

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRIKKALE-KIZILIRMAK'TAN İZOLE EDİLEN GÜMÜŞ ve STRONSIYUM
DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ve MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

GAMZE ÖZER

KASIM 2011

Biyoloji Anabilim Dalında Gamze ÖZER tarafından hazırlanan Kırıkkale-Kızılırmak'tan İzole Edilen Gümüş ve Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE _____
Üye (Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN _____
Üye : Prof. Dr. İlhami TÜZÜN _____
Üye : Doç. Dr. Sema TAN _____
Üye : Yard. Doç. Dr. Mustafa TÜRK _____

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

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

Prof. Dr. İhsan ULUER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KIRIKKALE-KIZILIRMAK'TAN İZOLE EDİLEN GÜMÜŞ ve STRONSIYUM

DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ve MOLEKÜLER

KARAKTERİZASYONU

ÖZER, Gamze

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Kasım 2011, 90 sayfa

Ağır metallere kaynaklanan çevresel kirlenme son yıllarda önemli bir problem oluşturmaktadır. Sulcul ekosistem başta olmak üzere tüm canlıların sağlığını tehdit eden bu durumu bertaraf etmek amacıyla ağır metal iyonlarının su ortamından giderilebilmesi için çok pahalı ve ileri düzeyde kimyasal teknolojiye ihtiyaç vardır. Ağır metale dirençli bakterilerin kullanıldığı biyoremediasyon ise daha ucuz bir alternatif oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale-Kızılırmak'tan izole edilen gümüş ve stronsiyum dirençli bakterilerin biyokimyasal ve genetik olarak karakterizasyonudur. En yüksek MİK (Minimal inhibitör konsantrasyonu) değeri (8 mg/L) gösteren gümüş dirençli iki bakteri izole edilmiş, biyokimyasal testleri dikkate alınarak *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Plazmit profil analiz ve plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda *Pseudomonas putida*'nın gümüş dirençlilik genlerinin plazmit DNA üzerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş dirençliliğinin kromozomal DNA üzerinde olduğu görülmüştür. Her iki suşun da alüminyum, lityum,

kalay, nikel ve stronsiyum metallerine dirençli olduğu belirlenmiştir. En yüksek MİK değeri (2000 mg/L) gösteren stronsiyum dirençli iki bakteri izole edilmiş, biyokimyasal testleri dikkate alınarak *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır. Her iki suşun da alüminyum, lityum, baryum ve nikel metallerine dirençli olduğu görülmüştür. Plazmit profil analiz ve plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens* suşlarının stronsiyum dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal dirençliliği, Kırıkkale, Kızılırmak, Gümüş, Stronsiyum, Biyoremediasyon

ABSTRACT

BIOCHEMICAL and MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SILVER and
STRONTIUM RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM

KIRIKKALE-KIZILIRMAK

OZER, Gamze

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Bulent IÇGEN

November 2011, 90 Pages

Environmental pollution caused by toxic heavy metals has become important in recent years. Removal of heavy metals from aquatic environment needs advance chemical technologies which are very expensive. On the other hand, bioremediation which depends on the use of heavy metal resistant bacteria is the cheapest alternative.

The aim of this study to isolate and identify silver and strontium resistant bacteria from Kızılırmak-Kırıkkale. Two silver resistant bacteria with maximum MIC (Minimal inhibition concentration) value (8mg/L) were isolated and identified as *Pseudomonas putida* and *Klebsiella pneumoniae*. Both isolates were shown to be multi resistant to some other heavy metals namely, aluminum, lithium, tin, nickel and strontium. Plasmid profile analysis and curing experiments showed that the silver resistance ability of *Pseudomonas putida* was plasmid-encoded. On the other hand, our results showed that the silver resistant ability of *Klebsiella pneumoniae* was chromosomal-encoded. Two strontium resistant bacteria with maximum MIC value (2000 mg/L) were isolated and identified as *Sphingomonas paucimobilis* and *Pseudomonas fluorescens*. Also strontium resistant isolates were shown to be resistant to some other heavy metals such as aluminium, lithium,

barium, nickel and strontium. Plasmid profile analysis and curing experiments revealed that the strontium resistant abilities of both isolates were chromosomal-encoded.

Key Words: Heavy metal resistance, Kirikkale, Kizilirmak, Silver, Strontium, Bioremediation

TEŞEKKÜR

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

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

Laboratuvar çalışmalarımda destek olan çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Fadime YILMAZ'a, Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve çalışmalarım boyunca emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda beni destekleyen aileme, her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen İlhan ARSLANOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Kaynak özetleri.....	2
1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları.....	2
1.1.1.1. Gümüşün Fonksiyonları.....	6
1.1.1.2. Stronsiyumun Fonksiyonları.....	6
1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri.....	7
1.1.2.1. Gümüşün Çevresel Etkileri.....	8
1.1.2.2. Stronsiyumun Çevresel Etkileri.....	8
1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları.....	9
1.1.3.1. Gümüşün Kullanım Alanları.....	10
1.1.3.2. Stronsiyumun Kullanım Alanları.....	10
1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri.....	11
1.1.4.2.1. Biyoremediasyon.....	12
1.1.5. Bakterilerin Metal Dirençlilik Mekanizmaları.....	15
1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	20
1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı.....	22
1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması.....	25
1.1.5.4. Ekstrasellüler Alıkonma.....	27
1.1.5.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu.....	27

1.1.6. Çalışmanın Amacı.....	32
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	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 Antibiyotik Diskler.....	35
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	35
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	35
2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	36
2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	36
2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)	36
2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)	36
2.1.3.2.1.3. Solüsyon III (K-asetat/Glasiyal asetik asit)	36
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	36
2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	37
2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu.....	37
2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu.....	37
2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	37
2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu	37
2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu.....	37
2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu.....	38
2.1.3.2.2.7. Kloroform/ İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu.....	38
2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol	38
2.1.3.2.2.9. %70'lik etanol.....	38
2.1.3.2.2.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM).....	38
2.1.3.2.2.11. Tris-HCl Tamponu (1 M).....	38
2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	39
2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu (KH_2PO_4 , K_2HPO_4)	39
2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	39

2.1.3.2.4.1. Tris Buffer Solüsyon.....	39
2.1.3.2.4.2. Deterjan Solüsyon.....	39
2.1.3.2.5. Lipopolisakkarit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	40
2.1.3.2.5.1. PBS Solüsyonu.....	40
2.1.3.2.6. SDS PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı	40
2.1.3.2.7. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı.....	41
2.1.3.2.7.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (%12'lik)	41
2.1.3.2.7.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)	42
2.1.3.2.8. Commassie Brilliant Blue Solüsyonunun Hazırlanması.....	42
2.2. Yöntem.....	42
2.2.1. Çalışma Alanı.....	42
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	44
2.2.3. Ag ve Sr' ye Dirençli Bakterilerin İzolasyonu.....	44
2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması.....	44
2.2.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	44
2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	45
2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği.....	45
2.2.8. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	45
2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....	46
2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu	46
2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	47
2.2.12. DNA'nın Etidyum Bromid ile Boyanması	47
2.2.13. Plazmit DNA ve Kromozomal DNA'ların Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	48
2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmit Curing)	48
2.2.15. Total Protein İzolasyonu.....	48
2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu.....	49
2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bandlarının Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	49
2.2.18. Bakterilerin Lipopolisakkarit Analizi.....	49
2.2.19. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması.....	50
2.2.19.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	50

2.2.19.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	50
2.2.19.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi.....	51
2.2.19.4. SDS-PAGE Jellerin Boyanması.....	51
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	52
3.1. Gümüş ve Stronsiyuma Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi	52
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	53
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri.....	54
3.4. Bakteri Büyüme Eğrileri.....	55
3.4.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin Büyüme Eğrileri.....	55
3.4.2. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Büyüme Eğrileri.....	56
3.5. Bakterilerin Plazmit DNA Analizleri ve Kromozomal DNA Analizleri.....	56
3.5.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri.....	57
3.5.2. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Plazmit DNA ve Kromozomal DNA Analizleri.....	58
3.6. Bakterilerin Dış Membran Protein ve Total Protein Analizi.....	61
3.6.1 Gümüş Dirençli Suşların Dış Membran ve Total Protein Analizi.....	61
3.6.2.Stronsiyum Dirençli Suşların Dış Membran Protein ve Total Protein Analizleri.....	62
3.7. Bakterilerin Lipopolisakkarit (LPS) ve Ekzopolisakkarit (EPS) Profilleri.....	65
3.7.1. Gümüş Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin LPS Profili.....	65
3.7.2. Stronsiyum Dirençli <i>Sphingomonas paucimobilis</i> Suşunun EPS Profili.....	66
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Esansiyel olan ve esansiyel olmayan metaller.....	3
1.2. Bakterilerde ağır metallerin toksik etkileri.....	5
1.3. Gram negatif bakterilerde porin proteinlerinin yapısı.....	20
1.4. Bakteriyel hücre duvarından ATP bağımlı ve bağımsız metal atılımı.....	23
1.5. Bakteriyel hücre duvarında Czc modeli.....	24
1.6. <i>Synechococcus</i> 'ta Zn ⁺² metalinin metallothioneine bağlanma sistemi.....	26
1.7. Bakterilerde arsenat iyonlarına karşı direnç sağlayan enzimatik detoksifikasyon sistemi.....	28
1.8. Gümüş direnç genleri, transkripsiyon mekanizması ve protein üretimi.....	31
2.1. Kızılırmak'ın lokasyonu.....	42
3.1. <i>Pseudomonas putida</i> (a) ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> (b) suşlarının gümüş içermeyen ortamdaki ve gümüş içeren ortamdaki büyüme eğrileri.....	55
3.2. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (a) ve <i>Pseudomonas fluorescens</i> (b) suşlarının stronsiyum içermeyen ortam ve stronsiyum içeren ortamdaki büyüme eğrileri.....	56
3.3. <i>Pseudomonas putida</i> suşunun plazmit DNA profili (a), plazmit eliminasyonu (b) ve kromozomal DNA (c) lokasyonu.....	57
3.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşunun plazmit (a) ve kromozomal DNA (b) lokasyonu.....	58
3.5. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> suşunun plazmit (a) ve kromozomal DNA (b) lokasyonu.....	59
3.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> suşunun plazmit DNA profili (a), plazmit eliminasyonu (b) ve kromozomal DNA (c) lokasyonu.....	60
3.7. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	60
3.8. <i>Pseudomonas putida</i> 'nın dış membran (a) ve total protein (b) profilleri	61
3.9. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin dış membran (a) ve total protein (b) profilleri.....	62
3.10. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 'in dış membran (a) ve total protein (b) profilleri.....	63

