Doğal sularda eser miktarda bulunurken ağır metallerin insan faaliyetleri sonucu özellikle endüstriyel atık suların içme sularına karışması veya ağır metalle kirlenmiş partiküllerin atmosfere oradan da toprak ve suya geçmesiyle sulardaki konsantrasyonları artmaktadır [141].

Bazı metal bileşikleri direkt çevreye yayılabilir ve çevreyi kirletebilir. Örneğin Pb, tetra etil kurşun halinde kalite artırıcı olarak benzine katılır ve motordaki yanma sonucu çeşitli bileşikler halinde egzoz gazlarıyla çevreye atılır [142]. Ayrıca çevre, fosil yakıtlardan da (kömür, petrol gibi) indirekt olarak da kirlenir. Fosil kaynaklı katı ve sıvı yakıtların içerdiği birçok metal (As, Hg, Se, Pb, Vanadyum (V) gibi) yakın çevremizdeki havayı trafiğin yoğun olduğu şehirlerde egzoz gazlarından çıkan Pb bileşikleri şehrin havasını kirletmektedir. Sonuçta havada bulunan bu zehirler, solunum yoluyla insanı doğrudan etkilemektedir [140].

##### **1.1.4.1. Kurşunun Çevre Üzerindeki Etkileri**

Pb, atmosfere metal veya bileşik olarak yayılan ve her durumda toksik özellik taşıyan en önemli ağır metaldir [143]. Pb, fosil yakıtların tüketimi ve endüstriyel emisyonlarla en yüksek düzeyde çevreye verilir. Sıcak ortama havadan veya nehirler vasıtasıyla giren Pb'nin, denizel organizmalardaki etkisi, sudaki konsantrasyonuna, maruz kalma süresine, tür farkına ve suda Pb'nin çözünübilirliğine etki eden sertlik, pH gibi birçok çevresel faktöre bağlıdır [144].

Alkil-kurşun katkı maddelerini içeren motor yakıtların yanması sonucu, yaklaşık alkil-kurşunun %70'i havaya Pb tanecikleri halinde yayılır. Geri kalanı egzoz sisteminde ve karter yağında kalır, buradan da çevreye yayılır [145].

Benzin içerisine Pb katılması son yıllarda durdurulmuş olmakla birlikte, önceki kullanımlardan kaynaklanan çevresel tahribatın uzun bir süre daha devam edeceği düşünülmektedir. Günümüzde, Pb kirliliğine neden olan kaynakların başında fabrikalar, atık maddelerin yakılması, Pb elde etme fırınları ile kömür ve fueloilin yanması gelir. Bu nedenle endüstrileşmiş bölgelerde Pb seviyesi maksimuma varmaktadır. Hatta şehirleşmiş bölgelerde kırsal bölgelere nazaran 17 kat daha fazla Pb saptanmıştır [146].

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

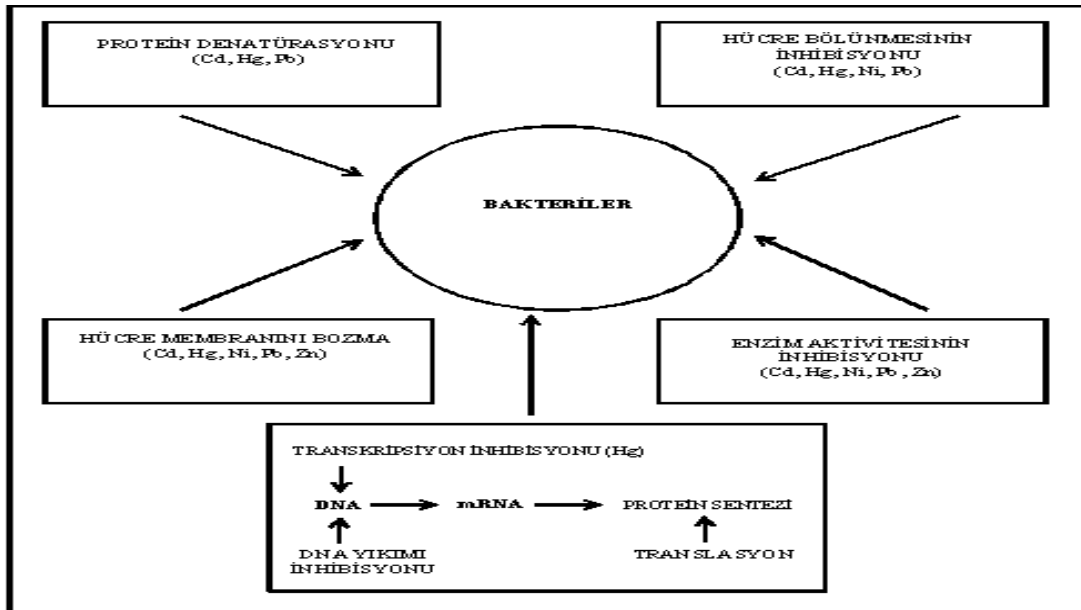
Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan şekilde sınıflandırılır. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunması gerekir ve biyolojik reaksiyonlara katıldıkları için düzenli olarak besinler yoluyla bu metallerin alınması zorunludur. Örneğin; Cu, hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon sürecinin vazgeçilmez parçasıdır [147, 148].

Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek, kükürtlü enzimlere bağlanan Hg'dir [147, 148].

Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı, etkinliği organizmaya da bağlıdır. Örneğin; Ni bitkilere toksik iken hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak değişir [149]. Aşırı metal konsantrasyonları: 1- Hücre membranının permabilitesini değiştirerek 2- Sülfidril (-SH) gruplarıyla reaksiyona girerek 3- Fosfat grupları ve aktif ADP ya da ATP gruplarıyla reaksiyon ilgileriyle 4- Gerekli iyonlarla yer değiştirerek toksisiteye neden olmaktadır [150]. Sunda ve Huntsman [151], ağır metallerin toksik etkilerinin genellikle, metabolik bölgelerdeki besin elementleri ile toksik metallerin yer değiştirmesi sonucu gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünleyici bir rolü vardır. Ca, Co, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Ag, Al, Cd, Au, Hg ve Pb gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel değildirler. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında yer almak gibi roller üstlenirler. Esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin çevredeki konsantrasyonlarının toksik seviyeye ulaşması durumunda insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilediği kuşkusuzdur. Aynı zaman da birçok mikroorganizmanın çeşitli metallerin varlığında gelişmelerini devam ettirebildiği de bilinmektedir [21, 152, 153].

Mikroorganizmalar için enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri, membran fonksiyonlarını engellemeleri ve nükleik asitlerine zarar vermeleri nedenleriyle metaller, toksiktir [154, 155]. Metaller önemli fonksiyonel grupların bloke edilmesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi yaparlar. Çevrede çeşitli formlardaki ağır metaller, mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler [49].



**Şekil 1.1.** Bakterilerde ağır metallerin toksik etkileri [156].

### **1.1.5.1. Kurşunun Canlılar Üzerindeki Etkileri**

Pb, doğada yaygın olarak bulunan, çevresel ve biyolojik sistemlerin hemen her fazında saptanabilen toksik bir element olup, organizmada hiçbir biyokimyasal ve fizyolojik görevi olmayan bir metaldir [143, 157].

Suda kolay çözünen Pb bileşikleri, az veya hiç çözünmeyenlerden daha toksiktir. Buna göre Pb tuzlarının zehirliliği kurşun nitrat ( $PbNO_3$ ), kurşun klorür ( $PbCl_2$ ), kurşun asetat ( $Pb(CH_3COO)_2$ ), kurşun oksit ( $PbO$ ), kurşun sülfat ( $PbSO_4$ ), kurşun sülfür ( $PbS$ ), kurşun fosfat ( $Pb_3(PO_4)_2$ ) sırasını izleyerek azalır [9].

Pb toksisitesi, moleküler ve hücresele düzeyde meydana gelmektedir. Pb iyonu, değişik enzim sistemleri üzerinde etkili olmaktadır. Pb, proteinin sülfidril (-SH) grubuna bağlanarak veya diğer metal iyonları ile yer değiştirerek bazı enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır [158, 159].

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

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

Günümüzde, endüstriyel sıvı atıklardan ağır metallerin giderilmesinde çeşitli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır [160]. Kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve indirgenme, elektrokimyasal yöntemler, buharlaştırma yoluyla geri kazanım, filtrasyon, iyon değiştirme ve membran teknolojisi, endüstriyel atık sulardan ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılan bazı metodlardır [161-165]. Ancak bu metodlar ekonomik açıdan karmaşık ve yetersizdirler [166]. Geleneksel yöntemler çok pahalı olmaları, uzaklaştırmayı tamamen yapmamaları, seçiciliğinin düşük olması, uygulamada fazla enerji harcamaları, pahalı ekipmana gereksinim duymaları, ağır metal kirliliğinin yüksek konsantrasyonda olması durumunda etkin olmaları ve toksik kirlilik yaratmaları gibi dezavantajlara sahiptir. Yüksek konsantrasyon için uygun olan bu proseslerin  $100 \mu g mL^{-1}$ 'den daha seyreltik ağır metal içeren atık

sularda uygulanması anlamsızdır. Birçoğu ikincil çevre kirliliğine neden olmaktadır [162, 164, 167, 168].

Ağır metallerin ve onların zehirli etkilerinin su arıtım tesislerinin atık sularında ve çamurlarında varlığını sürdürebilmesi, ağır metaller için özel olarak tasarlanmış kirlilik kaynağından uzaklaştırma seçeneklerini gündeme getirir. Bu özel işlem, çok miktarda atık su işleneceğinden ucuz olmalıdır. Ayrıca diğer geleneksel yöntemlerin etkisiz kaldığı, seyreltik çözeltilerden metal uzaklaştırılması açısından da yeni metodların geliştirilmesi önemlidir. Bu gibi sorunların halledilmesi için biyolojik yöntemlerin kullanılması söz konusudur [169].

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

Son yıllarda ağır metal içeren atıksuların arıtımında biyolojik yöntemler; etkili, pratik ve ekonomik olmaları nedeniyle konvansiyonel fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine tercih edilmekte ve bilimsel araştırmalar bu yönde ağırlık kazanmaktadır [170-174].

Kirleticilerin ortadan kaldırılması için biyolojik tekniklerin 3 ana avantajı vardır: 1- İşlemler kontamine olmuş bölgelerde in situ olarak uygulanabilir. 2- Biyolojik işlem teknikleri genellikle çevre dostudur. 3- Maliyet açısından uygundur [175].

Biyolojik substratların temel avantajlarını aktif bağlanma bölgeleri çeşitliliği, küçük ve tek biçimli boyutları, geniş yüzey alanlarına sahip olmaları ve iyon değiştirici reçinelerden daha az biyolojik substrat gerektirmesi şeklinde sıralayabiliriz [176].

Sonuç olarak; metallerin biyolojik yöntemlerle uzaklaştırılması ve geri kazanımı, kullanılan klasik fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla ekonomik ve pratik olması, yüksek verimlilik içermesi gibi nedenlerle tercih edilmekte ve ilgili biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır [177].

### 1.1.7. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

Ağır metallerin farklı formlarda çevreye girmesi, mikrobiyal topluluklarda ve onların aktivitelerinde kayda değer modifikasyonlar yapmaktadır [54]. Metal ihtiva eden çevrelerdeki selektif baskılar, tüm toksik metallere karşı belli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır [178]. Ekolojik çalışmalar, antibiyotik ve ağır metal dirençliliğinin global öneme sahip olduğunu göstermektedir [179, 180]. Metal iyonlarının varlığı, genlerdeki enzimatik detoksifikasyon özellikleri aracılığı ile metal dirençliliğini başlatmayı sağlayabilir [181, 182].  $Cd^{2+}$ 'nin enzimatik detoksifikasyonu ile daha az toksik Cd formları oluşmaktadır [21]. En önemli örnek, Hg dirençliliğinde mer operon'undaki  $Hg^{2+}$  direnç kodudur. Hg, tiyollere son derece affinite gösterdiğinden dolayı son derece zehirlidir. Bakteriler direnç operonundan kaynaklanan genlerin gelişmesi aracılığıyla  $Hg^{2+}$ 'nin varlığına adapte olabilmektedirler. Bu operonun gen ürünleri sadece  $Hg^{2+}$  detoksifikasyonunda değil, ayrıca taşınmada ve kendi kendine düzenlenmede de etkilidir [183, 184].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, mikroorganizmaların çevreyi kirleten metallerin temizlenmesinde büyük bir rol oynayabileceği bulunmuştur [185-187]. Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip, bu kirleticileri ortamdan uzaklaştırabilmesi, ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir [188]. Mikroorganizmaların yüksek miktardaki toksik maddelerle başa çıkabilmesi için, birçok yol mevcuttur [189]. Mikroorganizmalarca ağır metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir [188].

Mikroorganizmalar bu direnç mekanizmalarından sadece birini kullanabildiği gibi birkaç tanesini birlikte de kullanabilmektedir. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksisitesine bağlıdır [72]. Normalde bugün bilinenlerden daha fazla direnç mekanizması olduğu sanılmakta fakat bu



mekanizmalara sahip mikroorganizmalar henüz izole edilemediğinden ispatlanamamaktadır [21].

Tüm bakteri genlerinin toksik metal dirençliliği için,  $Ag^+$ ,  $AsO_2^-$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $CrO_4^{2-}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Sb^{3+}$ ,  $TeO_3^{2-}$ ,  $Tl^+$  ve  $Zn^{2+}$  gibi iyonlara maruz kalması gereklidir. Bu geniş metal grubu, bakterilerde toksik iyonların enerjiye bağlı olarak atılma mekanizması ile direnç sağlamaktadır. Birçok enzimatik dönüşümler (oksidasyon, redüksiyon, metilasyon ve dimetilasyon) veya metal bağlayan proteinler (metallothionein SmtA, şaperon CopZ, periplazmik gümüş bağlayan protein (SilE) metal iyonu içerirler [190]. Biyolojik membran boyunca ağır metal taşıyan bu proteinler, yaşamın ilk günlerinden bu yana gelişen protein ailelerinin üyeleridir. Bu taşıma sistemleri, taşıma işini gerçekleştirmek için gereken enerjiyi ATP hidrolizi ile karşılayabilirler [191-194].

Farklı mikroorganizmalarda isleyiş bakımından farklılıklar gösterse de en iyi karakterize edilmiş  $Cd^{+2}$  dirençliliği sağlayan taşıma sistemi *S. aureus*'daki, plazmid tarafından kodlanan, *cad* sistemi (*cadA*, *cadB*, *cadC*) [20,21] ve *A. eutropus*'daki *czc* (*czcA*, *czcB*, *czcC*, *czcD*) sistemidir. Her iki operonun gen ürünleri; hücre içindeki  $Cd^{+2}$ 'yi kendine bağlayıp yine operon tarafından kodlanan kanal proteinine taşınmakta ve operonun diğer gen ürünleri aracılığı ile de hücre dışına salınmaktadır [21].

Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir [195, 196]. Çünkü her iki tip dirençte de organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir [66].

Doğal çevredeki metal kirliliğinin, antibiyotik dirençliliğinin devam etmesinde ve dirençliliğinin artmasında önemli bir rol oynadığını destekleyen çok sayıda çalışma vardır. Örneğin, Jain ve arkadaşları [197] tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* suşlarında 2-200 kb boyutunda endojen plazmitlerin varlığı araştırılmıştır. *Bacillus* suşundaki yabancı bir genin ifadesi için endojen plazmit DNA'nın kullanılmasının

avantajlı olduğu görülmüştür [197]. Rajbanshi [198] tarafından yapılan çalışmada atık sulardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus* spp. bakterilerinin ağır metal ve antibiyotiklere karşı dirençli oldukları görülmüştür. Çoklu toleransta toksik bileşenlere karşı benzer dirençlilik mekanizmaları Çizelge 1.2.'de görülmektedir. Tüm ağır metallerin benzer toksik mekanizmaları vardır ve ağır metallere dirençli bakteriler arasında çoklu tolerans ortak bir fenomendir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere ve diğer ilaçlara karşı dirençliliği, doğal yapılarının yanı sıra, infeksiyon sırasında ve sonunda da gelişebilmektedir. Bu durumu sağlayan faktörleri birkaç grupta incelemek mümkündür [199].

1) Permeabilitenin azaltılması: Birçok Gr (-) ve Gr (+) mikroorganizmanın anatomik yapısı (hücre duvarı, dış membran, sitoplazmik membran, vs) bazı antibiyotiklerin geçişine izin vermeyecek şekilde selektif permeabiliteye sahiptir. Özellikle, Gram (-) bakterilerin dış membranlarında bulunan porin proteinleri (OMP) arasındaki kanallar (porlu), antibiyotiklerin geçişine engel olmaktadır [199].

2) Mutasyonlar: Mikroorganizmalarda bulunan veya sağaltım sırasında genetik düzeyde (bazılar arasında) oluşan mutasyonlar, antibiyotik ve kemoterapötiklerin bakteride etkili olduğu hedef bölgelerde bazı değişiklikler meydana getirerek, antibiyotiklerin bunlara bağlanmasına ve böylece olumsuz etki meydana getirmelerine engel olurlar [199].

Böyle varyasyonlar bakterilere dirençlilik kazandırır. Örneğin bakterilerde protein sentezinde önemli rolleri olan 30S ve 50S'lik ribozomlarda meydana gelen değişikliklerin, eritromisin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin gibi antibiyotiklere oluşan dirençte önemli payları vardır [199].

3) Hücre duvarının olmaması: Bazı Gr (-)'lerde (*Mycoplasma* gibi) hücre dış membranı bulunmamaktadır. Bu nedenle hücre duvarını etkileyen ve sentezine engel olan birçok antibiyotik (penisilin, sefalosporin vs.) bu bakterilere etkili olamamaktadır. Buna bağlı olarak da Gr (+)'larda başarı ile kullanılan bu tip antibiyotikler, *Mycoplasma* spp. infeksiyonlarında kullanılamazlar [199].

4) Antibiyotiklere bağımlılık: Bazı mikroorganizmalarda kendilerinde oluşan mutasyonel değişiklikler sonucu yeni mutantlar gelişimi için kimi antibiyotiklere bağımlı hale gelebilirler. Böyle olgulara penicillin ve sulfanomidlere karşı bağımlı hale gelen Meningokok'larda rastlanıldığı bildirilmiştir. Oluşan mutantlara penicillin veya sülfonamidlerin etkisi olmadığı gibi böyle ilaçların kullanılması mikroorganizmaların etkinliğini artırır. Buna diğer bir örnek de, Streptomycin'e bağımlı *Brucella melitensis* suşları verilebilir [199].

5) Uygun kombinasyonların yapılmaması: Birbirlerinin etkisini azaltacak veya değiştirecek türde iki antibiyotiğin kullanıldığı durumlarda bu antibiyotiklerin mikroorganizmalar ve dolayısıyla da infeksiyon üzerine herhangi bir etkisi olmaz. Hastalığın ilerlemesine ve hayatı tehlikeye sokacak boyutlara ulaşmasına neden olan durumlarda mikroorganizmalar, aktivitelerini kolayca sürdürürler [199].

6) Kompetitif inhibisyon: Bu dirençlilik de yine uygun olmayan (bakterilerde aynı hedef bölgeyi etkileyen iki antibiyotiğin birden kullanılması) kombinasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bu gibi durumlarda antibiyotiklerden sadece biri hedef bölgeye bağlanır ve etkili olabilir. Örneğin, Kloramfenikol ile birlikte bakterilerdeki aynı hedef bölgeye (50S'lik ribozomal alt üniteye) bağlanan makrolitlerden (eritromisin, klaritromisin, azitromisin vb. gibi çok sayıda fonksiyonel grubun bağlandığı büyük halkalı antibiyotikler) birinin de aynı anda verilmesi, birincisinin etkisiz hale gelmesine neden olabilir. Bu tür kombinasyonlardan bir fayda beklenemez [199].

7) Plazmide bağlı dirençlilik: Bakterilerde bulunan özel plazmidlerin (R-plazmid) kodladıkları enzimler, ya antibiyotiklerin kimyasal yapılarını bozarak ya da bunların bağlandıkları ribozomal alt ünitelerdeki spesifik bölgelerde değişiklikler yaparak antibiyotikleri etkisiz hale getirirler. Böyle mekanizmalar ile bakteriler birden fazla antibiyotiğe kemoterapötik maddelere ve çeşitli metal iyonlarına karşı dirençlilik kazanabilirler [199].

8) Transpozonlara bağlı dirençlilik: Bakterilerde genom veya plazmit içinde bulunan bir veya birden fazla transpozon (Tn), bazı enzimlerin sentezini kodlayarak antibiyotiklere karşı dirençlilik oluşturabilirler. Bazı transpozonlar çok sayıda ilaca karşı dirençlilik genleri taşıyabilir ve bunları aktarabilirler [199].

9) Hücre membranının transfer sisteminde değişiklik: Membranda, intrastoplazmik boşlukta bulunan birçok enzimin transport sisteminde değişiklik oluşturularak antibiyotiğin girişı azalır (tetrasiklinler, aminoglikozidler, kloramfenikol vs. olduğu gibi) [199].

Bakterilerin birden fazla antibiyotiğe direnç kazanmasının diğer bir şekli de çoklu (multiple) dirençtir. Bu durum bakterilerin, yapısı ve antibakteriyel etki mekanizması farklı birçok antibiyotiğe karşı kazandığı direnç olarak tanımlanır. Çoklu direnç, genellikle bakterinin kromozomlarında ve özellikle plazmidlerinde birden fazla türde direnç geninin bulunmasına bağlıdır. Örneğin Enterobacteriace'nin dirençli türlerinde 10 veya daha fazla antibakteriyel ilaç çeşidine karşı direnç oluşmasına yol açan genleri taşıyan plazmidlerin varlığı gösterilmiştir [200].

Boucher [201] tarafından *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp. bakteri türlerinin çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip oldukları belirlenmiştir.

Karbasizaed ve arkadaşları [202], *Klebsiella pneumoniae* suşlarında çoklu antibiyotik dirençliliğini araştırmışlar ve *K.pneumoniae*'nin ampisilin (%100), tetrasiklin (%50), kanamisin (%20), gentamisin (%13.3), siprofloksasin (%20), nalidiksik asit (%20) ve sefolotin (%6.6) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiğini saptamışlardır.

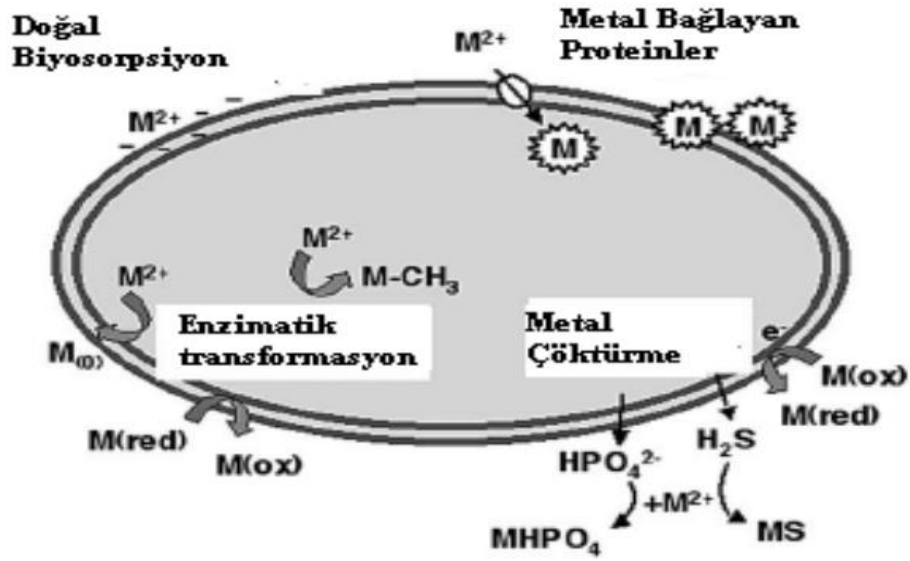
**Çizelge 1.2.** Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri [203].

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

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

Mikroorganizmalar, toksik metal varlığında adaptasyon için çeşitli mekanizmalar kazanmışlardır [198]. Bu adaptasyon mekanizmaları;

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



Şekil 1.2. Bakterilerdeki Olası Ağır Metal Direnç Mekanizmaları [204].

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

Mikrobiyal kütlelerin hücre duvarı, polisakkaritlerin protein ve lipidlerden oluşur. Bu yapılarda karboksil ( $\text{COO}^-$ ),  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  ve amino ( $\text{NH}_3^+$ ) gibi metal bağlayıcı gruplar sıkça rastlanmaktadır [205].

Bakteriler, algler, funguslar ve mayaların metallerle kompleks yaptıkları ve onları absorbladıkları anlaşılmıştır. Mikroorganizmalar aracılığıyla metallerin kompleksleşmesi iki yolla oluşur; 1- Metaller hücre çeperi yüzeyine cıvık tabakaya ya da hücre dışı matrikse spesifik olmayan bağlarla tutunabilir ya da 2- Hücre içine alınabilirler. Çalışmalar metal kompleksleşmesinin her iki tipinin de metal toksisitesini ve mobilitesini azaltmak için kullanıldığını göstermektedir [206]. İlhan [206] tarafından yapılan çalışmada kompleksleşme kapasitesinin genusa özel olduğu kadar, türe de özel olduğu bildirilmektedir. Farklı *Pseudomonas* türleri arasındaki metal kompleksleşme çalışmaları, Pb, Fe ve Zn olmak üzere çeşitli metallerin kompleksleşmesinde bir dizi önemli fark göstermiştir. Mikroorganizmalarla metal kompleksleşme yeteneği, çeşitli biyoremediasyon proseslerinin gelişiminde kullanımını ortaya çıkarmıştır.

Geçirgen bariyer sayesinde, metallerin hücre dışında bırakılması; mikroorganizmanın hücre duvarında, membranında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel komponentlerini korumaktadır [178]. Örneğin, Li ve arkadaşlarının [207] yaptığı çalışmada *E. coli*'nin membran kanal proteini olan porinlerin sayısını azaltmak suretiyle Ag iyonlarının hücre içine girişinin engellendiği bildirilmiştir.

Rouch ve arkadaşlarının [178] yaptığı çalışmada ise *E. coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinlerinin üretiminin değiştirilmesiyle  $Cu^{2+}$ 'nin hücreye girişinin engellendiği belirlenmiştir [178]. Bu durum tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir [66].

Muraleedharan ve Venkobachar [208], *Genoderma lucidum* ile metal tutulmasının hücre duvarında ve temel etkileşim bölgeleri olan yapısal polisakkaritlerde gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Mikroorganizmalar toksik çevreye karşı kendilerini korumak için ekzopolisakkarit (EPS) üretmektedirler. EPS, hücreler için dış etkenlere karşı koruyucu bir tabakadır. Sheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [189], bakteriler toksik kimyasalları maruz kaldıklarında, hücrelerindeki karbonhidrat, protein ve nükleik asit miktarlarında artış görüldüğü saptanmıştır. Hücre yüzeyi ağır metalleri biriktirmekte veya EPS hücre duvarının dışında jel benzeri bir yapı olarak toksik maddelerin zararlı etkilerini azaltan kimyasal reaksiyonlarla tarafından veya sınırlandırılmış difüzyon aracılığı ile toksik maddeleri engellemektedir. EPS protein, karbonhidrat ve nükleik asit içeriğine bağlı olarak bulundurduğu  $COO^-$ ,  $PO_4^{3-}$  ve  $SO_4^{2-}$  gruplarıyla metalleri bağlayıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle ortamda toksik metal artışına bağlı olarak, buna direnç gösteren bakteri daha fazla EPS üretmektedir [189]. Scott ve Palmer [209] tarafından yapılan çalışmada bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir. EPS'den oluşan bir koruyucu tabaka  $Cd^{2+}$  çözeltilerinde *K. aerogenes* türlerinin hassasiyetini düzenlemektedir. Ekstraselüler koruyucu tabakası olmayan türlerde de  $Cd^{2+}$  birikimi

ispatlanmıştır. *K.aerogones*'in ekstraselüler kapsülü kapsülsüz formlara benzediği zaman Cd'nin 1nM'nin girişini engelleyebilmektedir [209]. Scott ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [210], *P. putida*'nın et suyuna eklenen 2.5 µg mL<sup>-1</sup> derişimindeki Cd<sup>2+</sup>'nin tamamını bağlayabilmekte olduğu *A.viscous*'un türleri et suyuna 100 µg mL<sup>-1</sup> katıldığı zaman Cd<sup>2+</sup>'nin 30 µg mg<sup>-1</sup>'ını biriktirebildiği rapor edilmiştir. Her iki durumda bağlayıcı özellik pH'a bağımlıdır ve optimum pH 4.0-9.0 arasındadır. EPS tabaka tek basına Cd<sup>2+</sup> bağlayacağından ekstrasellüler tabakası sağlam bir mikroorganizma gibi verimli değildir. Bu koruyucu tabakanın duyarlı hücrel bileşenler için metal iyonlarını tutarak alımı önlediği görülmektedir.

### 1.1.7.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşımını

Metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar, toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transportu kullanırlar [72, 211]. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmid kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır ve hemen dışarıya atılırlar. Bu pompalama sistemleri ATPaz bağımlı ya da bağımsız sistemler olabilir [212]. Bakterilerdeki AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Cd, Cu dirençlilikleri çoğunlukla bu tip mekanizmalarla gerçekleşir. Örneğin Ji ve Silver [66] tarafından yapılan çalışmada AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dirençliliği için *ars* operonu ile *E.coli* ve *S.aerous*'ta; Cd<sup>3+</sup> dirençliliği için *cad* operonu ile *S.aureus*, *Bacillus* spp. ve *Listeria* spp.'de veya *Alcaligenes eutrophas*'ta *eze* operonu bulunmuştur. Pb<sup>2+</sup> direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ile *S.aureus*'ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmid ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [66].

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

Metaller ve yarı metaller oldukça toksiktirler ve prokaryotlar bu toksik bileşiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir [204]. Bu dirençte, strese yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal



stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir [213-216]. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini, hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir [213, 217].

Valls ve Lorenzo [204] metallothioneinin varlığı ortaya koymuştur [204]. Metalothioneinler, birçok prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, molekül ağırlığı düşük (6000-7000 Da), metal bağlayan proteinlerdir [218]. Metalothioneinler bir stresle indüklenebilen antioksidant özellikte proteinlerdir [153]. Metalothioneinler aşırı yüksek metal ve  $S^{2-}$  içeriği ile karakterize edilirler, aromatik amino asitlerden ve histidin amino asitinden yoksundurlar [153, 218]. Metalothioneinler, başlangıçta sadece Cd bağlayan proteinler olarak düşünülmüştür, ancak artan ilgi düzenine göre Zn, Cd, Cu, Hg ve Ag'ye de bağlandıkları bilinmektedir. Ökaryotlarda çok yaygın olmalarına karşın, prokaryotik metalothioneinler ilk olarak siyanaobakteri *Synechococcus* spp.'de tanımlanmıştır. Choudhury ve Srivastava [153] tarafından yapılan çalışmada bu molekülün Cu, Cd ve Zn ile kompleks oluşturduğu ve yüksek oranda thiol içerdiği saptanmıştır [153]. Leahy ve Colwell [22] tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas putida*'nın da metalloprotein ürettiği tespit edilmiştir.

#### 1.1.7.4. Ekstrasellüler Alınım

Glutasyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır [219]. Glutasyon  $Ag^{1+}$ ,  $Cu^{1+,2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  gibi metallere karşı koruması için bir örnek teşkil etmektedir [183]. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'den korunmayı sağlayabilmektedir [220]. Murphy ve Leavy [219] tarafından yapılan araştırmalarda mayaların, metalle zengin besi ortamlarına ekstrasellüler glutasyon salgıladıkları belirlenmiştir. Toksik metaller glutasyon ile birleşerek hücre membranından geçememektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'deki  $Ni^{2+}$  dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *S. cerevisiae* fazla miktarda glutasyon üreterek  $Ni^{2+}$  absorpsiyonunu azaltabilmektedir [219]. Vido ve arkadaşları [221], glutasyon sentezi ile antioksidan özelliğe sahip bazı proteinlerin  $Cd^{2+}$  iyonları ile muamele edilen maya hücreleri tarafından daha fazla sentezlediğini göstermişlerdir [221]. Mayalar gibi

diğer organizmalar ve *Citrobacter* spp. türleri de kalsiyum fosfatın çözünmez bileşik formlarına direnç göstermektedirler [196]. Maya formları hidrojen sülfid üretimi boyunca çeşitli kompleksler kullanırken *Citrobacter* spp.  $PO_4^{3-}$  kullanmaktadır. *Klebsiella aerogenes*'in bir türü sülfür çıkararak sınırlı miktardaki metali içeri alırken, yakınında dış çöktürme aracılığı ile  $Cd^{2+}$  iyonlarını etrafını çevreleyen ortamdan kaldırma yeteneğini göstermektedir [210, 222].