3.11. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'in dış membran (a) ve total protein (b) profilleri.....	64
3.12. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi.....	64
3.13. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin LPS profili.....	65
3.14. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 'in EPS profili.....	66
3.15. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 'in EPS üretimi.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

1.1. Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dallar.....	9
1.2. Antibiyotiklerin genel sınıflandırılması.....	18
1.3. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri.....	19
2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları.....	35
2.2. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları.....	40
2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları.....	41
2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması.....	41
2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması.....	42
2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları.....	43
3.1. Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların bölgelere göre yayılımı.....	52
3.2. Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	53
3.3. Gümüş dirençli ve stronsiyum dirençli suşların metal dirençlilik ve antibiyotik dirençlilik profilleri.....	54

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	Kalay
Sn	Antimon
Sr	Stronsiyum
Zn	Çinko
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
SrCl ₂	Stronsiyum Klorür

KISALTMALAR DİZİNİ

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

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun düzensiz yerleşimi ve hızlı kentleşme ile gelişen endüstrinin bir sonucu olarak doğal kaynakları tehdit eden kirlenme olayları, günümüz insanının en önemli sorunlarından biri haline gelmektedir. En az yatırımla daha fazla kar etme isteği, sanayicilerin daha sorumlu düşünmemesine dolayısıyla üretim atıklarını işletmeden uzaklaştırmakla yetinmelerine neden olmuştur. Bu atıklar kirlenme elemanları oluşturmaktadır. Özellikle hava ve suyun akışkan olmaları nedeniyle oluşan kirlilik kaynağından çok uzaklara taşınmaktadır. Kirlenmelerin en önemlilerinden birkaçı ortamda uzun süre kalıcı ve toksik olan kimyasal maddeler ve türevleridir. Son yıllardaki en önemli çevre kirliliği ise sularda görülmektedir. Birçok az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde atık sular temizleme işlemine tabi tutulmadan akarsulara boşaltılmaktadır. Özellikle endüstriyel aktiviteler sonucu oluşan ve hiçbir ekonomik değeri olmayan organik ve inorganik zehirli madde atıklarının meydana getirdiği su kirliliği en büyük çevresel problemdir. Birçok gelişmekte olan ülkenin içme suyundaki ağır metalleri giderme sisteminin bulunmaması sonucu, ağır metallerle kontamine olmuş içme suları ve bu sularla sulanan topraklarda yetişen tarım ürünleri yoluyla toksik düzeylere ulaşan metaller insan sağlığını etkiler hale gelmiştir. Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Ağır metal kirliliğinin önemli olma sebebi, baştan sona kadar besin zincirindeki canlıların bünyesinde birikerek toksik etkiye neden olmasıdır. Son yıllarda ağır metal kirliliği içeren ve düşük pH'a sahip atık sularda üreyebilen ve metal iyonlarına karşı direnci fazla olan mikroorganizmaların, metal iyonlarını hücre yapısına alarak biriktirme yeteneğinden yararlanarak ağır metal kirliliğinin gideriminde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır [1-3].

1.1. Kaynak Özetleri

1.1.1. Ağır Metaller ve Biyolojik Fonksiyonları

Ağır metal tanımı, fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılmaktadır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko vb. olmak üzere 60 tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde tutuklu olarak bulunmaktadır [1].

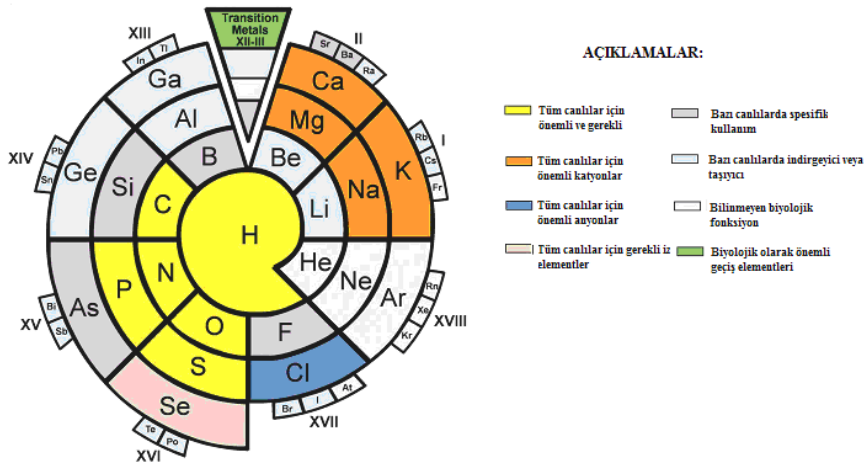
Ağır metaller, çevreye evsel atıklar ve en önemlisi endüstriyel faaliyetler sonucunda yayılmaktadır. Çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, otomotiv sanayi gibi endüstriyel faaliyetler, metal kirliliğinin oluşmasında en önemli etkenlerdir [4]. Bu tesislerin atıklarındaki metal kirliliğinin çoğu sularda birikmektedir. Sulardaki birikim, çözünme şeklinde veya çözünmeden suların dibinde çökme şeklinde olabilmektedir. Bu şekildeki kirlenme, endüstriyel ve tarımsal atıklardan meydana geldiği gibi yağmur kaynaklı erozyon ve atmosferik depolanma neticesinde de meydana gelebilmektedir. Atmosferde biriken metaller, sonunda yeryüzüne döner ve akarsular yolu ile su yataklarına sürüklenmektedir [5, 6].

Atık sularda bulunan ağır metallerin önemli bir miktarı arıtma çamurlarında bulunmaktadır. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ve denizlere ulaşarak bu bölgelerde kalmaktadır. Buralardan ağır metaller tekrar mobilize olarak içme sularına ve besin zincirine ulaşabilmektedir. Besin zincirine ulaşan ağır metaller kimyasal veya biyolojik olarak bünyeden atılamamaktadırlar [1, 7-10].

Yaşamsal olarak tanımlanan metallerin, mikroorganizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gerekir. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi biyolojik yapıyı olumsuz olarak etkilemektedir [9]. Örneğin, Co(II), Cr(VI), Cu(II), Fe(II), Mn(II), Ni(II) ve Zn(II) gibi metaller mikroorganizmalar için gereklidir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobesein olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik

etkileşimlerini kararlı tutmak ve osmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılmaktadırlar [11].

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

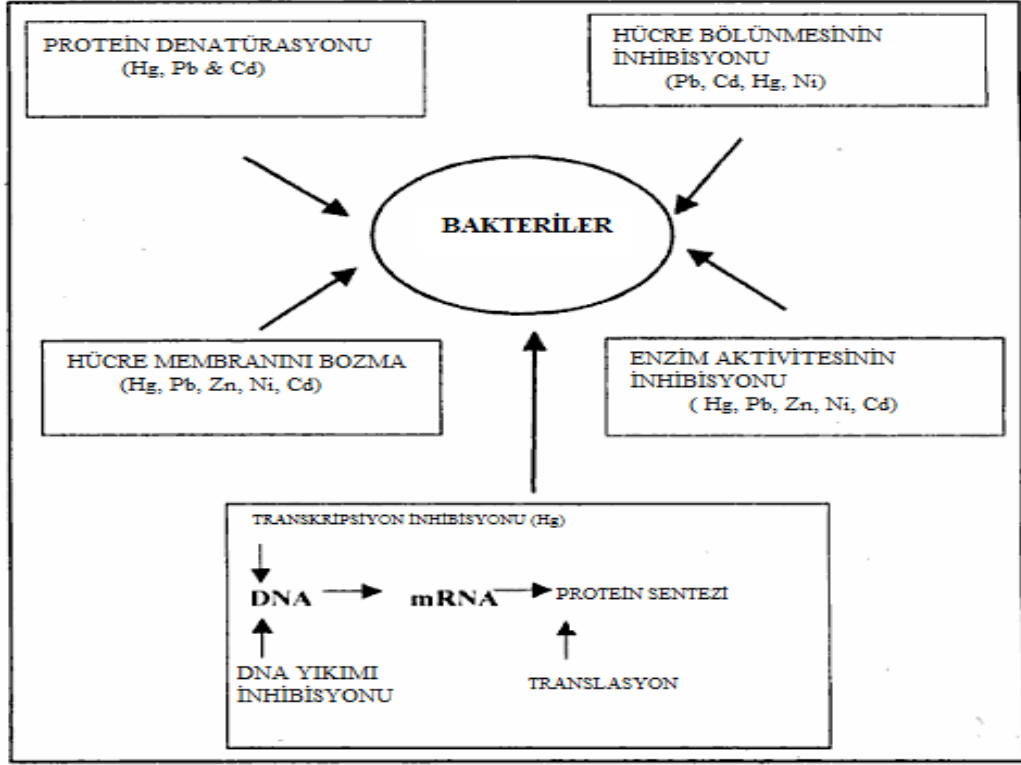


Şekil 1.1. Esansiyel olan ve esansiyel olmayan metaller [12]

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünleyici rolleri vardır. Kobalt, bakır, krom, demir, manganez, nikel, çinko gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Gümüş, alüminyum, kadmiyum, civa, ve kurşun gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel değildirler. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, protein yapısını ve bakteri hücre yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, gen ekspresyonunu düzenlemek, biyomolekülleri aktive etmek ile birlikte, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında da önemli rol oynamaktadır [5, 13].