### 1.1.7.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu

Tarihin erken dönemlerinden beri mikroorganizmalar metaller ile birlikte var olmuşlardır. Metaller, pek çok enzimin aktif merkezlerinde yer almaktadır. Metalin kimyasal özellikleri anahtar reaksiyonlar katalizlemekte veya protein yapısını korumada uygunluk teşkil etmektedir [204].

Bazı ağır metaller iz element olarak bulunmaktadırlar (Zn, Cu gibi). Bakterilerin büyümesi için gerekli olan bu metallerin yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bakteriler, ağır metallere karşı enzimatik detoksifikasyon mekanizmasını geliştirmişlerdir [223]. Detoksifikasyon mekanizması, genellikle ağır metallerin enzimatik olarak indirgenmesidir. Bu direnç mekanizmasını kodlayan genler bazen plazmitler üzerinde, bazen de kromozomal DNA üzerinde olabilmektedir. Bu mekanizma ile *E. coli*,  $AsO_4^{3-}$ , As ve Sb'ye karşı çoklu direnç gösterebilmektedir [224]. Tanımlanmış olan birçok bakteriyel ağır metal dirençliliği içinde, Hg dirençliliği en iyi incelenmiş olanıdır. Hg dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik  $Hg^{2+}$  formundan elementel ve daha az reaktif  $Hg^0$  formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Bazı Hg'ye dirençli bakteriler, Hg'ye dirençli geniş spektrumlu bileşiklere sahiplerdir [225]. Osborn ve arkadaşları [226] tarafından yapılan çalışmada detoksifikasyona ilave olarak, Hg bileşiklerinin tutulması ve dimetillenmesi ile hücresel geçirgenliğin azalmasından dolayı Hg iyonlarının alınımının azaldığı rapor edilmiştir.

Gerek Gr (+), gerekse de Gr (-) bakterilerde Hg<sup>2+</sup>ya karşı dirençlilik gösterilmiştir [182]. Hg hücrede enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan thiollere bağlanarak inaktive olmaları nedeni ile toksik etkiye sahiptir. Bazı bakterilerde Hg<sup>2+</sup> dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı *mer* operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg<sup>2+</sup>'nin detoksifikasyonundan değil, aynı zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [182, 183]. Hg'nin bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları, transkripsiyon düzenlenmesini azaltmaktadır. Bu genler, periplazmik bağlayıcı proteinin üretimini ve membran bağlantılı taşıma proteinlerini şifrelemektedirler. Detoksifikasyon için etrafını çevreleyen ortamdan periplazmik bağlayıcı proteinler ve taşıma proteinleri, Hg<sup>2+</sup>'yi sitoplazmaya taşımaktadırlar [26].

Gr (-) bakterilerde bulunan 2 *mer* operonu, toksik Hg iyonlarına karşı direnç sağlamaktadır. *Mer* operon sistemindeki, *merA* genleri civa redüktaz enzimini, *merB* ise organomerküriyalliyaz enzimini kodlamaktadır. *MerT* genleri hücre membranından Hg iyonlarının taşınmasından ve *merR* genleri ise transkripsiyonda regülatör proteinlerin üretilmesinden sorumludur. *MerC*, *merT* ve *merP* genleri *mer* taşıma genleridir. *MerT* ve *merC* gen ürünleri sitoplazmik zar proteinleridir. Ancak *merP* gen ürünleri ise periplazmik proteinlerdir. *MerP*, periplazmik boşlukta tiyol proteinlerini içeren koruma sağlarken, sitoplazmik zar bölgelerinde Hg<sup>2+</sup>'nin çökeltilerini toplamaktadır. *MerT* sitoplazmayı benzer şekilde koruyabilmektedir. Bu genler operonun bir parçası olarak enzim kodlu genlerle ilişkili bir rol oynayabilmektedir. *Mer* sistemindeki genler kromozomal DNA üzerinde kodlu olabildiği gibi plazmit kodlu da olabilmektedir [190, 227].

### 1.1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan Pb dirençli suşların izolasyonu, bu suşların biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Pb dirençli suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK değerleri belirlenmiş ve bu suşlar morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Pb dirençli

olan suşun antibiyotik ve diğer metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Pb direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein izolasyonu yapılmıştır. Antibiyotikler ve metal dirençliliğinin kromozomal DNA ile ilişkisi çalışılmıştır.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kullanılan Besiyerleri**

##### **2.1.1.1. Nutrient Agar**

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

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

##### **2.1.1.2. Nutrient Broth**

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

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

#### **2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar**

##### **2.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar**

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

## **2.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler**

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

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

0,990 g glukoz, 0,394 g Tris, 0,372 g EDTA tartılarak 100 mL distile suyla (pH: 8.0) tamamlanır.

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

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

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

74 g K-asetat tartılır ve 28,75 mL glasiyal asetik asit ile çözülür. Solüsyonun son hacmi 250 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

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

242 g Tris, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O tartılarak 57,1 mL glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tampon tamamlanır.

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

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

0,3 g Tris ve 0,008 g EDTA tartılıp 250 mL distile suyla (pH: 8.0) tamamlanır.

#### **2.1.2.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 mL)**

10 g SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

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

0,0384 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılarak, 5 mL gliserol ve 100  $\mu\text{L}$ , 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmış ve 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

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

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

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

4,1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülmüştür ve 10 g Cetyltrimethylammonium (cetrimonium) bromide (CTAB) yavaşça solüsyona eklenerek 65°C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

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

96 mL kloroform, 4 mL izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

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

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

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

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### **2.1.2.2.2.9. %70'lik etanol (100 mL)**

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

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

8,47 g Tris-HCl tartılarak 50 mL distile suda çözülmüştür ve pH: 8.0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

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

0,12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

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

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

6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılıp 1000'er mL distile suda çözülür. Hazırlanan iki ayrı çözelti pH: 7.0'ye olacak şekilde karıştırılır.



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

Çizelge 2.1. SDS-PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24,2 g Tris tartılır, 50 mL distile suda çözülür, derişik HCl ile pH: 8.8'e ayarlanıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Tris-HCl, 1 M	12,1 g Tris tartılır, 50 mL distile suda çözülür, konsantre HCl ile pH: 6.8'e ayarlanıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
SDS (%10)	10 g SDS tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Gliserol (%50)	50 mL %100'lük gliserol alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 mL distile su içinde çözülür.

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

Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid (100 mL)	29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100 mL)	2 M Tris-HCl (pH = 8.8) 75 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 21 mL. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100 mL)	1 M Tris-HCl (pH = 6.8) 50 mL, %10'luk SDS 4 mL, distile su 46 mL. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 mL)	0,5 g amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 mL'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1 L)	Tris (25 µM) 3 g, glisin (192 mM) 14,4 g, SDS (% 0,1) 1 g tartılıp distile 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-merkaptetanol, %1 Bromfenol mavisi 1 mL; 0,9 mL distile su. Buzdolabında saklanır.

#### 2.1.2.2.5.1. Ayrıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)

**Çizelge 2.3.** Ayrıcı jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	7,8 mL
Solüsyon B (Stok)	6 mL
Distile su	10,08 mL
Amonyum persülfat	79,2 µL
TEMED	15,6 µL

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

**Çizelge 2.4.** Dengeleyici jelin hazırlanması

Solüsyon A (Stok)	1,33 mL
Solüsyon C (Stok)	2 mL
Distile su	4,67 mL
Amonyum persülfat	27 µL
TEMED	6,6 µL

#### 2.1.2.2.6. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

%0.1 Commassie Brilliant Blue boyası tartılarak %12'lik glasiyal asetik asit ve %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 1150km'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 [228].



**Şekil 2.1.** Kızılırmak'ın Lokasyonu [27].

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, silah sanayisi ile petrol rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale İli'nde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [229].

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

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

### **2.2.2. Örneklerin Toplanması**

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

### **2.2.3. Kurşuna Dirençli Bakterilerin İzolasyonu**

Pb ağır metale dirençli suşların seçimi için bu metali içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Pb dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda  $Pb(NO_3)_2$  içeren NA ortamları hazırlanmıştır. Her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ortamlara ekilmiştir.  $30^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Pb dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır [230].

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

Pb dirençli saf kültürler  $30^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edilerek koloni ve hücre morfolojisine bakılmıştır. Suşların koloni kenar yapısı, şekil, optik özellikler, akışkanlık ve pigmentasyon özellikleri incelenmiştir. Hücre morfolojileri ise, gram boyamayla mikroskop (immersiyon yağıyla ve 100 büyütme objektifi) altında incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin incelenmiştir.

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

Pb'ye dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda  $Pb(NO_3)_2$  eklenerek saptanmıştır.  $30^\circ C$ 'de 48 saat inkübe edilmiş ve üreme olan petrilerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyonda Pb bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saat sonunda üreme görülmeyen petrilerdeki ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır [230].

### 2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

Kırıkkale-Kızılırmak'tan Pb'ye dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiş ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suş seçilmiştir. Seçilen suşun morfolojik özelliği belirlenmiş ve API 20 NE kitleri kullanılarak biyokimyasal testi yapılmıştır. Bu sonuçlara göre suş identifiye edilmiştir [231, 232].

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

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

Pb dirençli suşun, çoklu metal dirençlilik profillerini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda  $\text{AgNO}_3$  ( $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2700 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ( $1100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{FeCl}_3$  ( $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $195 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{LiCl}$  ( $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4$  ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $395 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  ( $1400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $825 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) metallerini içeren Nutrient agarlı besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan bu petriyerler,  $30^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiş ve üreme olan suşların ortama eklenen metale karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir [230].

Antibakteriyel hassasiyet testleri Mueller-Hinton agar (Difco) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [230]. Pb dirençli suşun, antibiyotik dirençlilik profillerini belirlemek için değişik konsantrasyonlarda amikasin (AK) ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), aztreonam (ATM) ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sefepim (FEP) ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sefsulodin (CFS) ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seftazidim (CAZ) ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), siprofloksasin (CIP) ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), gentamisin (GM) ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), imipenem (IPM) ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), netilmisin (NET) ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), pefloksasin (PEF) ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), piperasilin (PRL)

(100 µg mL<sup>-1</sup>), piperasilin/tazobaktam (TPZ) (100/10 µg mL<sup>-1</sup>), tikarsilin (TIC) (75 µg mL<sup>-1</sup>), tikarsilin/CA (TIM) (75/10 µg mL<sup>-1</sup>), tobramisin (TOB) (10 µg mL<sup>-1</sup>), trimetoprim + sulfametoksazol (SXT) (25 µg mL<sup>-1</sup>) antibiyotiklerini içeren Nutrient agarlı besiyerleri hazırlanmıştır. Ekim yapılan bu petriyerler, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve üreme olan suşların ortama eklenen antibiyotiğe karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir [230].

### 2.2.8. Bakteri Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

MİK değerleri belirlenen Pb metalinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µL örnek alınarak, 100 mL NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem 1200 µg mL<sup>-1</sup> Pb metalinin bulunduğu NB ortamları içinde tekrarlanmıştır. Kültürler 30°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, 600 nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile optik dansite ölçülerek üreme eğrisi çıkarılmıştır.

### 2.2.9. Plazmit İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [233]. Metal içermeyen 100 mL NB besiyerine ve 100 mL'lik belirlenen konsantrasyonda Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'yi içeren metalinin bulunduğu NB besiyerine plazmit izole edilecek bakterilerin ekimleri yapılmıştır. 30°C'de 24 saat inkübe edilen kültürlerden 1,5 mL alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve tekrar 1,5 mL kültür eklenerek aynı işlem tekrarlanmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µL GTE (glukoz/Tris/EDTA) ilave edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200 µL, 0,2 N NaOH/%1 SDS solüsyonu üzerine ilave edilerek yavaş yavaş karıştırılmış ve 5 dakika bekletilmiştir. Üzerine 150 µL, 3 M potasyum asetat ilave edilmiş ve karıştırılarak 5 dakika bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatantları toplanmıştır. 900 µL tüplere %100'lük etanol tüplere eklenmiş ve -20°C'de 1 gece bekletildikten sonra 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmış ve pelet üzerine %70'lik etanolden 1 mL eklenerek 15 dakika 13.100 rpm'de

santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmış ve pelet üzerine 20 µL su ve 5 µL örnek boyası ilave edilerek elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

#### **2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu**

İzole edilen Pb dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [234] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 15 mL'lik kültür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 5,7 mL TE tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz K ve RNAaz eklenerek 60 dakika 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NaCl tamponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C'de tekrar inkübe edilmiştir. Daha sonra kloroform/izoamil alkol solüsyonu eklenerek 5 dakika 13000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/kloroform/izoamil alkol tamponu eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika santrifüje edilmiş, etanol uzaklaştırılmış ve pelet kurutulurak 200 µL TE tamponu eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

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

%1,5'lük jel hazırlamak için 1,5 g agaroz 100 mL 10x TAE tamponu ile çözüldükten sonra ısıtılarak eritilmiştir. Çözelti yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulup, jel kutusuna dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Jel tamamen polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice ayrılmıştır. 20-25 µL'lik DNA örnekleri alındıktan sonra mikropipet ile vellelere 3 µL yüklenmiştir. Marker DNA olarak (Sigma Lambda DNA/Hind III) kullanılmıştır. 100 V/cm<sup>2</sup> voltaj uygulanarak 1,5 saatte yürütme işlemi tamamlanmıştır.



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

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel, elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuş ve jel üzerine  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonda etidyum bromid boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Jeldeki boyanın fazlası 1 mM  $\text{MgSO}_4$  solüsyonu ile 15 dakika muamele edilerek giderilmiştir. Daha sonra U.V. lambası üzerine konularak jelin fotoğrafları çekilmiştir [235].

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

Plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Lambda DNA/Hind III marker referans alınmış ve jel üzerinde marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların molekül ağırlıkları değerleri ile standart eğri çizilmiştir ve bu metod ile bilinmeyen DNA bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

Pb'ye dirençli suşun total proteinlerinin izolasyonu, Kishore ve arkadaşları [236] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda Pb içeren ve içermeyen 100 mL NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüjler yapılmıştır. Elde edilen peletlerin üzerine 5 mL distile su eklenerek 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Peletler üzerine 2 mL fosfat tamponu eklenmiş ve 10 dakika 50 devirde sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm'de 2 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatant temiz tüplere aktarılmıştır. 75  $\mu\text{L}$  örnek üzerine, 75  $\mu\text{L}$  örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez öncesinde örnekler  $100^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika kaynatılmıştır.

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

Total protein bantlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Page Ruler Prestained Protein Ladder (170 kDa) referans alınarak standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bantlarının yürüdüğü mesafe ve bantların bilinen molekül ağırlıkları standart eğri oluşturulmuş ve bilinmeyen protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

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

Total protein tayini Laemmli'ye [237] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

#### **2.2.16.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı**

16,7 mL akrilamid/bisakrilamid (%30'luk), 19,8 mL distile su, 12,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8.6), 500 mL %10'luk APS (amonyum persulfat), 500 mL %10'luk SDS karıştırıldıktan sonra 30 mL TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki cam arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

#### **2.2.16.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı**

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 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.

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

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

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

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, fiksasyon çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Bu işlemden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama 1 gün süresince boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk'lık aralıklarla 2 kez yıkanarak jellerdeki fazla boyanın giderilmesi sağlanmıştır [238]. Jel görüntüleme cihazında jellerin fotoğrafları beyaz ışıkta görüntülendi.

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

SDS-PAGE yapıldıktan sonra Coomassie Brilliant Blue-R boyalı bantlar, jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 2200 Pro) Carestream Molecular İmaging (Mİ) Software Standart Edition (SE) programı kullanılarak proteinlerin göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır. Protein bantlarının verdiği pik absorbans değerleri jel görüntüleme cihazı üzerinde kaydedilmiştir. Her bir bant için üç farklı yerlerde tarama yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. Yatay konumdaki protein bantları arasındaki mesafe iki bant arasındaki tepe noktalarının dik bir eksenle birleştirilmesiyle jel görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir. Bu oranların güvenilirliği bağımsız olarak programlanmış bilgisayar analizi kullanılarak belirlenen grafik ile desteklenmiştir [239].