Bazı ağır metaller mikroorganizmalar için gerekli elementler olsa da, yüksek konsantrasyonlarda, hücre içinde kompleks bileşikler oluşturarak, bakteriler de dahil olmak üzere tüm yaşam için toksik olabilmektedir. Fakat, ağır metallerin hücrelerin yaşamsal ve fizyolojik devamlılığının sağlanması için sitoplazmada belirli konsantrasyonlarda da bulunmaları gerekmektedir [14, 15].

Bakterilerdeki metal toksisitesi, esansiyel metallerin kendi doğal bağlanma yerlerinin değiştirilmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Esansiyel olmayan metaller tiyol taşıyan gruplara ve oksijen bulunan bölgelere, esansiyel olan metaller yerine yüksek bir affinite ile bağlanmaktadırlar. Nükleik asitlerin ve proteinlerin konformasyonlarının bozulması, oksidatif fosforilasyon ve osmotik dengede oluşan bozukluklar sonucu hücrede toksisite görülmektedir [7].



Şekil 1.2. Bakterilerde ağır metallerin toksik etkileri [16]

Şekil 1.2.'de bazı ağır metallerin bakterilerdeki toksik etkileri gösterilmektedir. Hücelere giren ağır metal katyonları (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+), yüksek atomik numaralı SH gruplarına bağlanmaktadır. Bu metal iyonları, kararlı yapıda olan SH grubuna bağlanarak kompleks yapıyı bozmakta ve enzim aktivitesini engellemektedir. Diğer metal katyonlar ise birbirlerini etkileyebilmektedirler. Örneğin; Zn^{2+} veya Ca^{2+} ile Cd^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} ile Fe^{2+} , Zn^{2+} ile Mg^{2+} iyonları birbirleri ile etkileşime girerek, enzimlerin fonksiyonlarını inhibe edebilmektedirler [16].

Demir, bakır, nikel gibi esansiyel geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol alırken, magnezyum ve çinko gibi esansiyel metaller elektrostatik güçleri sayesinde çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize etmektedirler. Demir, nikel, magnezyum ve kobalt, düzenleyicilik görevi olan kompleks moleküllerin yapısında yer almaktadır [5].

Ağır metaller, inaktif veya denatüre olmuş proteinlerin sülfidril bağlarına bağlanarak transkripsiyon faktörleri ve enzimleri içeren proteinlerden kofaktörleri çıkararak hücre yıkımına neden olmaktadır [17].

1.1.1.1. Gümüşün Fonksiyonları

Gümüş iyonları aşırı derecede toksik olan, mikroorganizmaların hücre fizyolojisi ve biyokimyasını etkileyen bir metaldir. Gümüş iyonları, mikrobiyal hücre duvarlarındaki proteinlerin, disülfid (S-S) ve sülfidril (-SH) gruplarına güçlü olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma olayı ile hücrenin normal metabolik süreci bozulmaktadır ve hücre ölmektedir. Ayrıca hücre membranındaki sülfidril gruplarıyla gümüş kompleks bir yapı oluşturarak enzim yapısı ile birleşmektedirler ve dolayısıyla da transmembrandaki enerji üretimine ve elektrolit transferine katılmaktadırlar. Bu durum R-S-S-R bağlarının oluşumuna neden olarak solunum ve elektron taşınımını engellemektedir. Ayrıca gümüş iyonları, pürin ve pirimidin bazlarındaki nitrojene bitişik olan hidrojen bağlarıyla yer değiştirmektedirler. Bu durum kararlı yapıdaki DNA'nın, helezon bir yapı almasını, DNA'nın replikasyonunu ve sonraki hücre bölünmelerini engellemektedir [18].

1.1.1.2. Stronsiyumun Fonksiyonları

Stronsiyum iyonları, hücre duvarındaki fonksiyonel gruplara (sülfidril, hidroksil, karboksil, amid, amin, karbonil, thioeter, fosfat grupları) bağlanmaktadır. Hücre duvarına bağlanan katyon miktarı arttıkça doygunluğa ulaşılmaktadır ve hücre duvarında iyonlar çökmektedir [19].

1.1.2. Ağır Metallerin Çevresel Etkileri

Çabuk sanayileşme ve şehirleşme sonucunda toksik metal miktarındaki artma ekosistem için potansiyel bir risk haline gelmiştir. Madencilik ve akımla kaplamanın yer aldığı pek çok endüstride, uranyum, kadmiyum, kurşun, civa ve bakır gibi ağır metaller yüksek seviyede dışarıya verilmektedir. Bu üretim prosesleri sonucu oluşan işlenmemiş atıkların çevre üzerinde olumsuz etkileri vardır [3].

Ağır metaller endüstriyel atık sularının içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olmaktadır [5].

Son zamanlarda ağır metal kirliliği, sucul sistemlerde büyük bir çevresel sorun haline gelmektedir. Besin zincirinde ağır metal iyonları mobilize olabilir veya taşınabilmektedirler. Böylece ağır metal kirliliği sucul alanlarda ve toprakta görülebilmektedir. Ağır metallerin konsantrasyonları, besin zincirinin bir üst basamağında artarak organizmalarda birikmektedir. İnsanlar ve diğer yaşam formlarında, metallerin düşük konsantrasyonları bile toksik etkiye neden olmaktadır [20].

Ekolojik veya kamu sağlığı açısından ağır metallerin toprakta, suda veya tortularda olması potansiyel olarak bir tehlikedir. Örneğin, ortamda bulunan fazla miktarlardaki ağır metal bileşenleri organizmalar tarafından kullanılmamaktadır ve öldürücü etkiye neden olmaktadır [21].

Krom, kurşun, bakır, civa, gümüş, çinko, mangan, kadmiyum gibi katyonik metallerle kontamine olmuş sistemlerdeki canlılar olumsuz yönde etkilenmektedir. Örnek olarak, krom; insanlarda karsinojenik ve alerjik etkiye sahipken, kurşun; kan hücrelerindeki bölünmeleri baskılamaktadır, mangan; hayvanlarda merkezi sinir sistemi bozukluklarına neden olmaktadır ve fazla çinko alımı da lethal etki göstermektedir [22].

1.1.2.1. Gümüşün Çevresel Etkileri

Gümüş iyonları tüm canlılar için toksik etkiye sahiptir. İnsanlarda ve hayvanlarda vücuda gümüş alımı ile bazı organlarda işlev bozukluğu görülebilmektedir. Gümüş, gözler ve derinin gri-mavi renk aldığı argyria hastalığına neden olmaktadır. 0.4-1,0 mg/L aralığındaki konsantrasyonlar böbrekler, karaciğer ve dalakta patolojik değişmelere sebep olmaktadır. Hayvanlar, sindirim yoluyla alınan gümüşün yaklaşık %10 unu absorbe edebilmektedir. Çeşitli organlarda özellikle karaciğer ve dalakta, metal şeklinde gümüş saptanmaktadır. İnsanlarda gümüş alındıktan 16 gün sonra, alınan gümüşün %50 den fazlası karaciğerde saptanmıştır. Bazı enzim sistemlerinde ve biyolojik önemi olan kimyasal gruplarda sülfidril komponent şeklinde bağlanarak, proteinlerin presipitasyonu ve bazı enzimlerin inaktivasyonunda rol oynamaktadır [23].

1.1.2.2. Stronsiyumun Çevresel Etkileri

Stronsiyum toprakta bulunan bir elementtir. Sr 90 izotopu radyoaktif özelliğe sahiptir ve canlılar için oldukça tehlikelidir. Khan ve arkadaşları [24], sanayi kuruluşlarının bulunduğu alanlardan aldıkları su örneklerinde Sr konsantrasyonunun yüksek olduğunu göstermişlerdir. Sr iyonlarının açığa çıkmasına, bazı sanayi kuruluşlarının atıklarının neden olduğu belirtilmiştir ve bu alanlarda, büyük ölçekli sanayileşmenin olumsuz etkilerinin su kalitesinin bozulmasında belirgin olarak rol aldığı göstermişlerdir.

Kirlenmiş sulardaki alkalın metal olan Sr iyonlarının organizma üzerindeki olumsuz etkileri son zamanlarda belirgin hale gelmiştir. Kimyasal özellikleri kalsiyuma benzemektedir ve kemik yapısında birikme eğilimi vardır. Sr iyonlarının fazla miktarda vücuda alınması sonucunda, kemik kanseri, lösemi, yumuşak doku kanseri ve anemi gibi hastalıklara neden olmaktadır. Organizmaların maruz kaldığı Sr ağır metali ile kirlenmiş sulardan bu iyonların uzaklaştırılması önemlidir [25].

1.1.3. Ağır Metallerin Kullanıldığı Endüstri Dalları

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metal temizleme, metal işleme, elektronik kaplama, deri, boya, tekstil, matbaacılık, elektrik-elektronik, seramik, cam, otomotiv ve fotoğrafçılık gibi endüstrilerden gelen atık sular, kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler. Bu ağır metaller, endüstriyel faaliyetler sonucunda doğal konsantrasyonlarının üzerinde çevreye yayılmaktadır [8, 26, 27].

Çizelge 1.1. Ağır metallerin kullanıldığı bazı endüstriyel dallar [8, 18, 26, 27]

Ağır Metal	Kullanıldığı Sanayi Dalları
Gümüş	Tıp alanında, fotoğrafçılıkta, takı yapımında, maden endüstrisi
Kadmiyum	Petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, enerji üretimi
Krom	Çimento, kağıt, boya sanayinde
Bakır	Ağaç ve metal işletmeciliği, ev aletleri yapımı sanayi, maden kaplama işletmeciliği
Demir	Tekstil sanayi, maden endüstrisi
Civa	Bazı metallerin üretim prosesleri, kağıt sanayi, madencilik
Nikel	Madencilik, rafinasyon işlemleri
Kurşun	Kozmetik, maden endüstrisi, kurşunlu benzin üretimi, seramik
Stronsiyum	Savunma ile ilişkili aktiviteler ve çeşitli endüstriyel işlemlerde
Çinko	Karışık endüstri sanayileri, tekstil sanayi

Çizelge 1.1.'de görüldüğü gibi metal kirliliği içeren atıksuların başlıca kaynakları arasında; maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum üretimi), metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom vb.) ve diğer metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri gelmektedir [8, 18, 24, 26].