### 3.ARAŞTIRMA BULGULARI

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

Kırıkkale - Kızılırmak üzerinde belirlenmiş olan 12 bölgeden alınan su örneklerinden Pb'ye dirençli suşlar izole edilmiştir. Çizelge 3.1'de belirtilen bölgelerdeki üreme durumlarına göre Pb dirençli 33 suş izole edilmiş, MİK değeri  $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$  olan bir izolat ileri çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir. 6. bölgeden izole edilen bu suş Pb 06 olarak adlandırılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Kurşuna dirençli suşların bölgelere göre dağılımı

Örnek Alınan Bölgeler ve Bakteri Üreme Durumları												
Ağır Metal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) : üreme yok, (+) : üreme var

#### 3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi Pb'ye dirençli Pb06 kodlu suşun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Belirlenen bu suşun akışkan, optik özellik bakımından saydam ve pigment renginin beyaz renkte olduğu belirlenmiştir. Pb06 suşunun hücre morfolojisini belirlemek için gram boyama yapılmış, Gr (+) olarak bulunmuştur. Pb 06 suşu, mikroskopta 100 büyütme objektif altında immersiyon yağı damlatılarak incelenerek gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin incelenmiş ve kok şeklinde oldukları belirlenmiştir. Bunun yanında farklı biyokimyasal testlere tabi tutularak tanımlanmıştır.

**Çizelge 3.2.** Kurşuna dirençli suşun (Pb 06) biyokimyasal özellikleri

<b>Ağır Metale Dirençli Suş</b>	
<b>Biyokimyasal Özellikler</b>	<b>Pb 06</b>
Şekil	Kok
Gram Reaksiyon	(+)
Akışkanlık	Akışkan
Optik Özellikler	Saydam
Pigment	Beyaz
Katalaz	-
Üre (URE)	+
Malonat(MLT)	+
Arabinoz(ARA)	-
Glukoz (OFG)	+
Mannitol(MAN)	+
Adonitol (ADO)	+
Glukoz (GLU)	+
Arjinin Hidrolaz	-
Ksiloz(XYL)	+
Arjinin (ARG)	-
Maltoz	+
Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S)	+
Eskülin (ESC)	-
Sorbitol (SOR)	+
Laktoz %10 (LAC)	+
Sükroz (SUC)	+
Alkalin Fosfataz	+
Oksidaz (OXI)	-
Tanımlanan Tür	<i>Enterococcus faecalis</i>

(-); negatif, (+); pozitif

### 3.3. İzole Edilen Bakterinin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

İzole edilen Pb dirençli *E. faecalis* suşunun metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Bu suşların dirençlilik sonuçları Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Kurşuna dirençli suşun metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri

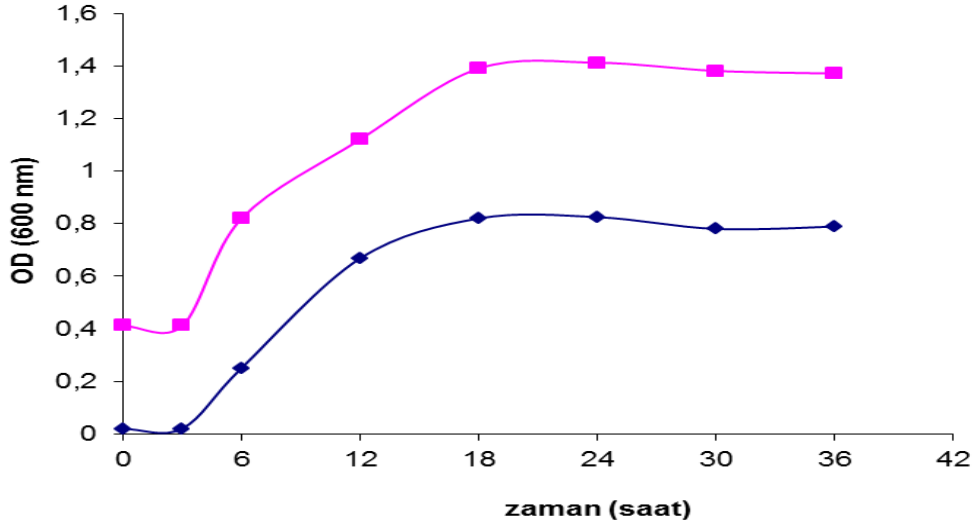
	Suş Adı	Metal Dirençlilik Profili	Antibiyotik Dirençlilik Profili
Kurşun Dirençli Suş	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ag, Al, Ba, Cr, Fe, Li, Ni, Sn, Sr, Zn	AK, ATM, GM

Ag: Gümüş, Al: Alüminyum, Ba: Baryum, Cr: Krom, Fe: Demir, Li: Lityum, Ni: Nikel, Sn: Kalay, Sr: Stronsiyum, Zn: Çinko AK: Amikasin, ATM: Aztreonam, GM: Gentamisin

Çizelge 3.3. incelendiğinde *E. faecalis* suşunun Ag ( $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Al ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Ba ( $2700 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Cr ( $1100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Fe ( $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Li ( $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Ni ( $395 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Sn ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Sr ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Zn ( $825 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) metallerine, AK ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ATM ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ve GM ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

### 3.4. Kurşun Dirençli Bakterinin Büyüme Eğrisi

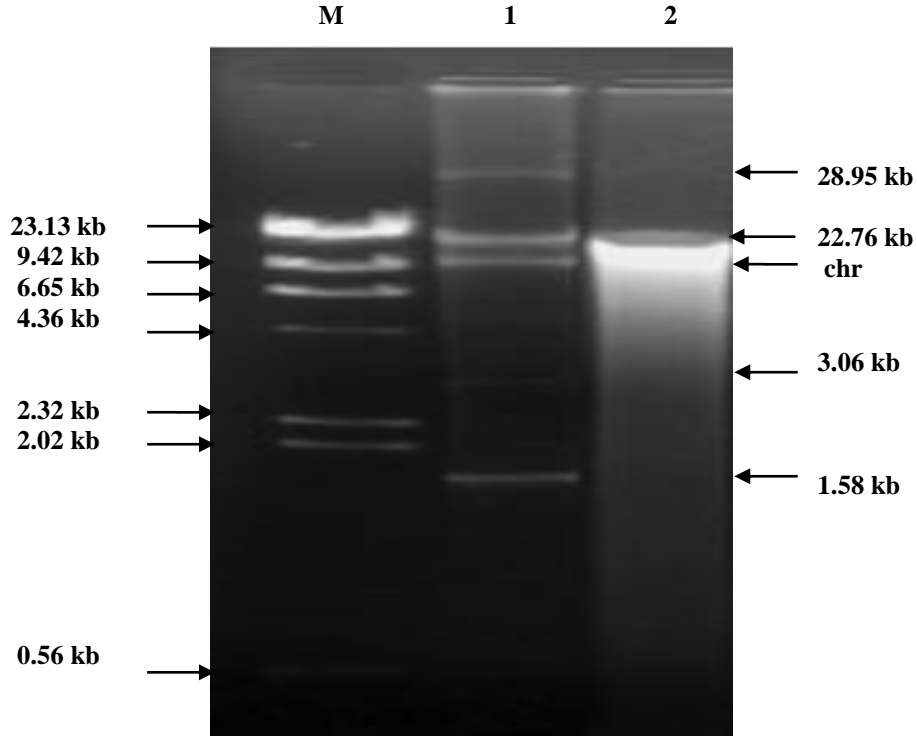
İzole edilen *E. faecalis* suşunun üreme eğrisi Şekil 3.1.'de verilmiştir. Suşun  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  içeren ortamda daha yüksek OD gösterdiği ve  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  içermeyen ortama göre logaritmik artış fazının daha uzun olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.1.** *E. faecalis* suşunun; ■ Pb içeren ortamdaki ◆ Pb içermeyen ortamdaki büyüme eğrisi

### 3.5. Kurşun Dirençli Bakterinin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri

Pb dirençli *E. faecalis* suşunun metal dirençliliği ile plazmit DNA arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla Pb içeren ve içermeyen ortamda üretilen bakterilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmitlerin molekül ağırlıklarını belirlemek amacıyla marker referans alınarak her bir jel için standart eğri çizilmiş ve plazmitlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda *E. faecalis* suşunun Pb içeren ortamda herhangi bir plazmit içermediği tespit edilmemiştir.



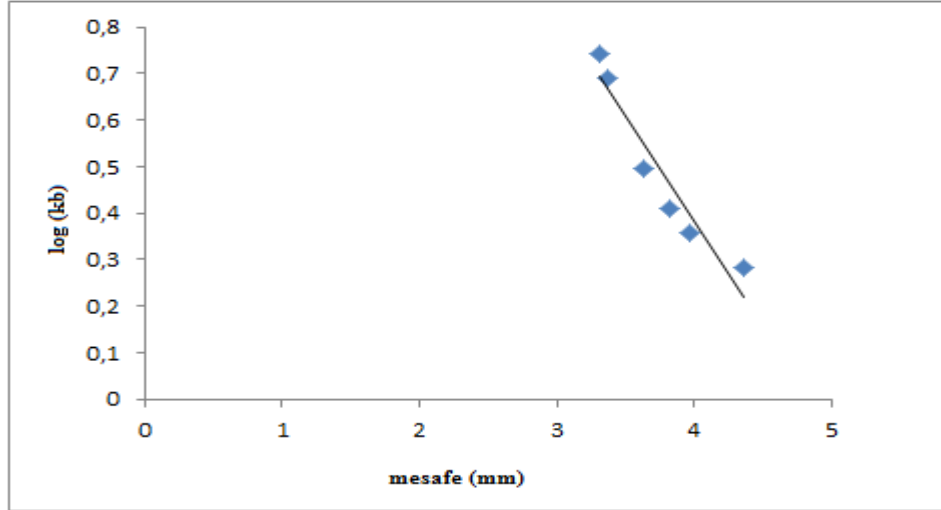
**Şekil 3.2.** *E. faecalis* suşunun plazmid ve kromozomal DNA lokasyonu

M: marker (Lambda DNA/Hind III), 1; plazmit DNA (Pb içermeyen ortam), 2; chr: kromozomal DNA

Şekil 3.2.'de gösterildiği gibi Pb dirençli olan *E. faecalis* suşunun metal içermeyen ortamda ise sırasıyla 28.95, 22.28, 3.06 ve 1.58 kb olmak üzere 4 plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Bu plazmitlerin Pb içeren ortamda ekprese olmadığı görülmüştür.

Sekil 3.3'de örneği gösterildiği gibi Lambda DNA/Hind III marker moleküler ağırlıkları referans alınarak her jel için elde edilen standart eğriden moleküler ağırlıkları bilinmeyen plazmit DNA'ların molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

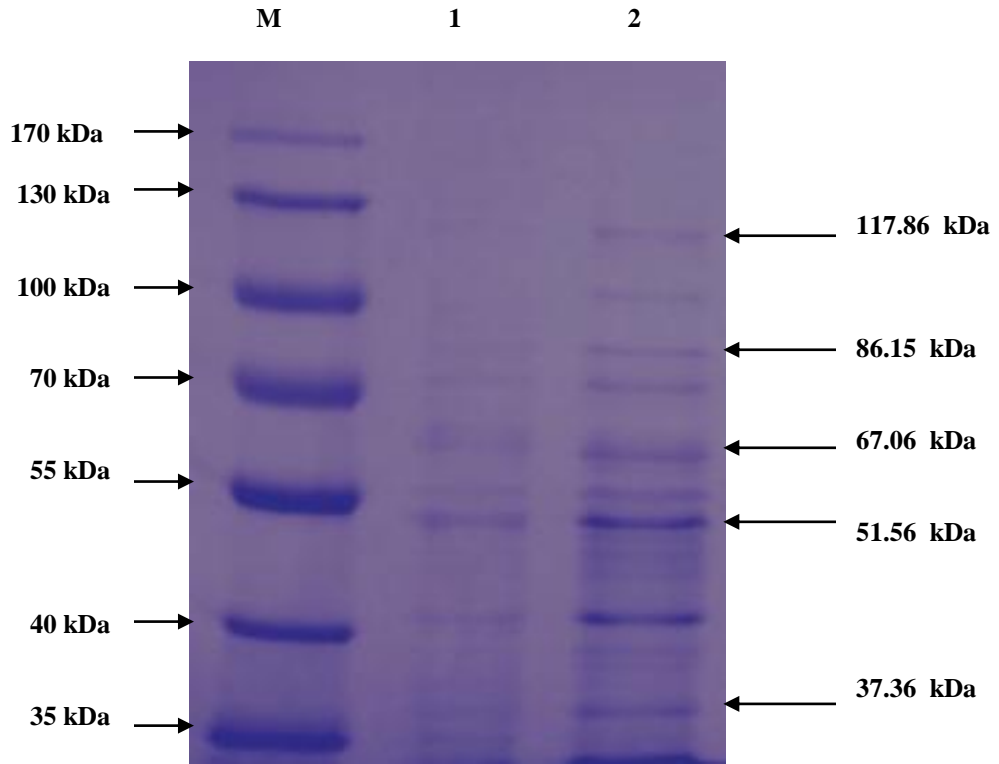




**Şekil 3.3.** Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

### **3.6. Kurşuna Dirençli Bakterinin Total Proteinini Analizi**

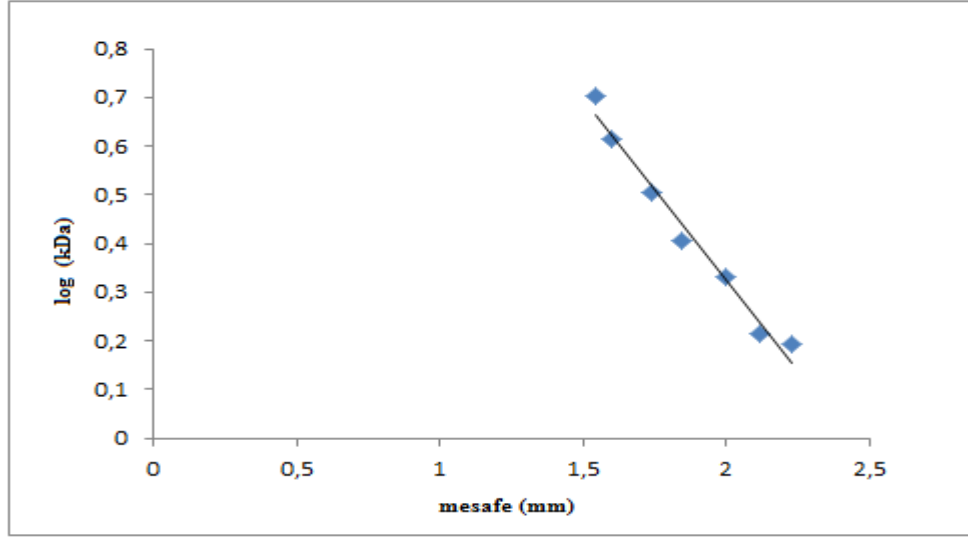
Pb dirençli *E. faecalis* suşunun metal içeren ve içermeyen ortamdaki total protein izolasyonu yapılmıştır. *E. faecalis* suşunun total protein profilleri çıkarılmıştır. Şekil 3.4.'de bulunan jel için marker referans alınarak Şekil 3.5.'te standart eğri çizilmiş ve molekül ağırlıkları bilinmeyen total proteinlerin molekül ağırlıkları tespit edilmiştir.



**Şekil 3.4.** *E. faecalis* suşunun total protein profili

M; marker (Page Rular Prestained Protein Ladder), 1; Pb içermeyen ortam, 2; Pb içeren ortam

Şekil 3.4.'de *E. faecalis* suşunun Pb içeren ortamdaki total protein izolasyonu sonucu 117.86, 86.15, 70.00, 67.06, 55.00, 51.56, 40.00 ve 37.36 kDa boyutlarındaki protein bantlarının ekspresyonunun metal içermeyen ortama göre arttığı görülmüştür. Ekspresyonu artan bantların yoğunlukları ölçülmüş ve buna göre yoğunlukların sırasıyla 117.86 kDa'lık bandın 2.9 kat, 86.15 kDa'lık bandın 4.1 kat, 70.00 kDa'lık bandın 5.8 kat, 67.06 kDa'lık bandın 2 kat, 55.00 kDa'lık bandın 3.4 kat, 51.56 kDa'lık bandın 2.6 kat, 40.00 kDa'lık bandın 3.8 kat ve 37.36 kDa'lık bandın ise 2.5 kat arttığı belirlenmiştir.