1.1.3.1. Gümüşün Kullanım Alanları

Antimikrobiyal etkisinden dolayı birçok tıbbi uygulamalarda gümüş kullanılmaktadır. Örneğin, dişçilerde kullanılan amalgamlar, %35 gümüş ve %50 civa içermektedir. Gümüşün elektrokimyasal deneylerinde, gümüşün potansiyel olarak klorun alternatifi olduğu, içme sularında da dezenfeksiyon uygulamaları için kullanıldığı da görülmektedir. İlk olarak Avrupa'da gümüş, onlarca yıl boyunca etkili bir biçimde su dezenfeksiyonunda ve ayrıca su filtrelerindeki ve havuzlardaki mikroorganizmaların büyümesini önlemek amacıyla da kullanılmıştır. Bu filtrelerde insan sağlığını tehdit etmeyecek kadar düşük oranda (1-50 ppb) gümüş kullanılmaktadır [18]. Martinez ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [18], 0.3 ppm Cl, 200 ppb Ag ve 1.2 ppm Cu ile kombine edilerek, soğutma sistemlerindeki mikroorganizmaların büyümelerinin kontrol edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca günümüzdeki antiseptikler gümüş nitrat ve gümüş sülfadazin içermektedirler. Örneğin; bir topikal kremde %1.0 gümüş sülfadazin bulunmaktadır. Ag/Cu iyonizasyonu ise, soğutma sistemlerinde bakterilerin büyümelerini kontrol edebilmek için kullanılmaktadır.

1.1.3.2. Stronsiyumun Kullanım Alanları

Stronsiyum, nükleer güç testlerinde, renkli televizyon için görüntü tüplerinin ve demir esaslı mıknatısların yapımında, çinkonun saflaştırılmasında, işaret fişegi ve havai fişeklerde kırmızı rengin elde edilmesinde, elektrik endüstrisinde, şeker fabrikalarında kullanılmaktadır. Nükleer pillerin ve fosforlu boyaların yapımında da bu elementten faydalanılmaktadır [28]. Ayrıca, endüstriyel alanlarda kullanılan stronsiyum dışında, toprakta da doğal olarak stronsiyum bulunmaktadır ve suda eriyerek, derin toprak tabakalarına kadar nüfuz etmektedir [24].

1.1.4. Metal Uzaklaştırma Yöntemleri

1.1.4.1. Geleneksel Metal Uzaklaştırma Yöntemleri:

Çevreden ağır metal uzaklaştırmak için kullanılan geleneksel metodların yeni çevresel sorunlar yarattığı, yetersiz ve pahalı olduğu bilinmektedir. Atık sulardan ağır metalleri uzaklaştırmak için uygulanan oksidasyon, indirgeme, çöktürme, filtrasyon, buharlaştırma, iyon değiştirme, ters ozmoz gibi elektrokimyasal, fiziksel ve kimyasal metotlar genellikle yüksek işletme masrafları gerektirmeleri ve oluşan katı atık çamurlarının zor işlenir olmasından dolayı ticari olarak pratik değildir. Çok miktarda kimyasal gereksinimi ve önceden öngörülemeyen metal giderimi bu teknikler için söz konusu olan bazı dezavantajlardır. Ayrıca, desorpsiyon için güçlü ve kontamine olmuş kimyasalların kullanımı, oluşan toksik çamurların depolanacağı özel bölgelerin gerekmesi, ikincil çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu dezavantajlar özellikle kompleks yapıcı organik madde ve düşük metal kontaminasyonu içeren büyük hacimli endüstriyel atık suların işlenmesi sırasında daha belirgin olmaktadır [29]. Ayrıca endüstriyel atıklardan zehirli ağır metal uzaklaştırma işlemi yıllardır uygulanmasına rağmen, en sık olarak kullanılan fiziko - kimya prosesleri maliyet olarak da sınırlılık göstermektedir [30].

1.1.4.2. Biyolojik Metal Uzaklaştırma Yöntemleri:

Son yıllarda küresel endüstrileşme ve teknolojiye bağlı olarak ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini gidermek veya azaltmak için atık maddelerin giderimi ya da değerlendirilmesinde kullanılan klasik endüstriyel yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir [31].

Endüstriyel kirliliğin temizlenmesinde biyolojik metodların kullanılması ciddi bir ivme kazanmıştır. Bunun nedeni ise, ağır metal kirliliğinin bulunduğu ortamı biyolojik yöntemlerle yüksek verimlilik, düşük işletme maliyeti ve basit olarak temizlenmesinden kaynaklanmaktadır [32].

Biyoteknolojik yaklaşımlar bu avantajlarından dolayı geleneksel metal uzaklaştırma yöntemlerine göre daha başarılı olmaktadır. Mikroorganizmaların ağır metal stresine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları, metal kirliliğinin temizlenmesi için önemlidir. Atıkların içerisindeki esnek fiziko- kimyasal parametreler ele alındığında ise, seçici biyolojik metal temizleme tekniklerinin bazı avantajları vardır; yalnızca istenilen metaller ortamdaki uzaklaştırılabilir ve fazla maliyet etkisi de ortadan kaldırılabilir. Bu faktörlerin biyolojik olarak metal uzaklaştırma yöntemleri üzerinde geniş bir desteği vardır ve bu nedenle çevre kirliliğinin iyileştirilmesi için biyoremediasyon umut verici bir teknolojidir [30, 33].

1.1.4.2.1. Biyoremediasyon

Biyoremediasyon (biyoyileştirme), mikroorganizmaların organik ve inorganik kirliliği (metalik ve radyonüklid kirliliği) temizlemek için uyguladığı iyileştirme, immobilizasyon veya detoksifikasyon gibi işlemlerdir [34].

Bazı bakteriler hem doğal hem de insanların oluşturduğu biyoremediasyon proseslerinde kullanılmışlardır. *Pseudomonas*'lar, *Methanobakter*'ler biyoremediasyon sürecine katılan mikroorganizmalardır. Bu bakteriler, diğer organizmalarla birlikte, örneğin; AB'de yıllık 40 milyar galon kanalizasyon suyunu temizleme işlemine tabi tutulmuşlardır [35]. Spesifik bakteriler karbon, nitrojen, azot ve fosforlu bileşiklerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadırlar. Ayrıca bakteriler sahip oldukları anaerobik ve aerobik metabolizmaları sayesinde toksik metalleri, aromatik bileşikleri, herbisitleri, pestisitleri ve ksenobiyotikleri çok basamaklı prosesler ile uzaklaştırmaktadırlar. Yakın zamanda tanımlanan *Accumulibacter phosphatis*'in, önceki araştırma sonuçlarının aksine fosfat uzaklaştırılmasından sorumlu birincil ajan olduğu gösterilmiştir [35]. Böylece bakteriler sayesinde 'atık' su yenilenebilir bir kaynak haline almaktadır. *Thiobasillus* genus üyeleri yaygın olarak madencilikte biyoremediasyon amacıyla kullanılmaktadır. *Ralstonia metallidurans* ve *Deinococcus radiodurans*, yüksek seviyedeki toksik metalleri ve radyoaktiviteyi tolere edebilmektedirler [35].

Bakterilerin biyoremediasyon ajanları olarak kullanılması ancak yakın zamanda gerçekleştirilmiştir [35].

Mikroorganizmalar bazı farklı mekanizmalar ile metallerle etkileşim kurabilmektedirler ve bazı biyoremediasyon stratejilerini kullanabilmektedirler. Biyoremediasyon, ağır metal içeren endüstriyel kirlilikte biyoabsorpsiyon, biyoakümülyasyon, biyoprespitasyon ve pürifiye polimerler tarafından kirliliğin uzaklaştırılması gibi birkaç biyoteknolojik yöntemin kullanılması ile kimyasal ve fiziksel metotlara alternatif olarak mikroorganizmalardan yararlanmayı ortaya koymaktadır [36]. Canlı ya da cansız mikroorganizmalar ve onların ürünleri, biyoakümülyatör olarak çözüm üretebilir veya belirli form metaller üzerinde oldukça etkilidirler [36].

Biyosorpsiyon , yaşayan veya yaşamayan bir biyokütlenin, ağır metalleri bünyesine alması olarak tanımlanan etkili bir süreçtir [19]. Vasudeman ve arkadaşları [16], inaktif veya aktif mikrobiyal biyokütlenin, ağır metal konsantrasyonunun çok düşük olduğu solüsyonlarda bile bağlanma olarak biyosorpsiyonu tanımlamışlardır.

Biyosorpsiyon, hücre duvarında yer alan bir işlemdir, hızlı gerçekleşir ve yüksek oranda katyon uzaklaştırabilmektedir. Biyosorpsiyonda belirli bir sorbent kullanılarak ampirik bağlanmalar tespit edilmektedir [37].

Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyi, çeşitli anyonik yapılar nedeniyle negatif yüke sahiptir. Bu durum bakteriye metal katyon bağlama yeteneği vermektedir. Çeşitli mikrobiyal türlerin uranyum, bakır ve kirli atıklardaki diğer metal iyonlarının biyosorpsiyonu için oldukça verimli oldukları görülmüştür [38].

Biyosorpsiyon, hücresel ve pozitif yüklü metal iyonlarını yok etmemektedir. Hücre yüzeyi üzerindeki negatif iyonik gruplar ilk olarak metalleri absorblar ve pozitif ile negatif yükler birbirlerine tutunurlar. Bakteriler üzerindeki polisakkarit tabaka veya diğer ekstrasellüler yapılar (kapsüller ve salgı tabakaları) genellikle bu bağlanma için yardımcı olmaktadır. Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle spesifik olmayan bir şekilde bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma, dış membranda yer alan

-NH₂, -SH, -OH, -SO₃H, -COOH ve -PO₃H grupları ile metal iyonları arasındaki spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir [16, 39].

Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal iyonlarını biyosorblama yeteneğine sahiptir ve bu sayede iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı metalle karşı sınırlı bir koruma sağlanmaktadır [39]. Metal iyonlarını bağlama özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir [40].

Panak ve arkadaşlarının [41] yaptığı çalışmalarda, uranyum kirliliği olan bir bölgede farklı ağır metal iyonlarına dirençli bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar, *Bacillus cereus*, *B. megaterium* ve *B. sphaericus* suşlarıdır. Yapılan bu deneyde kullanılan Sr metalinin konsantrasyonu ise 65 µg/L olarak belirlenmiştir ve *Bacillus cereus* suşunun en fazla miktarda Sr ağır metalini absorblamış olduğu görülmüştür.

Ağır metal bulunan solüsyonlardan, biyoakümülyasyon veya biyosorpsiyon ile mikroorganizmalar tarafından ağır metaller fiziksel olarak uzaklaştırılmaktadırlar. Biyoakümülyasyon, bir organizma tarafından belirli konsantrasyonlarda bulunan maddelerin kayıp oranlarından fazla olduğunda gerçekleşen bir işlemdir. Ağır metallere maruz kalan mikrobiyal hücrelerin membranından geçen metal iyonları, hücre sitoplazmasından içeri geçerek sitoplazma içerisinde tutulmaktadırlar [16].

Birçok alg, fungus ve bakteri türlerinin metal iyonlarını absorbe ettikleri ya da biriktirdikleri bilinmektedir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringa*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı gram-negatif bakteri türlerinin biyoakümülyasyon yetenekleri, intrasellüler olarak sentezlenen kadmiyum-bağlayan proteinlerin sentezi ile anlaşılmıştır [42].

Biyoakümülyasyon, metabolik bağımlı bir süreçtir. Kirlilik veya katyonların ortamda bulunduğu durumlarda, hücre içinde veya hücre membranı üzerinde birikebilmekte veya metabolik döngüye katılabilmektedir [37].

Tüm mikroorganizmaların hücre yüzeyleri negatif yüklü çeşitli anyonik yapıya sahiptir ve bakterilere metal katyonlarının bağlanmasına neden olmaktadır. Çeşitli mikrobiyal türler, başlıca *Pseudomonas*'lar, farklı metallere karşı oldukça etkili biyoakümülyasyon gösterebilmektedir [43].

Bakteri hücrelerinde metal biyosorpsiyon sıklığının artmasıyla hücre yüzeyindeki yük yoğunluğu da fazla olmaktadır. Bu durumda fonksiyonel grupların yüklendiği ve çeşitli metallerin tortu olarak çekirdek çevresinde çöktüğü görülmektedir [16]. Anderson ve arkadaşları [44], stronsiyum iyonlarının, organizmalar tarafından doğrudan indirgenemedikleri göstermişlerdir. Ancak, çözünmeyen stronsiyum bileşiklerin stronsiyum iyonlarının hücre içinde çökeldiği görülmüştür.

1.1.5. Bakterilerde Metal Dirençlilik Mekanizmaları

İnsan aktiviteleri, madenlerin işlenmesi ve çeşitli endüstriyel kirlilikler, metallerin çevrede birikimine neden olmaktadır. Mikroorganizmaların bu çevrelere bazı özel direnç mekanizmaları ile adapte olduğu rapor edilmiştir [45]. Mikroorganizmaların metallere karşı dirençlilikleri, metal toksisitesine tolerans sağlayan değişik direnç mekanizmaları sayesinde gelişmektedir [45].

Mikroorganizmalardaki bazı enzimlerin aktif merkezlerinde, divalent veya geçiş metallerinin bulunması, mikroorganizmaların var oluşlarından itibaren metallere maruz kaldığının bir kanıtıdır. Bu enzim-metal ilişkisi, proteinlerin yapısının korunmasını veya anahtar reaksiyonların katalizlenmesini sağlamaktadır. Bu metaller hücrelerin normal metabolizması için gereklidir [46].

Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atık sulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik, karsinogen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilmesi ağır metallere direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarca ağır metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına

aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir. Ağır metallere dirençli mikroorganizmalar, bahsedilen bu direnç sistemlerinden birini veya birkaçını bir arada kullanarak ağır metalin toksik etkisinden korunmaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır [47].

Tüm bakteri genleri, 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 iyonları içerirler. Örneğin; bakterilerdeki Cd^{2+} atım pompaları, iç membran P tipi ATPaz veya üç polipeptid RND kemiozmotik kompleksi iç membran pompasını, bir periplazmik köprü proteini de bir dış membran kanalını oluşturmaktadır [48].

Gram negatif bakterilerde *czc* sistemi, kadmiyum, çinko ve kobalta karşı dirençlilik sağlamaktadır. *Czc*, bir katyon-proton antiporter genlerini kodlamaktadır (*CzcABC*). Bir benzer sistem de *ncc* sistemidir. *Alcaligenes xylosoxidans* da bulunmuştur ve nikel, kadmiyum ve kobalta karşı dirençlilik sağlamaktadır. Gram pozitif bakterilerde ise kadmiyum dirençlilik mekanizması (*Staphylococcus*, *Bacillus* vb.) Cd-atım ATPaz'dır. Yapılan çalışmalarda bakır direnç sistemleri *Pseudomonas syringae*'den *cop* ve *E. coli*'den *pco*'dur. *Cop* genleri, farklı olarak bakır bağlanan proteinleri de kodlamaktadır ve periplazma da veya dış membran proteinlerinde bakırın tutulmasına izin vermektedir. *Pco* sisteminde ise iyon bağımlı bakır antiporterlerinin olduğu sanılmaktadır [49].

Jeffrey J. Lawrence [15] tarafından ileri sürülen, "Selfish Operon Theory", organizmanın hayatta kalması için gerekli birden fazla dirençlilik genleri plazmit üzerinde kümelenmiş ise bu genlerin konjugasyonla diğer bakterilere aktarımının mümkün olduğu şeklindedir. Böylece bir ortamdaki çoklu stres (örn; ağır metaller ve antibiyotikler) oluşturan etkenlere karşı hayatta kalmak için gen aktarımı

ekolojik olarak uygundur. Böyle bir durumda, antibiyotik direnci ve ağır metal direnci arasında bir ilişkiye işaret edilmektedir.

Doğal çevredeki metal kirliliğinin, antibiyotik dirençliliğinin devam etmesinde ve dirençliliğin artmasında önemli bir rol oynadığını destekleyen çok sayıda raporlar vardır. Örneğin, *Bacillus* suşlarında 2-200 kb boyutunda endojen plazmitlerin varlığı araştırılmıştır. *Bacillus* suşundaki yabancı bir genin ifadesi için endojen plazmit DNA'nın kullanılmasının avantaj sağladığı görülmüştür [50]. Atık sulardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus* bakterilerinin ağır metal ve antibiyotiklere karşı dirençli oldukları görülmüştür [51]. Çoklu tolerans da ise 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 [51].

Çizelge 1.2. Antibiyotiklerin genel sınıflandırılması [52]

Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler	β-laktamlar Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	Glikopeptidler Vankomisin Avoparsin Teikoplanin			
Protein Sentezini İnhibe Edenler	Aminoglikozidler	Tetrasiklinler	Makrolidler	Streptograminler	Kloramfenikol
	Streptomisin Neomisin Kanamisin Gentamisin	Klortetrasiklin Oksitetrasiklin	Eritromisin Azitromisin Klaritromisim	Virginiamisin Quinupristin- Dalfopristin Pristinamisin	
Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler	Kinolonlar	Sülfonamidler	Rifamisin		
	Siprofloksasin Norfloksasin	Sülfamethoksazol -Trimetoprim			

Antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine karşı direnç göstermek için inaktivasyon/modifikasyon, hedef değiştirme (hedef alan mutasyonları) ve düşük birikim nedeniyle geçirgenliğin azalması veya akışın artması gibi mekanizmalar geliştirmişlerdir. Örneğin, *E. coli*'nin direnç mekanizmaları tanımlanmıştır ve protein sentezini inhibe eden tetrasikline karşı atım mekanizması belirlenmiştir. Aradan geçen yıllarda, atım mekanizmasını çok sayıda plazmitin ve kromozomal DNA'nın kodladığı, her ikisinin de spesifik ve çoklu antibiyotiğe karşı direnç mekanizmasını oluşturduğu tanımlanmıştır [53].

Karbasiid ve arkadaşları [54], *Klebsiella pneumoniae* suşlarında çoklu antibiyotik dirençliliğini araştırmışlardır. *Klebsiella pneumoniae*'nin ampicillin (100%), tetracycline (50%), kanamycin (20%), gentamycin (13,3%), ciprofloxacın (20%), nalidixic acid (20%) ve cefolothin (6,6%) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiğini saptamışlardır.