**Şekil 3.5.** Total protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

#### 4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örnekleri analizi sonucu 33 Pb dirençli bakteri izole edilmiş, bu bakterilerden en yüksek MİK değeri gösteren suşun 6. (Bucakyazı-Sazbucağı Mevki) ve 10. (Aşağıyazı Kum Ocağı Mevkii) bölgelerden izole edildiği anlaşılmıştır. Bu suş için maksimum MİK değeri  $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınan bu suş *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır.

*E. faecalis* suşunun; Pb içeren ve içermeyen ortamdaki büyüme eğrisi çizilmiş ve bu suşun Pb içeren ortamda daha etkin üreme gösterdiği belirlenmiştir. Su kirliliği çalışmalarında, lağım sularından kaynaklanan kirliliğin net bir göstergesi *Enterococcus* bakteri cinsinin varlığı kabul edilmiştir. Enterokoklar çok tehlikeli bakteri olmamasına rağmen, kolayca tespit edilebilir; yaygın olarak onlar kirli su tüketen insanlar arasında dağılır ve sık hastane enfeksiyonu ile izole edilir. Bakterilerin bu cinsinin en önemli özelliği, barındırdığı yaygın çeşitli-antibiyotik direncidir, hastane hizmeti içinde meydana gelen insan vakalarının kontrolünü yapmak çok zordur. *Enterococci* bakterilerinin diğer dikkat çeken özelliği, koliform bakterilerin aksine hem kimyasallara hem de ağır metallere olan direncidir [240].

*Bacillus thuringiensis* ve *Paenibacillus* bakteri üremesi üzerine Pb'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır [241]. Bu suşların yüksek konsantrasyonlarda daha düşük konsantrasyonlara göre daha iyi bir üreme gösterdiği belirlenmiştir. Mevcut çalışmada,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 'ya yüksek konsantrasyonlarda daha iyi dirençli bakteri *Bacillus* spp. olarak saptanmıştır. Bu bakterinin büyümesi kültürüne Pb eklendiği zaman artmaktadır. Ancak bu artış logaritmik büyüme evresinin yarısından itibaren ortada kısa bir duraklamadan sonra aniden başlar. Bu kültür ortamında mevcut Pb'nin ortadan kaldırılması bu bakterinin yeteneğini gösterir. Sürekli Pb stresli koşullarda temas eden bu bakterinin ortama adapte olduğu şüphesizdir. Bu çalışma sonucunda dirençli bakterilerin büyüme eğrisi değerlendirilmiştir [241]. Xie ve arkadaşları [242] bakterilerin dirençli suşlarının gelişimi üzerine Pb'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırmıştır. Onlar Pb'nin toksik konsantrasyonları Pb dirençli bakterilerin büyüme eğrisi üzerinde çok az etkisi

olduğunu göstermiştir. Bu etki Pb duyarlı bakteriler üzerinde çok fazla iken, sadece Pb dirençli bakteriler tarafından toksik etkilerin tolere edilebildiği belirlenmiştir [242]. Lugauskas ve arkadaşları [243] tarafından Pb'nin ortadan kaldırılması dirençli bakteriler izole edilmiş ve yüzde bakımından araştırılmıştır. Pb dirençli bakterilerin Pb gidermede yüksek güce sahip olduklarını göstermişlerdir.

Bir insan patojeni olan *Enterococcus*'un, iki farklı kaynak tarafından bulaşması bir nehrin bakteriyel popülasyonu üzerinde ciddi bir etki meydana getirebilir. *Enterococcus* antibiyotik veya ağır metal ya da her ikisine de direnç oluşabilecek ırmak akıntılarında bakterilerin iki ayrı alt popülasyon oluşumunu etkileyebilir. Bu rapor kanıtları ırmakların kirlenmesinin sadece ekolojik açıdan etkisinin olabileceğini değil önemli patojenlerin insanı sağlığına bir doğrudan etkileyebileceğini göstermiştir [240].

Bakteri izolatlarının dağılımındaki farklılığı belirlemek için yapılan ilk işlem bakterileri bulunduğu ortamdan saflaştırmaktır. Böyle bir amaç için Mondragón ve arkadaşları [240] belirlenen konumlardan 48 örnek toplamıştır. Toplamdaki bu örneklerden 38 *E. faecalis* izole edilmiştir. İzole edilen diğer bakteri izolatlarındaki dirençlilik 38 *E. faecalis* kadar belirgin olmamıştır. Bu nedenle, tüm ağır metal dirençliliği ve antibiyotik direnci testleri insan sağlığı üzerinde doğrudan etkisi olabilecek önemli bir insan patojeni olduğunu düşünülen *E. faecalis* suşları ile gerçekleştirilmiştir.

Mondragón ve arkadaşları [240] ağır metal dirençliliğine sahip izolatların metal kaynağı yakınında belirgin olmayan Hg'ye %100 direnç gösterdiğini ve izolatların geriye kalanları ise %86.8 Cr, %42.1 Cd dirençli bulunduğunu belirtmişlerdir.

Genel sonuçlar dikkate alındığında Mondragón ve arkadaşları [240] *E. faecalis* suşlarında kısmi dağılım önermişlerdir. Bu hipotezi test etmek için, farklı örnekleme yerlerinde ağır metal dirençliliği olan *E. faecalis* suşları % cinsinden analiz edilmiştir. PL ve PP diye isimlendirilen bölgeye ait izolatların Cr'ye dirençliliği sırasıyla %77.8 ve %72.7 olarak bulunmuştur. AT ve LI diye isimlendirilen bölgeye ait izolatların Cr'ye dirençliliği %100 bulunmuştur. Hg ve Cr için AT ve LI

bölgelerinde gözlenen frekansların aksine, Cd için gözlenen değerler %37.5 ve her bir bölge için ise %70 olarak bulunurken; PL ve PP bölgeleri için ise sırasıyla %33.3 ve %27.3 olarak bulunmuştur.

Cd, Cr ve Hg gibi metaller endüstriyel atıklarda normal olarak bulunan metaller olduğundan çöplerin depolanması atıkların tek varlığı olarak bu durumu açıklamayı sağlayabilir. Ancak, en güçlü değişken genel nüfustan ayrı olarak evde oluşturulan atıklar, (inorganik ve organik) uygun depolanmayan pil atıkları ve diğer zehirli atıklar için kullanılan ilgi eksikliği olduğu gerçektir [240].

Suların enfeksiyona yol açan bakteriler tarafından kontaminasyonu, onların yayılmasına yol açabilir ve sularda bazı ağır metallerin varlığı ağır metaller veya antibiyotiklere veya her ikisine de dirençli bakterilerin seçimine yol açabildiğinden atıksu yönetimi önemlidir. Bu sorunlar, atık yönetimi düzenleyen politikalarının etkin uygulanmasını gerektirir [240].

Ağır metallerin varlıkları bakterilerin yaşam ortamında seçimde baskı oluşturmaktadır. Bakteriler ağır metallerin kesin bir biçimde varlığında, anahtar mekanizma olarak yatay gen aktarımı ile yaşamını yöneten geniş stratejiler dizisi oluşturarak seçilir. Temel mekanizma ise hastanelerde antibiyotik ile tedavi edilmiş insanlara ait tıbbi atıkların ve çöp kapatma kaynaklarının ırmağa döküldüğü lağım sularındaki yatay gen transferidir [240]. Mondragón ve arkadaşları [240] yaptığı çalışmada, Molala Irmağında yatay gen aktarımının çoğunlukla, ağır metal ve antibiyotik dirençli bakterilerin birlikte bulunması ile mümkün olacağını belirtmişlerdir. Bu izole edilen klinik bakteri örneklerinde en azından bir ağır metal dirençliliği ve bir veya daha fazla antibiyotik dirençliliği gözlemlenmiştir.

Mondragón ve arkadaşlarının [240] yaptığı çalışmada genel antibiyotik direnci modeli belirtilen gibi olmuştur: En yüksek siprofloksasin (%100.0) ve kanamisin (% 84.2), vanomisin (%15.7) iken gentamisin (%13.15), düşük ampisilin (%7.8) direnci bulmuşlardır. Farklı örnekleme bölgeleri arasında antibiyotik direnç dağılımında analiz edilmiştir. Gentamisin dirençli izolatlar bölge PL'de bulunmuştur. Direnç örneklerinin dağılımı ile ilgili en alakalı sonuç nehrin ana akımına göre en

uzak örnekleme noktası bölgesi PP'de vardır. Bu güçlü nehir akışının sunduğu yaygın model ile ilişkilidir. Tüm örnekleme bölgelerinde sayısız izolat olduğu için belirlenen güçlü direnç örnekleri, MİK değeri olarak belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerin sadece %7.8'i ampisilin ve gentamisin'e belirtilen yoğunluklara kadar direnç göstermiştir. Sırasıyla 10 ve 120 µg mL<sup>-1</sup> olarak dirençlilik bulunmuş ve toplam izolatların %2.6 ampisilin'e direnç göstermiştir. Toplamda izolatlar gentamisin için 30 ve 140 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında direnç göstermişlerdir. İzolatlar çok miktarda kanamisin (%73.7) dirençliliği göstermiştir. 170 µg mL<sup>-1</sup>'ye dirençli bulunurken yine de, %13.1 artış oranında 200 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarına da dirençli bulunmuşlardır. Siproflaksasin ile ilgili olarak, %65.8 dirençlilik bulunmuştur. İzolatlar %15.8 kadar artış oranında da büyüyebilirler. Sırasıyla, 4 ve 5 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlara dirençli olmuşlardır.

Mondragón ve arkadaşlarının [240] yaptığı çalışmada kanalizasyon ve potansiyel insan kaynaklı kontaminasyon varlığı su kirliliğini ikinci kez doğrulamıştır. Mololoa Nehrindeki kanalizasyon deşarjı ile kirlenen şehir sularında *E. faecalis* saptanmıştır. Buna ek olarak, muhtemel nedenle istatistiksel olarak anlamlı farkın ortaya çıkmasında bakterilerin hayatta kalmak için direnci sistemleri dağılım yeteneğine sahip olmaları etkili olmaktadır. İstatistiksel yöntemler göstermektedir ki bakteriler hem ağır metale hem de antibiyotiğe direnç gösteren alt popülasyon oluşturabilmektedir. Bu durumun kontrolünü ve yayılmasını insan sağlığı ile ilgili tehlikeli atıklar belirlemektedir (hem biyolojik hem de kimyasal atıklar).

Laplace ve arkadaşları [244] kamuya açık alandan izole ettikleri *E. faecalis* izolatının bulunduğu ortama 0.05 µg mL<sup>-1</sup>'den 50 µg mL<sup>-1</sup>'ye kadar değişen konsantrasyonlarda Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> ağır metallerini eklemişler, her bir metal için MİK değeri belirlemişlerdir. Cd, Cu, Mn ve Pb için MİK değerini 50 µg mL<sup>-1</sup> olarak bulurlarken, Hg için ise MİK değerini 5 µg mL<sup>-1</sup> olarak belirlemişlerdir.

Matyar ve Dinçer [230] İskenderun Körfezi kıyı şeridi boyunca farklı noktalardan steril bakteriyolojik su numune şişesi kullanarak deniz yüzeyinden 20 cm aşağıdan deniz suyu örnekleri almışlardır. Bu çalışmada Akdeniz' den izole ettikleri 158 adet

*E. faecalis* bakteri izolatları için 12.5 µg mL<sup>-1</sup>'den 3200 µg mL<sup>-1</sup>'ye kadar değişen konsantrasyonlarda Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> ağır metallerini ihtiva eden Mueller-Hinton agar kullanarak MİK değerlerini belirlemişlerdir. Antibiyotik dirençliliği çalışmalarında yüksek antibiyotik dirençliliğini gentamisine (%98.7), siproflaksine (%77.8), imipeneme (%77.2) ve levofloksasine (%72.8) karşı bulmuşlar, en az dirençliliği ise vankomisine (%3.2) minosikline (%13.3) ve kinopristin-dalfopristine (%13.3) karşı bulunmuşlardır. Linezolid karşı hiçbir izolatın dirençlilik göstermediğini tespit etmişlerdir.

Nakipoğlu ve arkadaşları [245] İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan hastalardan alınan dışkı veya rektal sürüntü örneklerinden izole edilen ve glikopeptidlere duyarlılıkları saptanan 39 adet *E. faecalis* suşu ile çalışmışlardır. Vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), yüksek dirençli gentamisin (120 µg) ve yüksek dirençli streptomisin (300 µg) diskleri kullanmışlardır. *E. faecalis* suşlarının Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve As<sup>5+</sup> dirençliliklerini belirlemek amacıyla bu ağır metallerin çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir ağır metal için 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM, 0.005 mM olmak üzere seri konsantrasyonlarda ağır metal içeren Mueller Hinton agar besiyerleri hazırlamışlardır. Günümüzde ağır metallere ait belirlenmiş MİK direnç sınır değerlerinin bulunmaması nedeniyle bu konuda yapılan çeşitli çalışmalardan yararlanarak direnç kriterleri oluşturmuşlardır. MİK değerleri As için ≥ 10 mM, Cd ve Pb için ≥ 1 mM ve Hg için ≥ 0.1 mM olan suşları dirençli olarak kabul etmişlerdir.

Nakipoğlu ve arkadaşları [245] çalışmaya aldıkları 39 *Enterococcus* suşunun 20'sinin glikopeptidlere dirençli (11'i vankomisin ve teikoplanine, 9'u vankomisine), 19'unun ise duyarlı olduğunu saptamışlardır. Vankomisin ve teikoplanine dirençli 11 izolatın 10'unda ve glikopeptidlere duyarlı izolatların 8'inde, yüksek düzeyde aminoglikozitlere direnci saptanmışlardır. Suşların tümünün (%100) Pb'ye (MİK: 2.5-5 mM), bir suşun (%2.6) Hg'ye (MİK: 0.005-0.25mM), bir suşun (%2.6) ise As'ye dirençli (MİK: 0.1-10 mM) olduğu belirlenirken Cd direncine rastlamamışlardır. Çalışmalarında, suşların %71.8'inde (28/39) antibiyotik (aminoglikozid ve/veya vankomisin ve/veya teikoplanin) ve ağır metal (Pb ve As



ve/veya Hg) direncinin bir arada bulunduğu belirlemişlerdir. *E. faecalis* suşu için elde edilen MİK değerleri; As için 0.25, Cd için 5, Hg için 0.25 ve Pb için 10 mM olup, As ve Hg'ye duyarlı, Cd ve Pb'ye dirençli olarak saptanmıştır.

Abou-Shanab ve arkadaşları [246] Gr (+) ve Gr (-) toplam 46 suş ile yaptıkları bir çalışmada, Pb direncini %100 (MİK: 5-15 mM), As direncini %18 (MİK: 10-20 mM), Hg direncini %29 (MİK: 0.1-0.5 mM) ve Cd direncini %42 (MİK: 1-5 mM) olarak bulmuşlar ve toprakta bulunan ağır metallerin dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ise, *E. faecalis*'in Pb'nin yanında Ag ( $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Al ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Ba ( $2700 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Cr ( $1100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Fe ( $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Li ( $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Ni ( $395 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Sn ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Sr ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Zn ( $825 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) metallerine de dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca amikasin, aztreonam ve gentamisin antibiyotiklerine karşı da dirençlilik bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmada elde edilen MİK değeri daha yüksek olarak öne çıkmaktadır. Bu durum söz konusu izolatin Pb metaline karşı yoğun baskı altında olması sonucu daha yüksek konsantrasyonda bir direnç geliştirdiği şeklinde açıklanabilir. Ayrıca *E. faecalis*'in ırmak suyunda bulunması suya kanalizasyon su ve/veya atıklarının karıştığını vurgular niteliktedir.

Yapılan çalışmalar, uzun vadeli ve kısa vadeli ağır metal stresine maruz kalındığında yüksek sıcaklık, pH veya kimyasal kirlilik gibi etkenlerde, suda yaşayan bakteri popülasyonlarının tür çeşitliliğinde ve plazmit insidansında farklılıklar görülmektedir. Bazı mikrobiyal suşlar direnç için genetik belirleyicilere sahiptir. Bakterilerde bu belirleyiciler sıklıkla plazmitlerin üzerinde bulunur. Toksik kimyasal atıkların olduğu bölgede izole edilen bakteriler temiz sulardan izole edilen bakterilere göre daha sıklıkla plazmit DNA içerirler ve antibiyotik dirençliliği gösterirler [247]. Aynı zamanda bakterilerin birçoğunda ağır metal dirençlilik genlerinin plazmidler üzerinde kodlanmış olarak buldukları bilinmektedir [248]. Bakteriler, yeni antibiyotiklere ve kimyasallara dirençli duruma geldikçe, değişik ortam şartlarına kolayca uyum sağlayabilmekte ve bu olayda plazmid adı verilen ekstra kromozomal DNA yapılarının taşıdıkları dirençlilik bilgisi önemli rol oynamaktadır. İnsan

ve hayvanlar, R plazmidlerinin en önemli rezervuarlarını oluştururlar Enterik bakterilerin rezervuarı olan kanalizasyon sularının, arıtılmaksızın sucul ortamlara katılımı, R- plazmidlerinin geniş alanlara yayılmasına neden olur [249].

Bu çalışmada Pb dirençli olan *E. faecalis* suşunun metal içermeyen ortamda 28.95, 22.28, 3.06 ve 1.58 kb olmak üzere 4 plazmit içerdiği tespit edilmiştir. Bu plazmitlerin Pb içeren ortamda ekprese olmadığı görülmüştür. Bu bulgulardan yola çıkarak suşun içerdiği 4 plazmitten herhangi birinin Pb dirençlilik genleri taşımadığı bu dirençliliğin kromozomal DNA üzerinde olan genler sayesinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Deniz suyundan izole edilen bakterilerin ağır metal dirençlilik düzeylerinin yüksek olması ve özellikle dirençlilik değerlerinin organize sanayi bölgelerine nispeten diğer bölgelerde daha da fazla olduğu bilinmektedir. Bu tür yerlerde yaşayan bakteriler arasında yayılmayı ve değişen çevre koşullarına uyumu kolaylaştıran dirençlilikte plazmidlerin etkisi çok önemlidir. Çeşitli habitatlarda yapılan birçok çalışmada metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmidler ve konjugatif transpozonlar üzerinde kodlandığını ve yayıldığını gösterilmektedir [249].

Kromozomal ve plazmide dayalı temel metal dirençlilik sistemleri arasında bazı farklar vardır. Temel metal dirençlilik sistemleri genelde kromozom kökenlidir ve plazmid sistemlerinden daha komplekstir. Diğer organizmalara hızlı bir şekilde taşındıkları için ve gen üzerindeki taşıma yükünü azalttıkları için iyon akış mekanizmalarının plazmidler üzerinde taşınmaları çok büyük bir olasılıktır [250].

Bazı bakterilerin diğerlerinden daha yüksek  $Pb^{+2}$  konsantrasyonlarında büyümesinden dolayı, bakteriyel Pb direnci uzun süre çevresel mikrobiyoloji çalışmalarında ilgi çekmiştir.  $Pb^{+2}$  direnci için belli bir mekanizma yoktur, ancak, farklı mekanizmalara sahip farklı bakteri türleri de vardır. Gr (-) *Ralstonia metallidurans* suşu biri pMOL28 (163 kb) ve diğeri pMOL30 (238 kb) olmak üzere toksik ağır metaller için bulunan direnç kodlayan iki endojen megaplazmide sahiptir. Bu belirleyicilerinden biri pMOL30 üzerinde bulunan direnç bölgesi  $Pb^{+2}$  direncinde rol oynamaktadır [189].

Raja ve Selvam [220], yağ fabrikası atık sularından izole ettikleri *P. aeruginosa*'nın Cd, Cr, Ni ve Pb metallere karşı direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. Transformasyon ve plazmid curing deneyleri sonucunda; Ni ve ampicillin direnç geninin plazmid DNA tarafından kodlandığı, Cd direnç geninin, Cr ve Pb direnç genleri ile birlikte kromozomal DNA üzerinde olduğu anlaşılmıştır.

Laplace ve arkadaşları [244] doğal yaşam ortamlarının mikroorganizmaların büyümesi için her zaman uygun olmayacağını belirtmişlerdir. Bu tür stresli koşulların spesifik olarak ortaya çıkmasıyla bilinen gen ifadesinde değişiklikler ve protein sentezinin artması dahil olmak üzere çeşitli tepkilere yol açacağını saptamışlardır. Bu polipeptidler iki sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıftakiler, çevresel streslere karşı genel stres proteinlerini içerir. Örneğin, çok zor koşullarda büyümeye yeteneği olan aerotolerant *E. faecalis* bakterisinin kimyasal kirliliğin olduğu yerlerde ısı şoku ile uyarılan proteinlerine bağlı olarak gelişen ve büyüme koşulları içinde oluşan çeşitli modifikasyonları vardır. Bununla birlikte stres proteinleri induksiyonu, özel bir stres için de özel olabilir. Moleküler biyolojideki gelişmeler, gen yapısı ve fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak çevre için moleküler yöntemleri uygulamayı kolaylaştırmıştır. Bu bağlamda stres proteinleri, çevresel kirliliğin varlığını göstermede biyolojik gösterge olarak çevresel kirliliği izlemek için umut verici bir araç olarak olabilir.

Bu çalışmada, *E. faecalis* suşunun Pb içeren ortamdaki total proteinin 117.86, 86.15, 70.00, 67.06, 55.00, 51.56, 40.00 ve 37.36 kDa boyutlarındaki protein bantlarının ekspresyonunun metal içermeyen ortama göre arttığı görülmüştür. Ekspresyonu artan bantların yoğunlukları ölçülmüş ve buna göre yoğunlukların sırasıyla 117.86 kDa'lık bantın 2.9 kat, 86.15 kDa'lık bantın 4.1 kat, 70.00 kDa'lık bantın 5.8 kat, 67.06 kDa'lık bantın 2 kat, 55.00 kDa'lık bantın 3.4 kat, 51.56 kDa'lık bantın 2.6 kat, 40.00 kDa'lık bantın 3.8 kat ve 37.36 kDa'lık bantın ise 2.5 kat arttığı belirlenmiştir. Pb içeren ortamdaki *E. faecalis*'in total proteinlerinin ekspresyonunun artması Pb dirençliliğinde bu proteinlerin etkisinin olduğunu göstermektedir.

Laplace ve arkadaşları [244] Cd'nin bulunduğu ortamda *E. faecalis* kültürlerinin birçok protein sentezinde artış olduğunu belirlemişlerdir. Cd'ye maruz kalmış *E. faecalis* kültürlerinin çeşitli proteinlerinin sonuçları sentezinde artış olduğunu göstermektedir. *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.

Pb direnci Gr (+) bakterilerde hücre içi biriktirme şekliyle görülürken, Gram (-) bakterilerde ATPaz akış sistemiyle görünmektedir. Artan  $Pb^{+2}$  alımı sitoplazmada aşırı duyarlılığa neden olur. Bakterilerin membranında bulunan periplazmik proteinlerinin yan zincirleri  $Pb^{+2}$  alımını azaltmak için etkileşime girerler. Bir kez sitoplazmaya girmiş  $Pb^{+2}$  iyonu *PbrA* proteinin işlevsel etkisiyle ATPaz tarafından dışarı atılır. *PbrD* proteini de burada yardımcı rol alır. Tam Pb dirençliliği için *PbrB* ve *PbrC* gereklidir. Gr (-) *Cupriavidus metallidurans* bu tür mekanizma vardır [251].

$Pb^{+2}$  için *Staphylococcus* spp. ve *Citrobacter freundii*'de intraselüler  $Pb_3(PO_4)_2$  granülleri oluşturarak  $Pb^{+2}$  etkisini en aza indirgediği belirlenmiştir. Ayrıca plazmitlerin de etkin rol oynadığı bildirilmiştir [251].

Kafilzadeh ve arkadaşları [241] tarafından yapılan mevcut araştırmada, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Corynebacterium* spp. bakterilerinin Pb'ye yüksek dirençli oldukları belirlenmiştir. Pb'ye dirençli bakterilerin bir taşıyıcı fosfataz-protein kullanarak bu ağır metal ile kirlenmiş bölgelerdeki hayatta kalabildikleri belirlenmiştir [241]. Çevre kalitesindeki değişimleri tespit edebilmek için hızlı ve hassas ölçümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kirlenmiş ortamdaki stresi artıran bu faktörler, çok çeşitli indüksiyona yanıt olmaları ile yararlı olabilirler. Bu tür kirleticilerin varlığı, tüm olası kirleticilerin tespitinde olmasa bile, bu yanıtların algılanmasında verilen bir örnek, bir alarm sinyali olarak hizmet verebilir. Bu nedenle, biyosensörler kullanarak ortamda kimyasal ajanların tespiti için geliştirilen yöntemler şu anda diğer kullanılan yöntemlere tamamlayıcı olabilir. Bu sonuçlara

göre *E. faecalis*'teki *csrA* geninin varlığı ağır metaller ile indüklenir. Toksik metallerin çok düşük konsantrasyonlarda bulunmasında bile yanıt veren bu genin tanımlanması toksik kirletici ajanların izlenmesi için yarar sağlayabilir [244].

Yapılan bu tez çalışması ile Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen Pb dirençli suş biyokimyasal ve moleküler özellikleri bakımından incelenmiştir. Biyokimyasal özellikler esas alınarak Pb dirençli suş tanımlanmış, tanımlanan bu suşun metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiş, metal bulunan ve bulunmayan ortamlarda büyüme eğrileri çıkarılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında plazmit DNA, kromozomal DNA ve protein profilleri belirlenerek, bu profillerin metal dirençlilik mekanizması ile ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Çalışmalar sonucunda tanımlanan suşun biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmak için bir potansiyel oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu suşun biyoremediasyon yeteneklerinin net olarak belirlenebilmesi için laboratuvar ölçeğinde yapılacak olan biyoreaktör çalışmaları ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Bat, L., Öztürk, M., Öztürk, M., Heavy metal concentrations in some fish and common crab from the Black Sea coast. 148-155, Turkey. II. Spil. Fen Bilimleri Serisi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Ed. Fak. Dergisi, Manisa, 1998.
- [2] Bat, L., Öztürk, M., Öztürk, M., *Patella caerulea* as a Biomonitor of Coastal Metal Pollution. 142-147, Turkey II. Spil. Fen Bilimleri Serisi (Biyoloji), Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Ed. Fak. Dergisi, Manisa, 1998.
- [3] Bat, L., Çulha, M., Akbulut, M., Gündoğdu, A., Sezgin, M., Toxicity of zinc and copper to the hermit crab *Diogenes pugilator* (Roux). 39-48, Turkish J. Mar. Sci., 1998.
- [4] Rashed, M.N., Biomarkers as indicator for water pollution with heavy metals in rivers, seas and oceans. Egypt South Valley University, 2002.
- [5] Kautshy, L., Monitoring eutrophication and pollution in estuarine environments- focusing on the use of benthic communities. Pure and Appl. Chem., 70 (12): 2313-18, 1998.
- [6] Anonim, Türkiye'nin Çevre Sorunları. Türkiye Çevre Vakfı, Yayın No:131, Ankara, 1998.
- [7] Güley, M., Vural, N., Toxicology. Ankara University Faculty of Pharmacy Publication, 500, In Turkish, 1987.
- [8] Tümen, F., Bildik, M., Baybay, M., Cici, M., Solmaz, B., Pollution potential of Ergani copper smelter's rigid wastes. Doğa Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 16, 43-53, 1992.
- [9] Kaya, S., Akar, F., Metaller ve diğer inorganik maddeler metaller. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2. Baskı, 207-239, Medisan Yayınları, Ankara, 2002.

- [10] Rosborg, I., Nihlgard, B., Gerhardsson, L., Gernersson, M.L., Ohlin, R., Olsson, T., Concentrations of inorganic elements in bottled waters on the Swedish market. *Environ. Geochem. Health*, 27 (3): 217-227, 2005.
- [11] Cinier, D.C.C., Ramel, M.P., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., Kinetics of Cd accumulation and elimination in Carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C.*, 122: 345-352, 1999.
- [12] A. Rether, Entwicklung und Charakterisierung was serlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi, Münih Teknik Üniveritesi, Almanya, 2002.
- [13] <http://www.umweltbundesamt.de/uba-infdatent/daten/umweltkatastrophen.Html> (Erişim tarihi: 25.05.2011)
- [14] Kitman, J.L., The secret history of lead. *The Nation*, 2000.
- [15] Nriagu, J., Saturnine Gout Among Roman Aristocrats, Did lead poisoning contribute to the fall of the empire. *N. Engl. J. Med.*, 308: 1, 1983.
- [16] WHO., Major Poisoning episodes from environmental chemicals. Geneva, 3-15, 1992.
- [17] Şahin, Ü., Çevresel etkenlere bağlı hastalıklar. Maltepe Sağlık Grup Başkanlığı, Çevre Sağlığı Kursu, 2003.
- [18] Ş. Göker, İstanbul çocuklarında kan kurşun taraması. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul, 1996.
- [19] Wiener, P., Müller-Graf, C., and Barcus, V., Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research. *Reviews in Undergraduate Research*, Vol. 2: 1-6, 2003.

- [20] Silver, S., Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27: 1-3, 1992.
- [21] Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W., Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotox. Environ. Safe.*, 45: 198-207, 2000.
- [22] Leahy, J.G. and Colwell, R.R., Microbial degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Res.*, 54 (3): 305-315, 1990.
- [23] Z. Güven, Kırıkkale Kenti Açık ve Yeşil Alan Sisteminin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Peyzaj Mimarlığı ABD, Ankara, 1992.
- [24] E. Karadeniz, Kırıkkale'de Şehirselsel Gelişme.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Coğrafya (Beşeri ve İktisadi Coğrafya) Anabilim Dalı, Ankara, 2005.
- [25] Özcan, K., Sürdürülebilir Kentsel Gelişmede Açık-Yeşil Alanların Rolü Kırıkkale, Türkiye Örneği. Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, Ekoloji, 15, 60, 37-45, Konya, 2006.
- [26] E. Sevgi, Ağır metalle kontamine olmuş topraktan metal iyonlarına dirençli bakterilerin izolasyonu ve bu dirençliliğin plazmidlerle olan ilişkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2007.
- [27] <http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C4%B1z%C4%B1%C4%B1rmak> (Erişim tarihi: 11.10.2011)
- [28] Atalay, B., Sanayileşme ve Sosyal Değişme (Kırıkkale Araştırması). DPT, 59, Ankara, 1983.



- [29] Bakan, G., Böke-Özkoç, H., Tülek, S., Cüce, H., Integrated Environmental Quality Assessment of Kızılırmak River and its Coastal Environment. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10: 453-462, 2010.
- [30] Ayan, A.K., Kızılırmak Deltası'nda Doğal Kaynak Kullanımı. 9-12, 2007.
- [31] G. Özer, Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, 2011.
- [32] [www.oup.com/us/companion.websites/9780199760060/evolution?](http://www.oup.com/us/companion.websites/9780199760060/evolution?) (Erişim tarihi: 24.03.2012)
- [33] Çabuk, A., Akar, T., Kotluk, Z., Şaşmaz, S., *Saccharomyces cerevisiae* Hücreleri ile Ağır Metal Giderimi ve Metal Toleransı. 1-7, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 05, Sayı: 3, 2007.
- [34] Alloway, B.J., ed., Heavy Metals in Soils. 2nd ed., Chapters 6, 8, 9 and 11. ,Chapman and Hall, Glasgow, UK,1995.
- [35] McDonald, D.G., Grandt, A.F., Limestone-Lime Treatment of Acid Mine Drainage-Full Scale. EPA Project Summary, 1981.
- [36] Wilmoth, R.C., Kennedy, J.L., Industrial Environmental Research Laboratory, Removal of Trace Elements from Acid mine Drainage. 1979.
- [37] Drever, J.I., The Geochemistry of Natural Waters, Surface and Groundwater Environments. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1997.
- [38] Wang, W., Zhenghe, X., Finck, J., Fundamental Study of an Ambient Temperature Ferrite Process in the Treatment of Acid Mine Drainage. Env. Sci. and Tech., 30, (8), 2604-2608, 1996.

- [39] Horsfall, M., Jr., Abia, A.A., Spiff A.I., Removal of Cu (II) and Zn (II) ions from waste water by cassava (*Manihot esculenta* Cranz) waste biomass. African J. of Biotech., 2, 360-364, 2003.
- [40] Hussein H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K., Et. al., Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* spp. Electronic Journal of Biotechnology, 1, 7, 38-46, 2004.
- [41] Bayramoğlu, G., Çelik, G., Yalçın, E., Et. al., Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr<sup>6+</sup> removal efficiencies from aqueous medium. J. Hazar. Mater., 2005.
- [42] Stanley, C.L., Ogden L.K., Biosorption of copper (II) from chemical mechanical planarization waste water. J. Env. Man., 69, 289-297, 2003.
- [43] Tewari, N., Vasudevan, P., Guha, B.K., Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis*. Biochemical Engineering Journal, 23, 185-192, 2005.
- [44] Chua, H., Lo, W., Wong, P.K. and Bi, S.P., Studies on the sorption and desorption of Cu from waste water by magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-X with acidic treatment. Science of the Total Environment, 2000.
- [45] Lo, W., Chua, H., Lam, K.H. and Bi, S.P., A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. Chemosphere, 39 (15), 2723-2736, 1999.
- [46] Unz, R.F. and Shuttleworth, K.L., Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. Curr. Opin. Biotechnol., 7 (3), 307-310, 1996.
- [47] Diaz, E., Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. Int Microbiol, 7: 173-180, 2004.