Çizelge 1.3. Bakterilerdeki ağır metal ve antibiyotik ortak dirençlilik sistemleri [55]

Direnç Mekanizması	Metal İyonları	Antibiyotikler
Membran geçirgenliğinin azaltılması	As, Cu, Mn, Zn, Co, Ag	Cip, Tet, Chlor, β-lactams
Antibiyotik ve metal değiştirme	As, Hg	β-lactams, Chlor
Atım mekanizması	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tet, Chlor, β-lactams
Hücre sel hedef değiştirme	Hg, Zn, Cu	Cip, β-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

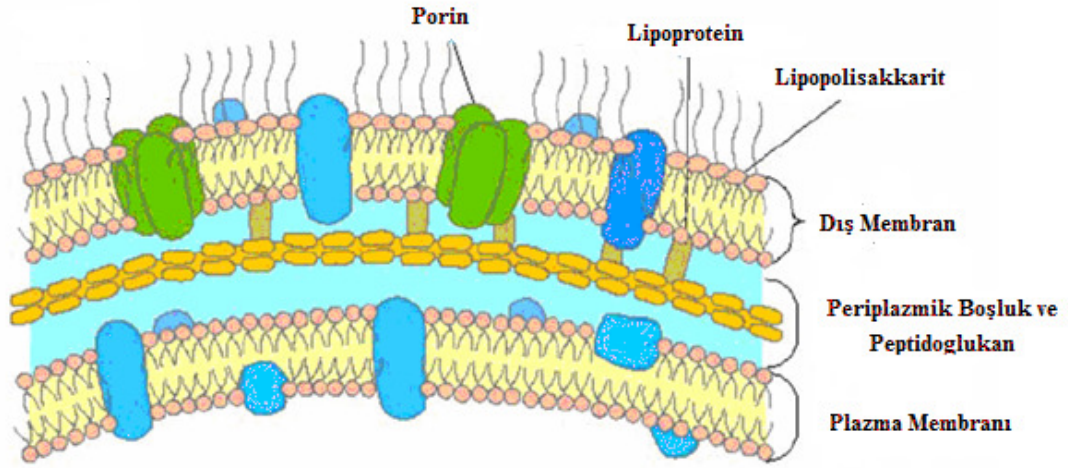
Önemli sayıdaki raporlar, doğal çevredeki metal kontaminasyonunun, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasını ve korunmasını desteklediğini göstermektedir. Çizelge 1.3.'de antibiyotik dirençliliği genel, yapısal ve fonksiyonel karakter olarak metal dirençliliği ile ortak özelliklere sahip olduğu gösterilmektedir [55].

Mikroorganizmalar, toksik metal varlığında adaptasyon için çeşitli mekanizmalar kazanmışlardır [51]. 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.

1.1.5.1. Geçirgenlik Bariyeri ile Metallerin Hücre Dışında Tutulması

Bakteriyel hücre duvarındaki geçirgen bariyer sayesinde, metal iyonları hücre dışında bırakılmaktadır. Mikroorganizmanın hücre duvarında, membranında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel komponentlerini metal iyonlarının toksik etkisinden korumaktadır. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada bakterinin membran kanal proteini olan porinlerin sayısını azaltmak suretiyle gümüş iyonlarının hücre içine girişinin engellendiği bildirilmiştir [56].



Şekil 1.3. Gram negatif bakterilerde porin proteinlerinin yapısı [57]

Şekil 1.3'de görüldüğü gibi porinler, çift katmanlı lipit membranlar arasında moleküllerin taşınmasına izin veren, protein formunda ve hidrofilik çözücüler için geçirgenliği az olan kanallardır. Porinler, membranlarda birden çok fonksiyonu sağlamaktadır. Porinler, diğer hücrelere yapışması için potansiyel hedefler olarak hareket edebilirler ve gram negatif bakterilerin yüzeyine bağlanabilmektedirler [58]. Leonhauser ve arkadaşlarının [59] yaptıkları çalışmada, Hg(II) ağır metaline dirençli olduğu bilinen *Pseudomonas putida* suşlarının yüksek konsantrasyonda Hg(II) ağır metaline maruz bırakıldığında, bakterilerin toplam hücresel proteomunda çok az bir değişim belirlenirken, özellikle hücre zarına ait taşıyıcı proteinlerde değişiklik gözlenmemiştir. Bu çalışmaya göre, yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda katyon akışını sağlayan taşıyıcı

proteinlerin yapımı 45 kez daha fazla olurken, bir dış zar proteini olan porinin sentezinin 106 kat azaldığı tespit edilmiştir.

LPS, gram negatif bakterilerin dış membranlarında koruyucu olarak bulunan moleküllerdir. LPS molekülleri, lipit A, tekrarlanmayan oligosakkarit (çekirdek) ve uzun bir polisakkarit (O-antijen) yapısına sahiptir. Bu uzun polisakkarit yapısı hücre dışı ile bağlantılıdır. LPS, iki form olarak bulunmaktadır. Molekül ağırlığı yüksek olan forma S tipi LPS, düşük molekül ağırlığındaki forma da R tipi LPS'dir. S tipi LPS'de lipit A, çekirdek ve O-antijen varken, R tipi LPS'de O-antijen yoktur. Bu farklılıktan dolayı R tipi LPS'ye sahip bakteriler patojen değildirler [60]. Hücre yüzeyinde anyonik yüklü ve nötr pH'a sahip olan LPS yapıları, karboksil ve fosforil gibi fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu gruplar dış membran yüzeyinde metal bağlama alanları oluşturarak, metal iyonlarını tutmaktadırlar [61]. Gram (-) bakteri olan *Burkholderia*'de kadmiyum metalinin bulunduğu bir ortamda LPS salımının arttığı belirlenmiştir ve biyoremediasyon için uygun bir mikroorganizma olduğu bildirmiştir [62].

Bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmaya dayandığı görülmektedir. Cu(II) dirençliliği operonda yer alan *copA*, *copB*, *copC* ve *copD* olarak adlandırılan genler tarafından sağlanmaktadır. Bu genlerden, *copA* ve *copB* kısmi dirençlilik sağlarken *copC* ve *copD* genleri Cu(II)'ye karşı tam dirençlilik sağlamaktadır. *copA* ve *copC* genlerinin kodladığı proteinler iç ve dış membran arasında, *copB* genin kodladığı proteinler ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, dirençliliğin ya periplazmik bağlanmadan veya ekstrasellüler ayırmadan kaynaklandığını desteklemektedir [63].

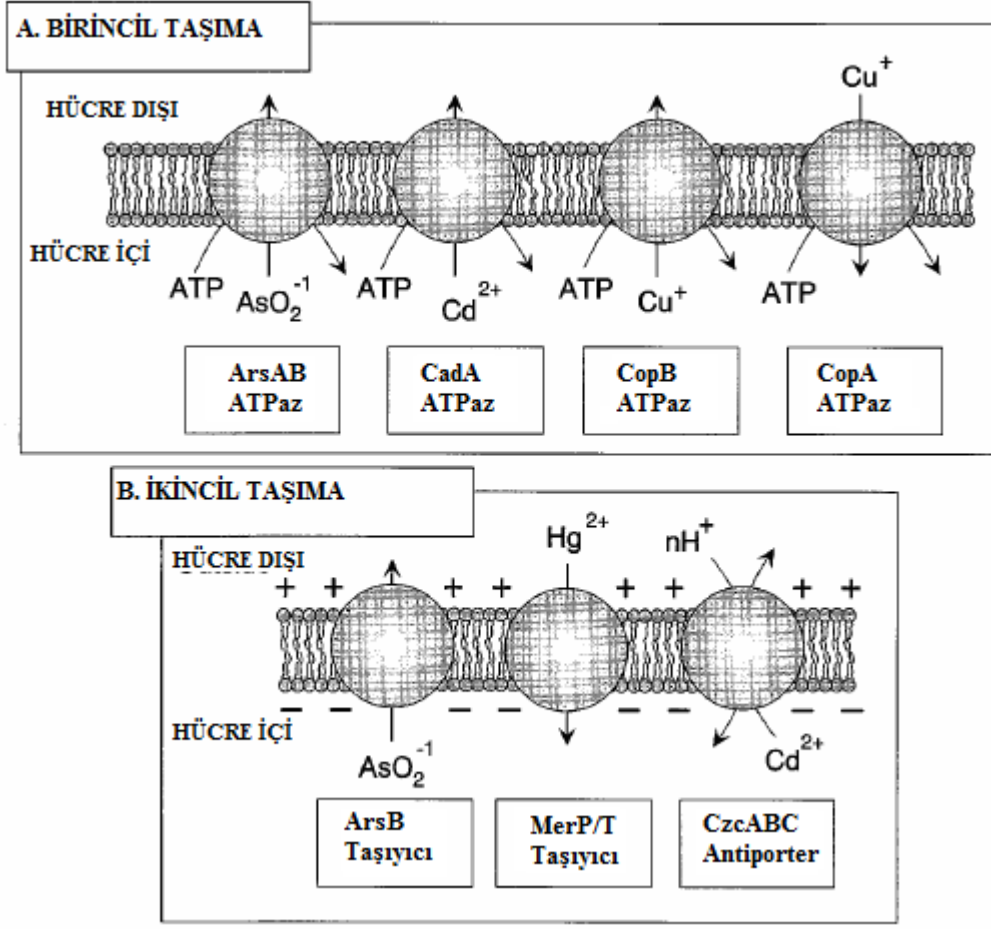
Birçok bakteri, antibiyotik varlığında hayatta kalmak için, yapılarında değişiklikler meydana getirmektedirler. Bu değişiklikler, porinlerin düzenlenmesi veya antibakteriyel baskının gelişmesi olabilmektedir. Porinler, direnç mekanizmalarında önemli rol oynamaktadırlar. Bazı raporlarda, *Acinetobacter baumannii*'de antimikrobiyal dirençlilikle bağlantılı olarak bazı dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [58].

Bakteriyel adaptasyonda dış membran geçirgenliğinin azaltılması, yaygın olarak artan bir problemdir ve metal atım mekanizması ile birlikte, antibiyotiklere karşı dirençliliğin sağlanmasında ve yayılmasında önemlidir. Bu önemli keşif, hayatta kalma faaliyetlerinde, yeni antibiyotik bileşenlerine karşı farklı bakteriyel suşların kullanılmasında, çeşitli dirençlilik temellerinin korunmasında ve son zamanlarda ortamda bulunan değişik kimyasalların (kuvvetli inhibitörler gibi) tanımlanmasında, direnç mekanizmalarını veya antibiyotik aktivitesini kolaylaştırmaktadır [64].

1.1.5.2. Metallerin Hücreden Dışarı Doğru Aktif Taşınımı

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmit üzerinde olabilmektedir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılmaktadır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı ya da ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilmektedir [65].

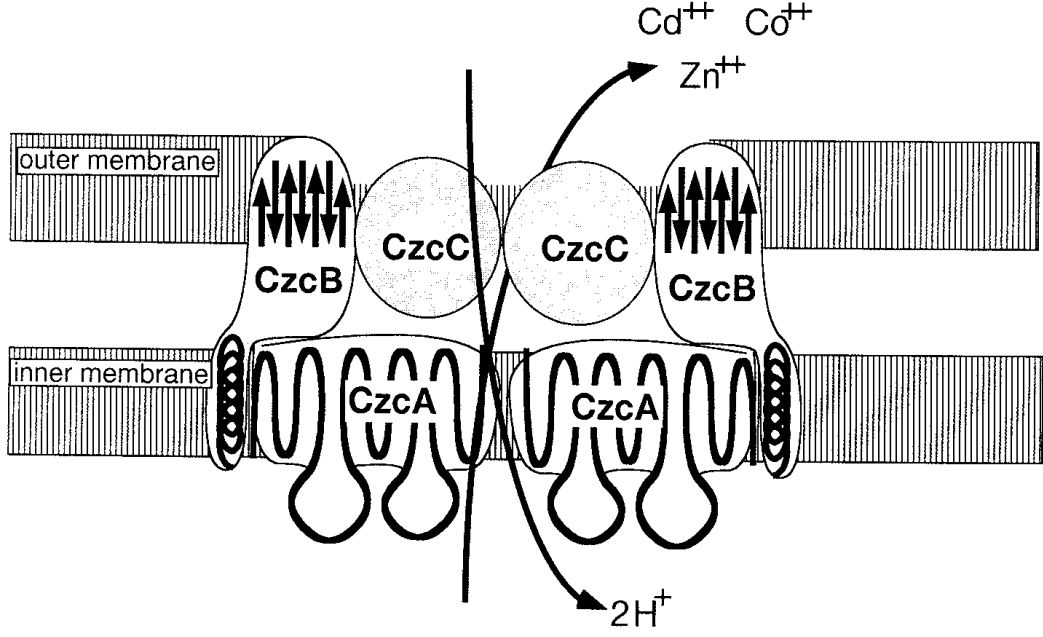
Gram negatif bakterilerde, dış membran sınırlarından hücrelere giren ağır metal iyonları ve antibiyotikler, atım pompalarını aktifleştirmektedirler ve farklı yapıdaki antimikrobisidler bakteriden dışarı atmaktadırlar. Atımı gerçekleştiren taşıyıcılar canlı hücrelerde eksprese olur ve hücreleri toksik etkili organik kimyasallardan korumaktadır. Bakterilerdeki çoklu metal dirençliliği, çoğu kez aşırı eksprese olan bu taşıyıcılarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Antimikrobisidler hücreden dışarı çıkmak amacıyla geçirgenliği düşük olan dış membranlardan tekrar içeri girmektedirler ve bu nedenle atım pompaları düşük geçirgenliği olan dış membranlarla sinerjik bir şekilde çalışmaktadırlar [58].



Şekil 1.4. Bakteriyel hücre duvarından ATP bağımlı ve bağımsız metal atılımı [66]

(A) Birincil Taşıma. ATPaz katalizlediği metal katyonlarının veya oksianyonların hücre dışına atılma işlemidir. Kimyasal enerji kullanılarak metal iyonları hücre dışına taşınmaktadır.

(B) İkincil Taşıma. Uniporter veya antiporterler, metal katyonlarını veya oksianyonları elektroforetik katalizleme ile hücre dışına atmaktadır. Elektrokimyasal gradient farklılığından yararlanılarak metal iyonları hücre dışına taşınmaktadır.



Şekil 1.5. Bakteriye hücre duvarında Czc modeli [67]

Şekil 1.5’de görüldüğü gibi bakteriler, Cd, Zn ve Co metallerine direnç için atım sistemini geliştirmişlerdir. İç membranda CzcA, dış membranda CzcC ve membran füzyon proteinleri CzcB bulunmaktadır. Elektrokimyasal gradient farkı oluşturularak Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Co^{2+} metal iyonlarının hücre dışına atılım mekanizması ile mikrobiyal dirençlilik oluşturmaktadır.

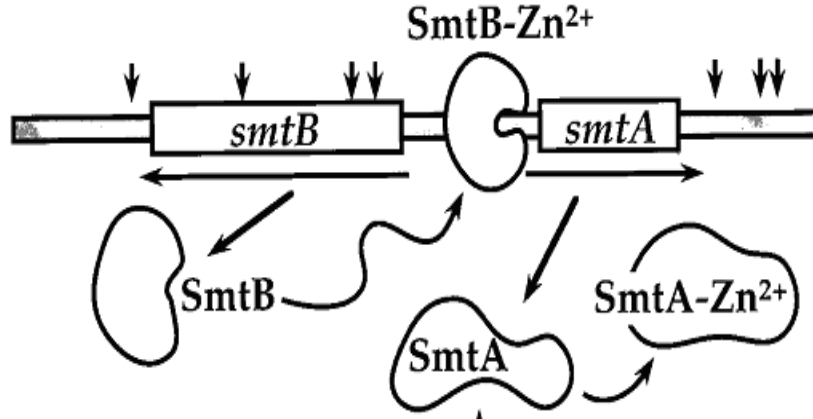
Cánovas ve arkadaşları [14] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun gümüş, kadmiyum, çinko ve krom metallerine karşı atım sistemi ile direnç geliştirdiklerini incelemişlerdir. Kadmiyum ve çinko dirençliliklerinin ATPaz’ın katalizlediği atım mekanizması ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Metal iyonlarının hücreden dışarı atılımı için proteinlerin rolleri vardır. *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun krom atım sistemi için ChrA proteini, gümüş ve bakır atım sistemi için CusC, CusB, CusA proteinleri, kadmiyum ve çinko ATPaz bağımlı atım sistemi için de CadA2 proteinin sorumlu olduğunu göstermişlerdir.

1.1.5.3. Metallerin Proteine Bağlanması ile Hücre İçinde Tutulması

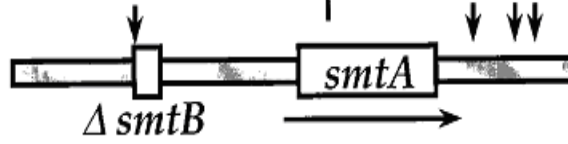
Metaller ve metalloidler, oldukça toksiktirler ve prokaryotlar bu toksik bileşiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Birkaç araştırmacı bakterilerde metallothionein varlığını ortaya koymuşlardır [46]. Bakteriyel sistemlerde metallothionein (metal bağlayan proteinler) üretimi ile çinko, kadmiyum, nikel, kobalt, civa ve arsenik gibi ağır metallerin toksisitesine karşı direnç sağlanmaktadır. Metallothioneinler sülfidril içeren, sistein bakımından zengin, metallerle karşı yüksek affinitesi olan ve böylece bakterileri metallerin toksisitesinden koruyan proteinlerdir. Metal iyonları sistein kalıntılarındaki sülfidril bağlarına bağlanmaktadır [68].

Metalloprotein direnç sistemini kodlayan genler, bazı durumlarda kromozomal veya R-faktör gibi ekstrakromozomal elementler üzerinde bulunabilmektedir. Bu R-faktör büyük plazmitlerdir ve genellikle birden fazla metale karşı dirençlilik kazandırabilmektedirler [46]. Prokaryotik metallothionein üretimi bir mavi-yeşil bakteri olan Cyanobacterler olan *Synechococcus* da detaylı olarak çalışılmıştır ve Zn^{2+} ve Cd^{2+} metal iyonlarına karşı metalloproteinler bu bakteriye direnç kazandırmışlardır [46]. Gerçekte metallothionein, bakteriyel dünyada olağandışı bir üretilmektedir. Bu tip dirençlilik genellikle plazmit bağlantılıdır ve dolayısıyla hücreden hücreye dirençlilik aktarımı kolaydır. *Pseudomonas putida*, *E. coli* ve *Ralstonia metallidurans* bakterilerinde Cd^{2+} 'yi bağlayan proteinlerin eksprese oldukları görülmüştür [46].

A. İNDÜKSİYON



B. DELESYON



Şekil 1.6. *Synechococcus*'ta Zn^{2+} metalinin metallothioneine bağlanma sistemi [67]

smtA (metallothionein) ve *smtB* (regülatör) genlerinin transkripsiyonu sonucunda metallothionein üretimi ve metal bağlanma mekanizması Şekil 1.6'da gösterildiği gibidir [66]. Metallothionein, metal kirliliğinin olduğu bir ortamdan izole edilen *Pseudomonas putida* da tespit edilmiştir ve *Synechococcus smtA* genleri ile yüksek derecede homoloji gösterdiği saptanmıştır. *Synechococcus* da, metallothionein üç boyutlu yapısı ile tanımlanmıştır ve sistein kalıntıları metal şelasyonunda gösterilmiştir. *Pseudomonas*'larda (*Pseudomonas putida* KT2440 ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve *Synechococcus* metallothioneinlerinin dizilimlerinde bir veya iki sistein kalıntılarının metal bağlamada rol aldıkları saptanmıştır [14].

1.1.5.4. Ekstrasellüler Alınım

Penninckx ve Jaspers'ın raporlarına göre, mikroorganizmalarda glutatyon gibi kükürt bakımından zengin bileşiklerin sentezi, ağır metallere karşı direnç sağlamaktadır [67]. Glutatyon, L-sistein, L-glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşan ve ağır metallere karşı yüksek affinitesi olan bir tripeptittir [69].

Ağır metal katyonları, glutatyona bağlanarak bis-glutatyonu oluşturmaktadırlar. Bu kompleks moleküller, oksijen ile etkileşime girerek bis-glutatyon (GS-SG) kompleksini meydana getirmektedirler. Oksitlenmiş bis- glutatyon, NAPH bağımlı reaksiyonlarda tekrar indirgenmektedir ve serbest kalan metal katyonları diğer iki glutatyon moleküllerine bağlanarak, büyük oksidatif stres yaratılmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, ağır metal oksianyonları, metabolizmada ağır metal ile bağlantısı olmayan yapılarla bağlantı kurabilmektedir (krom, sülfat ile; arsenik, fosfat ile) ve ağır metal oksianyonları indirgenerek serbest radikallerin üretilmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca glutatyon, Ag^{1+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ve Hg^{2+} gibi metallere hücrenin korunması için bir örnek teşkil etmektedir [16].