- [48] Baya, A.M., Brayton, P.R., Brown, V.L., Grimes, D.J., Russek-Cohen, E. and Colwell, R.R., Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1285-1292, 1986.
- [49] Malik, A. and Jaiswal, R., Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial waste water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 177-182, 2000.
- [50] Burton, N.F., Day, M.J. and Bull, A.T., Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1026-1029, 1982.
- [51] Sandaa, R.A., Torsvik, V.L., Goksøyr, J., Transferable Drug Resistance in Bacteria from fish farm Sediments. *Can J Micro-biol*, 38: 1061-1065, 1992.
- [52] Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van Til, M., Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Diversity and Activity as Shown by the Sensitivity-Resistance index an Ecologically Relevant Parameter. *Biol. Fertil. Soil.*, 17: 177-184, 1994.
- [53] Davies, J., Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*, 264: 375-381, 1994.
- [54] Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, T.C., Katsouyannopoulos, V.C., Transferable antibiotic resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters. *Wat Res*, 31: 1112-1116, 1997.
- [55] Scott, J.R., Sex and the single circle: conjugative transposition. *J. Bacteriol.*, 174: 6005-6010, 1992.
- [56] Sayers, A.A., Shoemaker, N.B., Broad host range gene transfer: plasmids and conjugative transposons. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15: 15-22, 1994.

- [57] Knotek-Smith, H.M., Deobald, L.A., Ederer, M. and Crawford, D.L., Cadmium stress studies: media development, enrichment, consortia analysis, and environmental relevance. *Biometals*, 16: 251-261, 2003.
- [58] Banjerdki, P., Vattanaviboon, P. and Mongkolsuk, S., Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*. *Curr. Microbiol.*, 47: 260-262, 2003.
- [59] Novick, R.P., Roth, C., Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*, 95: 1335-1342, 1968.
- [60] Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. and Vangijsegem, F., *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol*, 162: 328-334-1985.
- [61] Silver, S., Bacterial resistances to toxic metal ions - a review, Department of Microbiology and Immunology. University of Illinois at Chicago, USA, 1999.
- [62] J., Wang, W., Deckwer, W., Wagner-Döbler, I., Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis. *Journal of Biotechnology*, 132: 469-480, 2007.
- [63] Chovanová, K., Sládeková, D., Kmet., V., Prokšová, M., Harichová, J., Andrea, P., Polek, B. and Ferianc., F., Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. *Biologia, Bratislava*, 59/6: 817-827, 2004.
- [64] Zolgharnein, H., Mohd Azmi, M.L., Saad, M.Z., Mutalib, A.R., Rahim Mohamed, C.A., Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas. *Iranian Journal Of Biotechnology*, Vol. 5, No. 4, 2007.

- [65] Ansari, M.I., Malik, A., References and further reading may be available for this article, To view references and further reading you must this article, Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial waste water. *BioresourceTechnology*, 98 (16), 3149-3153, 2007.
- [66] Ji, G. and Silver, S., Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol*, 14: 61-168, 1995.
- [67] Mergeay, M., Towards an understanding of the genetics of bacterial resistance. *Trends Biotechno.*, 9: 17-24, 1991.
- [68] Emtiaza, G., Ethemadifar, Z. and Habibi, M.H., Production of Extra-cellular Polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal by Exopolymer. *Afr. J. Biotech.*, 3 (6): 330-333, 2004.
- [69] Horitsu, H., Nishida, H., Kato, H., Tomoyeda, M., Isolation of potassium chromate-tolerant bacterium and chromate uptake by the bacterium. *Agric. Biol. Chem*, 42: 2037-2043, 1978.
- [70] Silver, S., Genes for all Metals - A bacterial View of the Periodictable the 1996 Thom Award Lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20: 1-12, 1998.
- [71] Nies, D.H. and Silver, S., Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.*, 14 (2):186, 1999.
- [72] Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. and Vega, M., Biosorption of Cadmium, Copper, Lead and Zinc by Inactive Biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376: 26-32, 2003.
- [73] Chang, B.V., W, W.B. and Yuan, S.Y., Biodegradation of Benzene, Toluene and Other Aromatic Compounds by *Pseudomonas* sp. D8. *Chemosphere*, 35 (12): 2807-2815,1997.

- [74] Uğur, A. ve Ceylan, Ö., *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* İlişkili Bazı Genusların Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu. Muğla Üniversitesi, 133, Muğla, 2003.
- [75] Richards, J.W., Krumholz, G.D., Chval, M.S., Tisa, L.S., Heavy Metal Resistance Patterns of *Frankia* Strains. Applied and environmental microbiology, 68: 923-927, 2002.
- [76] Haktanır, K. ve Arcak, S., Çevre Kirliliği. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayınları, Ankara, 1998.
- [77] N. Yıldırım, Farklı Konsantrasyonlarda Kadmiyumun Beyaz Çürükçül Fungus *Phanerochaete chrysosporium*'un Antioksidatif Enzim Aktiviteleri ve Glutasyon Seviyesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2004.
- [78] Coral, M.N.U., Korkmaz, H., Arıkan, B., Coral, G., Plasmid mediated heavy metal resistance in *Enterobacter* spp. İsolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. Ann. of Microbio., 55: 175-179, 2005.
- [79] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri I-II. 24, İTÜ, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Seminer çalışması), 2004.
- [80] Nies, D.H., Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol Biotechnol., 51: 730-750, 1999.
- [81] Karakaş, D., Ağır Metallerin Toksik Etkileri. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Eğitim Notları, 2000.
- [82] Başkaya, H.S. ve Teksoy, A., Topraklarda Ağır Metaller ve Ağır Metal Kirliliği. I. Uludağ Çevre Mühendisliği Sempozyumu, 763-771, Bursa, 1997.

- [83] Kocaer, F.O., Başkaya, H.S., Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Uygulanan Teknolojiler. Uludağ Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 8: 121-131, 2003.
- [84] Dural, M., Lugal-Göksu, M.Z., Ağır Metal Araştırması, Çukurova Bölgesindeki Tuzla Lagününde. 360-366, Adana, 2005.
- [85] Merian, E., Metals and Their Compounds in the Environment. VCH, Weinheim, 1991.
- [86] O., Uzunoğlu, Gediz Nehrinden Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Bazı Ağır Metal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, 12-73, Manisa, 1999.
- [87] Egemen, Ö., Çevre ve Su Kirliliği. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fak. Yayınları, No: 42, İzmir, 1999.
- [88] Engel, D.W., Sundu, W.G., Fowler, B.A., Factors Affecting Trace Metal Uptake and Toxicity to Estuarine Organisms. Academic Press, London, 1981.
- [89] Ağca, N., Atık Suların Toprak Ekosistemine Etkileri. Kayseri 1. Atıksu Sempozyumu Bildiri Kitabı, 5-8, Kayseri, 1998.
- [90] Katalay, S., Parlak, H., Arslan, Ö.Ç., Ege denizinde yaşayan kaya balıklarının (*Gobius niger* L., 1758) karaciğer dokusunda bazı ağır metallerin birikimi. Ege Üniv. Su Ürünleri Derg., 22 (3-4): 385-388, 2005.
- [91] 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.

- [92] 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). *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 28: 95-100, 2004.
- [93] Gadd, G.M., Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*, 271-279, 2000.
- [94] Bakar, C., Baba, A., *Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne Ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu*. 1. Tıbbi Jeoloji Çalıştay, Ürgüp/Nevşehir, 2009.
- [95] Salomon, S.W., Forstner, U., *Metals in Hydrocycle*. Springer-Verlag, New York, 349, 1984.
- [96] Şanlı, Y., Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. *S.Ü. Vet. Fak. Dergisi*, 2: 17-37, 1984.
- [97] Baysal, A., *Genel Beslenme Bilgisi*. 189, Hatipoğlu Yayınevi, 5. Baskı, Ankara, 1989.
- [98] Dökmen, F., İhsaniye Yöresi Su Kaynaklarında Ağır Metal İçeriği ve Sulama Suyu Kullanımına Etkileri. 215-226, GAP-Çevre Kongresi, I. Cilt, Şanlıurfa, 2000.
- [99] Karakaş, D., *Ağır Metallerin Toksik Etkileri*. TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, Eğitim Notları, 2003.
- [100] Karaca, A., Tugay, O.C., Kızılkaya, R., Haktanır, K., *Doğal Kaynakların Sürdürülebilir Kullanımı*. 111-120, Tarım-Çevre İlişkileri Sempozyumu Bildiri Kitabı, Mersin, 1996.



- [101] Kara, H., Toplum sağlığı yönünden kurşun zehirlenmesi. Aile hekimliği Anabilim Dalı, Dicle ni., Tıp. Fak., 2003.
- [102] zkr., S., Organometalik Kimya. ODTÜ Kimya Bölümü (Ders Notu), 2003.
- [103] Karagüzel, A., Egzoz gazlarıyla çevremize yayılan tehlike kurşun. Bilim ve Teknik Tübitak, Sayı:159, 37-39, 1981.
- [104] Saygıdeğer, S., *Lycopersicum esculentum* L. bitkisinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine kurşunun etkileri. II. Ulusal Ekoloji ve evre Kongresi, 588-597, Ankara, 1995.
- [105] Tok, H.H., evre Kirliliği. Anadolu Matbaa Ambalaj San. Tic. Ltd. şti., 266-283, İstanbul, 1997.
- [106] Vanlı, . ve Yazgan, M., Ağır Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Fitoremediasyon Tekniği. 2008. <http://www.tarimsal.com> (Erişim tarihi: 15.05.2011)
- [107] Morgan, I.J., Henry, R.P. and Wood, C.M., The Mechanism of Acute Silver Nitrate Toxicity in Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is Inhibition of Gill Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Transport. Aquatic Toxicology, 38: 145-163, 1997.
- [108] Metals and Minerals. Annual Review, 1998.
- [109] [http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden\\_kullanım](http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanım) (Erişim tarihi: 11.03.2012)
- [110] Deniz, G., Alüminyum Sektörü Hakkında Bir Değerlendirme. Ekonomik ve Sosyal Araştırmalar Müdürlüğü, Türkiye Kalkınma Bankası A.ř., Ankara, 2006.

- [111] M.D. Okudan, Kobalt ve Molibden İçeren Kullanılmış Hidrodesülfürizasyon (HDS) Katalizör Atıklarına Asidik ve Alkali Liç Uygulaması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Maden Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, 2009.
- [112] Tunçok, Y., İçme Suyunda Ağır Metaller ve İnsan Sağlığına Etkileri. DEÜTF, Farmakoloji Anabilim Dalı, 2008.
- [113] Y. İçel, İstanbul İlinde Atmosferik Ağır Metal Kirliliğinin Biyomonitör Likenlerle İzlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Biyoloji Bilim Dalı, İstanbul, 2005.
- [114] Z. Leblebici, Kayseri Yöresinde Bulunan Bazı Bal Örneklerinde Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2006.
- [115] S. Şimşek, Düşük Tenörlü Mangan Cevherlerinin Zenginleştirilmesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Maden Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, 2011.
- [116] Anonim, The Economics of Strontium. Roskill Information Services Ltd., 1989.
- [117] Vural, N., Toksikoloji. 523-555, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1996.
- [118] Madencilik Özel İhtisas Komisyonu, Metal Madenler alt Komisyonu, Bakır Cevheri ve Pirit Çalışma Grubu Raporu. DPT, 2459-511, 1135, Ankara, 1996.
- [119] Beliles, R.V., Casarett, L.J., Dittel, J., Metals İn Toxicology. The Basic Science of Poisons, Macmillan Publ., Co, Inc., New York, 1975.

- [120] Concon, J.M., Dekker, M., Inc., New York Food Toxicology. Part B: Contaminants and Additives, 1988.
- [121] Yiğit, V., Teke, İ., Yazar, O., Bozkurt, E., Ceritoğlu, A., Nas, C., Saygı, G., Gftrgin, Y., Bazı gıda maddelerinde kimyasal komaminantlar (ağır metaller) üzerinde araştırmalar. Beslenme ve Gıda Tekn. Ünitesi, TÜBİTAK, MBEAE, Yayın No: 37, 1979.
- [122] S. Tuncer, İzmir ve Çandarlı (Aliağa Limanı) Körfezlerinde yaşayan bazı mollusk, alg ve ortamlarındaki ağır metal kirlenmesi ile ilgili araştırmalar. Doktora Tezi, E.Ü., Hidrobiyoloji ve Su Ürünleri Araştırma, Uygulama Merkezi, 1985.
- [123] Öztürk, M., Pil/Akü Kullanımı ve Atık Piller ile Akülerin Zararları. Çevre Mühendisliğı Bölümü, Yıldız Teknik Üniversitesi, Beşiktaş /İstanbul, 2009.
- [124] G. Atlı, Bakır, Çinko, Kadmiyum, Krom ve Gümüşün *Oreochromis niloticus*'un Solungaç ve Böbrek Dokusundaki Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz, Ca<sup>+2</sup>-ATPaz ve Mg<sup>+2</sup>-ATPaz ile Kas Dokusundaki Ca<sup>+2</sup>-ATPaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2009.
- [125] <http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/metalmad/oik638.pdf>. (Erişim tarihi: 11.02.2012)
- [126] [www.atsdr.cdc.gov/tfacts33.html](http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts33.html) (Erişim tarihi:12.03.2012)
- [127] Gerber, G.B., Leonard, A., Hantson, P.H., Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. Critical Reviews in Onc./Hem., 42: 25-34, 2002.
- [128] Vural, H., Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğı Kirlilikler. Çevre Dergisi, 8: 3-8, 1993.

- [129] S. Özdemir, Ağır Metallerin Değişik Termofilik Bakterilerdeki Akümüasyonu, Biyosorbsiyonu ve Çevre Biyoteknolojisinde Kullanımı Üzerine Çalışmalar. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 2008.
- [130] Mondal, B.C., Das, D., Das, A.K., Synthesis and characterization of a new resin functionalized with 2-naphthol-3,6-disulfonic acid and its application of chromium in natural water. 56, 145-152, Talanta, 2002.
- [131] <http://www.extremehealthusa.com/source.html> (Erişim tarihi: 11.05.2011)
- [132] [http://www.odu.edu/sci/jrule/fall03-5504/5504ch20other\\_web\\_files/frame.html](http://www.odu.edu/sci/jrule/fall03-5504/5504ch20other_web_files/frame.html) (Erişim tarihi: 11.06.2011)
- [133] Burtis, C.A., Ashwood, R.E., Fundamentals of Clinical Chemistry. 652-659, 5th Edition, 2002.
- [134] <http://en.wikipedia.org/wiki/Manganese> (Erişim tarihi: 12.02.2012)
- [135] WHO., Cupper in Drinking-water/Background Document for Development of WHO. Guidelines for Drinkink-water Quality, English, only 1-31, 2004. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/copper.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf). (Erişim tarihi: 22.08.2011)
- [136] Cook, M.E. ve Morrow, H., Anthropogenic Sources of Cadmium in Canada, National Workshop on Cadmium Transport Into Plants. Canadian Network of Toxicology Centres, Ottawa, Ontario, Canada, 20-21, 1995.
- [137] <http://www.lenntech.com/periodic-chart.html> (Erişim tarihi: 13.02.2007)
- [138] Tezcan, R., Tezcan, H., Metaller Kimyası. Nobel Yayın-Dağıtım, Ankara, 2007.

- [139] Nriagu, J.O., Wiley, J. and Sons Production and Uses of Chromium. In Natural and Human Environment, New York, USA, 81-105, 1988.
- [140] Silva, A.M.M., Novelli, E.L.B., Fascinelli, M.L., Almeida, J.A., Impact of an Environmentally Realistic Intake of Water Contaminants and Superoxide Formation on Tissues of Rats. Environmental Pollution, 105: 243-249, 1999.
- [141] M.Türkoğlu, Van Gölünden Alınan Su, Sediment ve İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811), Örneklerinde Bazı Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Van, 2008.
- [142] M. Güney, Çevresel Metal Kirliliğinin belirlenmesinde Biyo-İndikatör Olarak Biyo-Kollektörlerin Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, 2007.
- [143] Anonim, European Environment and Health Committee (EEHC). UN Protocol on Heavy Metals, 2003.
- [144] Topçuoğlu, S., Kırbaşoğlu, Ç. ve Güngör, N., Heavy Metals in Organisms and Sediments from Turkish Coast of the Black Sea 1997-1998. Environment International, 27/521-526, 2002.
- [145] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I. İTÜ, Metalurji Dergisi, 136, İstanbul, 2001.
- [146] Gündüz, T., Çevre sorunları. A. Ü., Fen fakültesi yayınları, Ankara, 1994.
- [147] Dökmeci, İ., Dökmeci, A.H., Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 4. Baskı, 2005.
- [148] Klaassen, C.D., Ağır Metaller ve Ağır Metal Antagonistleri, Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitapevleri, 2009.

- [149] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri I. Metalurji, 136. Sayı, 2009.
- [150] Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, A., Comparison of Mercury, Lead and Arsenic with Respect to Genotoxic Effects on Plant Systems and the Development of Genetic Tolerance. Environmental and Experimental Botany, 52: 199-223, 2004.
- [151] Sunda, W.G., Huntsman, S.A., Process Regulating Cellular Metal Accumulation and Physiological Effects, Phytoplankton as Model Systems. Sci. Total Environ., 219: 165-181, 1998.
- [152] Ehrlich, H.L., Microbes and Metals. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48: 687-692, 1997.
- [153] Choudhury, R. and Srivastava, S., Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria. Curr. Sci., 81 (7): 7, 2001.
- [154] Gadd, G.M., Microbial control of heavy metal pollution. Cambridge Press, Cambridge, 59-88, 1992.
- [155] Freedman, B., Environmental Ecology, The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Other Stresses. Academic Press, San Diego, CA, 1995.
- [156] Ratul-Saikia, R., Microbial Biotechnology. New India Publishing, 2008.
- [157] Yüksel, L., Kurşun ve çocuk. İst. Çocuk Klin. Derg., 31: 218-227, 1996.
- [158] Özçelik, D., Toplan, S., Darıyerli, N., Gülyaşar, T. ve Dursun, Ş., Dietle Alınan Kurşunun Eritrosit Osmotik Direnç ve Kan Viskozitesine Etkilerinin Araştırılması. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 31: 129-133, 2000.

- [159] Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M. ve Kaptan, H., Toprak Bilimi. Çukurova Üniversitesi Yayınları, No: 135, 1993.
- [160] Ahluwalia, S.S., Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Biores. Techn.*, 98: 2243-2257, 2007.
- [161] Kratochvil, D., Volesky, B., Advantages in biosorption of heavy metals. *Tib. tech.*, 16 : 291-300, 1998.
- [162] Malik, A., Metal bioremediation through growing cells. *Enviromental International*, 30 : 261-278, 2004.
- [163] İlhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kılıçarslan, S., Özdağ, H., Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 2 : 50-57, 2004.
- [164] Volesky, B., Biosorption of heavy metals. CRC Press Boca Raton, USA, 1990.
- [165] Baik, W.Y., Bae, J.H., Cho, K.M, Hartmeier, W., Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts there of *Bioresource Technology*. 81: 167-170, 2002.
- [166] Conrad, K., Hansen, H.C.B., Sorption of zinc and lead on coir. *Bioresource Technology*, 2006.
- [167] Silóniz, M.I., Balsalobre, L., Alsa, C., Valderrama, M.J., Peinado, J.M., Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology*, 153: 173-180, 2002.

- [168] Matheickal, J.T., Yu, Q., Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae. *Biosource Technology*, 69: 223-229, 1999.
- [169] Tsezos, M., Volesky, B., The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 385-401, 1982.
- [170] Lowe, L.W. and Gaudy, A.F.J., Modified extended aeration process for removal and recovery of cadmium from waste waters. *Biotechnol. Bioeng.*, 34: 600- 608, 1989.
- [171] Shravan, K.C.H., Sivarama, S.Y. and Moran, M.P., Use of wild type and nickel resistant *Neurospora crassa* for removal of Ni<sup>+2</sup> from aqueous medium. *Biotechnology Letters*, 14: 11, 1099-1202, 1992.
- [172] Scott, C.D., Removal of dissolved metals by plant tissue. *Biotechnol. Bioeng.*, 39: 1064-1668, 1992.
- [173] Costa, A.C.A. and Leite, S.G.F., Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera*. *Biotechnol Lett.*, 13: 8, 559-562, 1991.
- [174] Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, G., Studies on metal resistance system in *Kluyveromyces marxianus*. *Biological Trace Element Research*, 38: 117-127, 1993.
- [175] Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26: 266-291, 2008.
- [176] Madrid, Y. and Camara, C., Biological substrates for metal preconcentration and speciation. *Trends in Analy. Chem.*, 16: 36-44, 1997.



- [177] Sağlam, N., Cihangir, N., Özcengiz, G., Bazı Ağır Metallerin Beyaz Çürükçül Funguslar Tarafından Biyoabsorbsiyonu. XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Edirne, 1994.
- [178] Rouch, D.A., Lee, B.T.D. and Morby, A.P., Understanding cellular responses to toxic agents, A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. J. Ind. Microbiol., 14: 132-141, 1995.
- [179] Smith, J.J., Howington, J.P., Mcfeters, G.A., Plasmid main tenance and expression in *Escherichia coli* exposed to the Antarctic marine environment. Antart. J.U.S., 28: 123-124, 1999.
- [180] Sobecky, P.A., Plasmid ecology of marine sediment microbial communities. Hydrobiologia, 401: 9-18, 1999.
- [181] Misra, T.K., Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurial. Plasmid, 27: 4-16, 1992.
- [182] O'Halloran, T., Transition metals in control of gene expression. Science, 261: 715-725, 1993.
- [183] Ni'bhriain, N.N., Silver, S., Foster, T.J., Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R 100-1. J. Bacteriol., 155: 690-703, 1983.
- [184] Weiss, A., Murphy, S. and Silver, S., Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 132: 197-208, 1997.
- [185] Costa, A.C.A. and Duta, F.P., Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Braz. J. Microbiol., 32: 876-887, 2001.

- [186] Boyanov, M.I., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B.A., Fein, J.B. and Fowle, D.A., Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls, A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. et Cosmochim. Acta.*, 67: 3299-3311, 2003.
- [187] Spain, A., Implication of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergr. Res.*, 2: 1-6, 2003.
- [188] Kılıç, N.K., Dönmez, G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, No: 6, 27-33, 2008.
- [189] Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yue, Z.B., Production of extracellular polymeric substances from *Rhodopseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 216-222, 2005.
- [190] Silver, S. and Phung, L.T., A Bacterial View of the Periodic Table, Genes and Proteins for Toxic Inorganic Ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol: 32, 587-605, 2005.
- [191] Fath, M.J., Kolter, R., ABC-transporters, the bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, 57: 995-1017, 1993.
- [192] Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S., Saier, M.H.J., A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 156: 1-8, 1997.
- [193] Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Baker, R.A., Jenkinson, H.F., The adhesion-associated sca operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn<sup>2+</sup> uptake. *J. Bacteriol.*, 180: 290-295, 1998.

- [194] Patzer, S.I., Hantke, K., The Znu ABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 28: 1199-1210, 1998.
- [195] Harnett, N.M. and Gyles, C.L., Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. Appl. Environ. Microbiol., 48: 930-945, 1984.
- [196] McEntee, J.D., Woodrow, J.R. and Quirk, A.V., Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* spp. Appl. Environ. Microbiol., 51: 515-520, 1986.
- [197] Jain, P.K., Ramachandran, S., Shuklav, V., Bhakuni, D., Verma, S.K., Characterization of Metal and Antibiotic Resistance in A Bacterial Population Isolated from A Copper Mining Industry. Vol: 6, No: 2, 2009.
- [198] Rajbanshi, A., Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant. Our Nature, Vol: 6, 52-57, 2008.
- [199] <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?> (Erişim tarihi: 26.03.2012)
- [200] Ekici, H., Yarsan, E., Antibiyotiklere Direnç ve Dirençliliğın Boyutlarının Çok Yönlü Değ erlendirilmesi. Türk Veteriner Hekimleri Birliğı Dergisi, 8 (3-4): 85-93, 2008.
- [201] Boucher, H.W., Clin. Infect. Dis., 48: 1-12, 2009.
- [202] Karbasizaed, V., Badami, N., Emtiazi, G., Antimicrobial, Heavy Metal Resistance and Plasmid Profile of Coliforms Isolated from Nosocomial Infections in a Hospital in Isfahan. African Journal of Biotechnology, Vol: 2 (10), 379-383, Iran, 2003.

- [203] Austin-Baker, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trends in Microbiology*, Vol: 14, No: 4, 2006.
- [204] Valls, M. and Lorenzo, V., Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 327-338, 2002.
- [205] Kuyucak, N., Volesky, B., Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnol. Lett.*, 10 (2): 137-142, 1988.
- [206] İlhan, S., Mikroorganizmalar ve Tarım Topraklarındaki Mikrobiyal Proseslere Ağır Metal Toksisitesi. Seminer notu, Eskişehir, 1999.
- [207] Li, X.Z., Nikaido, H. and Williams, K.E., Silver-Resistance Mutants of *Escherichia. coli* Display Active Efflux of  $Ag^+$  and are Deficient in Porins. *J. Bacteriol.*, Vol: 179 (19), 6127-6132, 1997.
- [208] Muraleedharan, T.R., Venkobachar, L.I., Further Insight Into The Mechanism Of Biosorption Of Heavy Metals By *Genoderma Lucidum*. *Environmental Technology*, 15, 1015-1027, 1994.
- [209] Scott, J.A., Palmer, S.J., Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 221-225, 1990.
- [210] Scott, J.A., Palmer, S.J., Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.*, 10: 21-24, 1988.
- [211] Nies, D.H., Silver, S., Molecular microbiology of heavy metals Institut für Mikrobiologie. Halle, Germany, 1995.
- [212] Silver, S., Misra, T.K., Bacterial transformation of and resistances to heavy metals. *Basic Life Sci.*, 28: 23-46, 1984.

- [213] Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R. and Gade, W.N., Role of proteins in resistanc mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology*, 126: 374-382, 2006.
- [214] Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J., Gade, W.N., Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-A proteomic approach. *Journal of Biotechnology*, 128: 444-451, 2007.
- [215] Hongo, K., Hirai, H., Uemura, C., Ono, S., Tsunemi, J., Higurashi, T., Mizobata, T., Kawatw, Y., A novel ATP/ADP hydrolysis activity of hyper thermo stable group II chaperonin in the presence of cobalt or mangnese ion. *FEBS Letters*, 580: 34-40, 2006.
- [216] Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., Sonomoto, K., Reconstruction and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 30-37, 2005.
- [217] Schmidt, A., Haferburg, G., Sineriz, M., Merten, D., Büchel, G. and Kothe, E., Heavy metal machanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chemic Der Erda*, 65: 131-144, 2005.
- [218] Güven, K., *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*. Dicle Üniversitesi Basımevi, 1999.
- [219] Murphy, R.J. and Leavy, J.F., Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 81: 165-168, 1983.
- [220] Raja, E.C., Selvam, G.S., Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6 (2), 259-266, 2009.

- [221] Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 276: 8469-8474, 2001.
- [222] Aiking, H., Kok, K., Heerikhuizen, H.V. and Van't, R.J., Adaption to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. Appl. Environ. Microbial., 44: 938-944, 1982.
- [223] Leedjarv, A., Ivask, A., Virta, M., Interplay of Different Transporters in the Mediation of Divalent Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. Journal of Bacteriology, Vol: 190, No: 8, 2680-2689, 2008.
- [224] Cloete, T.E., Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds, International Biodeterioration and Biodegradation. Vol: 51, 277-282, 2003.
- [225] Summers, A.O., Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. Ann. Rev. Microbiol., 40: 607-634, 1986.
- [226] Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P., Ritchie, D.A., Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol. Rev., 19: 239-262, 1997.
- [227] Silver, S., Phung, T., Bacterial Heavy Metal Resistance. New Surprises, Annu. Rev. Microbiol., Vol: 50, 753-789, 1996.
- [228] Yılmaz, M., <http://www.cevreorman.gov.tr/sulak/sulakalan/kizilirmak.html> (Erişim tarihi: 04.03.2011)
- [229] Y. Gündoğan, Kızılırmak Nehri'ndeki (Kırıkkale) *Cladophora*'da Ağır Metal Birikimi Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Çevre Bilimleri, Ankara, 2005.

- [230] Matyar, F., Dinçer, S., Doğu Akdeniz'den İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Bakterilerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençliliği. SDU, Journal of Science (E-Journal), 5 (2): 172-178, 2010.
- [231] Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H., Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. J. Appl. Microbiol., Vol: 83, 652-658, 1997.
- [232] Wang, L. and Jayarao, B.M., Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. American Dairy Science Association, Vol: 84, 1421-1429, 2001.
- [233] Birnboim, H.C., Doly J., Arapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucleic Acids Res., Vol: 7, 1513-1523, 1979.
- [234] Cutting, S.M. and Horn, P.B., Edited by: Harwood, C., Cutting, S., Wiley, J. and Chichester, S., Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus.*, 27-74, UK, 1990.
- [235] Manniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, 545, 1982.
- [236] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total Soluble Protein and Membrane Lipopolysaccharide Profiles in Differentiating *Rhizobium* isolates. Microbios, Vol: 86, 143-156, 1996.
- [237] Laemli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, Vol: 227, 680-684, 1970.
- [238] Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., Effects of Oxidizing Agents and Defatting on the Electrophoretic Patterns of Flour Proteins During Dough Mixing. Eur. Food Res. Technol., Vol: 211, 322-325, 2000.

- [239] Mukhallad A.M., Malcolm P.S., The distribution of heavy-chain isoforms of myosin in airways smooth muscle from adult and neonate humans. *Biochem. J.*, 260: 421-426, 1989.
- [240] Mondragón, V., Dámaris, A., Pérez, F., Gladis, L., González-Guzmán, E., Antonio, R., Márquez-González, R., Padilla-Noriega, A., Franco, J.D.B., Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ Monit Assess* 183: 329-340, 2011.
- [241] Kafilzadeh, F., Afrough, R., Johari, H., Tahery, Y., Range determination for resistance/tolerance and growth kinetic of indigenous bacteria isolated from lead contaminated soils near gas stations (Iran). *European Journal of Experimental Biology*, 2 (1): 62-69, 2012.
- [242] Xie, J.X., Fu, H., Wang, J., Liu, Afr. *J. Biotechnol.*, 9 (26), 4056-4066, 2010.
- [243] Lugaskas, L.A., Levinskaite, D., Peeiulyte, J., Repekiene, A., Motuzas, R., Vaisvalavicius, I., *Prosyeevas, Ekologija*, 1, 61-69, 2005.
- [244] Laplace, J.M., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y., Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 685-689, 2000.
- [245] Nakipoğlu, Y., Gümüş, D., Şelale, S., Ang, D., Küçüker, M., Enterokok Suşlarının Yüksek Düzeyde Aminoglikozidlere ve Ağır Metaller Karşı İn Vitro Duyarlılıklarının Araştırılması. *Mikrobiyol. Bul*, 43: 545-551, 2009.
- [246] Abou-Shanab, R.A., van Berkum, P., Angle, J.S., Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68: 360-7, 2007.



- [247] Silvestry-Rodriguez, N., Ruleas-Sicairos, E.E., Gerba, C.P., Bright, K.K., Silver as a Disinfectant. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol: 191, 23-45, 2007.
- [248] Mergeay, M., Springael, D., Top, E., Gene transfer in polluted soils, In Fry JC, Day MJ (eds): *Bacterial Genetics in Natural Environments*. London: Chapman and Hall, 1990.
- [249] Karayakar, F., Ay, Ö., Cicik, B., Mersin Kıyı Şeridinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Bazı Antibiyotiklere Karşı Plazmid Kökenli Dirençliliğin Saptanması. *Eko. Çev. Kor.*, 13, 52: 28, 2004.
- [250] Lidon, F.C., Ramalho, J., Henriques, F.S., Copper inhibition of rice photosynthesis. *Plant Physiol.*, 142: 12-17, 1993.
- [251] Borremans, B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown, N.L. and Lelie, D.V.D., Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal Of Bacteriology*, 5651-5658, 2001.