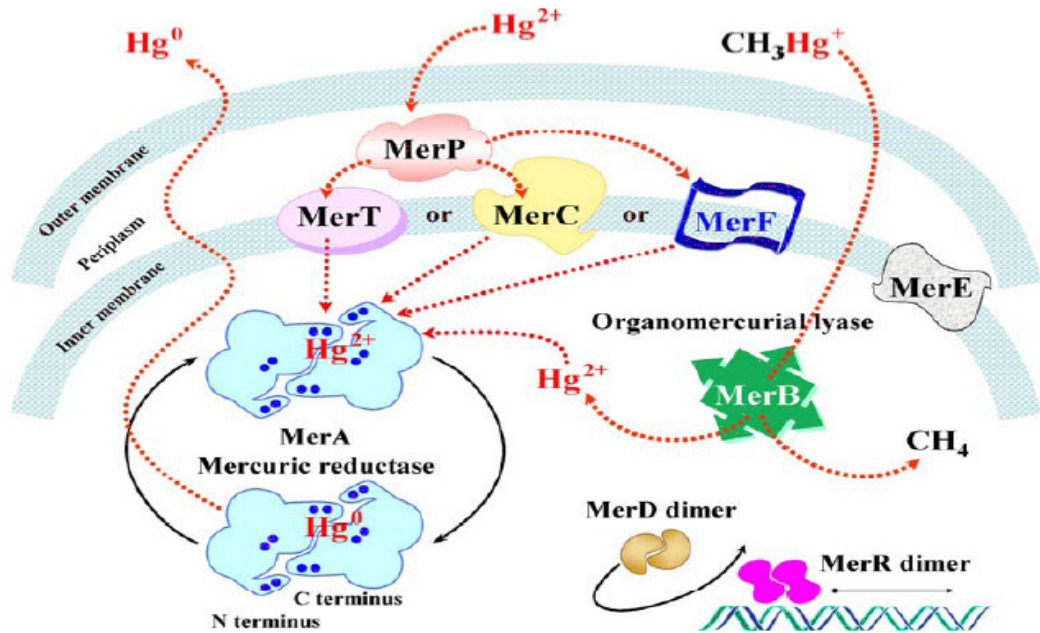
1.1.5.5. Metallerin Enzimatik Detoksifikasyonu

Bazı ağır metaller iz element olarak bulunmaktadır (çinko, bakır gibi). Bakterilerin büyümesi için gerekli olan bu metaller, yüksek konsantrasyonlar da toksik olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bakteriler, ağır metallere karşı enzimatik detoksifikasyon mekanizmasını geliştirmişlerdir [70].

Ağır metal direnç mekanizmaları, enzimlerle de bağlantılıdır. Ağır metal dirençliliği, civa, antimon, nikel, kadmiyum, arsenat, kobalt, çinko, kurşun, tellurit, bakır, krom ve gümüş gibi metallere karşı kazanılmıştır. Detoksifikasyon mekanizması, genellikle ağır metallerin enzimatik olarak indirgenmesidir. Bu direnç mekanizmasını kodlayan genler bazen plazmitler üzerindeyken bazen de

kromozomal DNA üzerinde olabilmektedir [71]. Bu mekanizma ile *E. coli*, arsenat, arsenik ve antimona karşı çoklu direnç gösterebilmektedir [71].

Gram negatif bakterilerde bulunan 2 *mer* operonu, toksik civa iyonlarına karşı direnç sağlamaktadır. *Mer* operon sistemindeki, *merA* genleri civa redüktaz enzimini, *merB* ise organomerküriyalliyaz enzimini kodlamaktadır. *merT* genleri hücre membranından civa 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^{2+} 'nin çökeltilerini toplayan bir görev yapmaktadır. *merT* sitoplazmayı benzer şekilde koruyabilmektedir. Bu genler operonun bir parçası gibi enzim kodlu genlerle ilişkili bir rol oynayabilmektedir. *Mer* sistemindeki genler kromozomal DNA üzerinde kodlu olabildiği gibi plazmit kodlu da olabilmektedir [48, 67].



Şekil 1.7. Bakterilerde civa iyonlarına karşı direnç sağlayan enzimatik detoksifikasyon sistemi [48]

Ars operonu, arsenat iyonlarına karşı direnç sağlayan *ArsC* enziminin üretiminden sorumludur. Arsenat redüktaz enzimi ise, çok toksik olan arsenit iyonlarını daha az toksik olan arsenata indirgemektedir [48]. *Ars* operonu, *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* ve *arsC* genlerinden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* bakterilerinin civa dirençliliği incelenmiştir. *E. coli* de civa dirençliliğini sağlayan *ars* operonunun kromozomal DNA üzerinde olduğu, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus aureus* bakterilerindeki *ars* operonunun ise pSX267, PI258 plazmitlerinin üzerinde olduğu görülmüştür [67].

Mikroorganizmalar bu direnç mekanizmalarından sadece birini kullanabildiği gibi birkaç mekanizmayı da birlikte kullanabilmektedir. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksisitesine bağlıdır. Örneğin; Cd(II)'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik kadmiyum formları oluşmaktadır. Bu nedenle, Cd(II) için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir [5].

Toksik metal iyonları için spesifik direnç sistemleri bakteriyel plazmitler üzerindeki genler tarafından kodlandığı tanımlanmıştır. Ag^+ , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Sb^{3+} , TeO_3^{2-} ve Zn^{2+} toksik metallerine karşı dirençlilik genleri plazmit üzerinde kodlandıkları rapor edilmiştir [72].

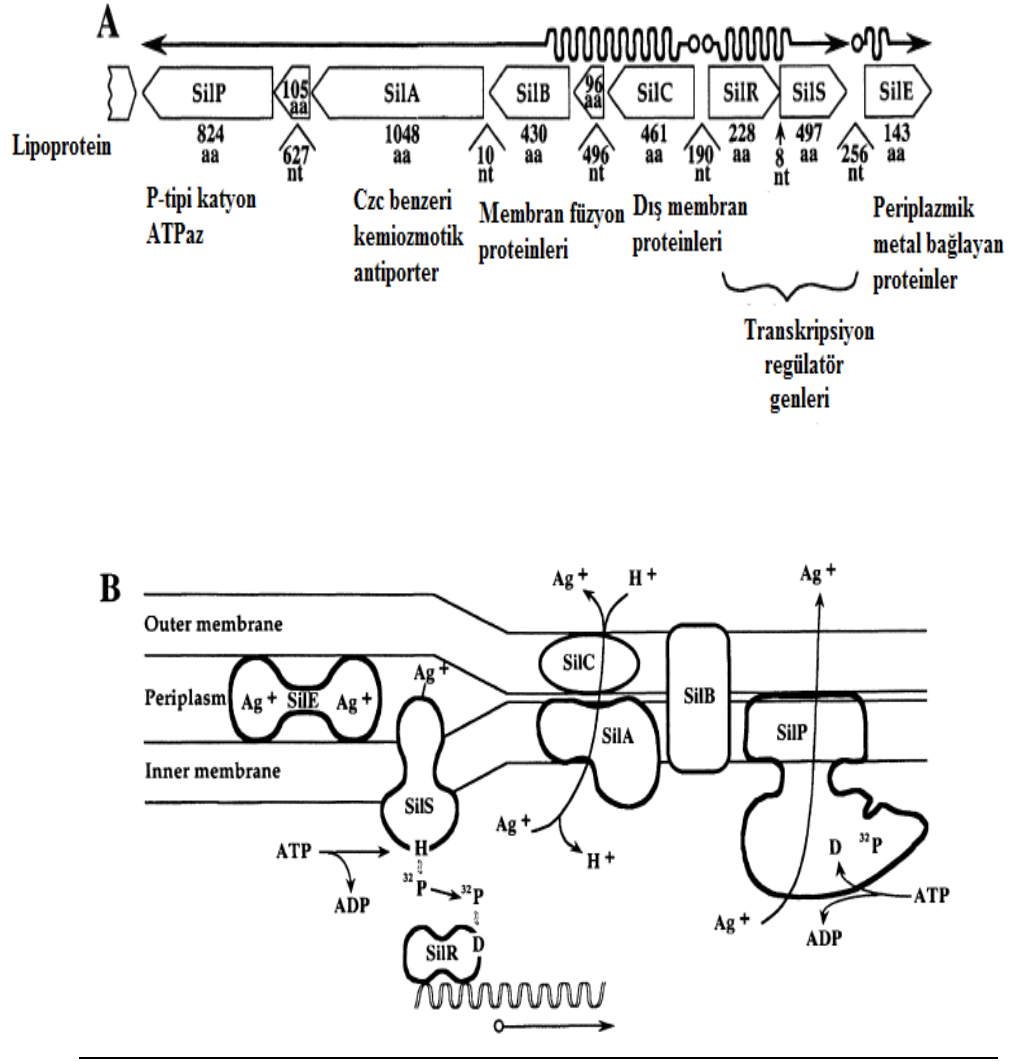
Plazmit kodlayan genler, doğal mikrobiyal toplulukların adaptasyonunda, yer değiştirebilen (hareketli) DNA'nın bir havuzunu temsil etmektedir. Plazmit aracılı adaptasyon örneğinde, kirli deniz ve tatlı su ekosistemlerinde mikrobiyal popülasyonlar kirlilik stresi periyotları boyunca katabolik plazmitlerinin sıklığı 2 – 10 kat arttığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, deniz sedimentlerinde, haliç ve pelajik ekosistemlerde bakteriyel plazmitlere rastlanıldığı da belirtilmiştir [73].

Toksik metallerin hücre dışına atılımı en çok bilinen direnç mekanizmasıdır. Bu mekanizma kromozomal DNA veya plazmit bağlantılı olabilmektedir. Gram pozitif bakterilerde kadmiyum ile bakır dirençliliği ve gram negatif bakterilerdeki arsenik dirençliliği ATPaz bağımlı atım mekanizması ile sağlanmaktadır ve bu mekanizmaların plazmit ile bağlantısı rapor edilmiştir. *Alcaligenes*'lerde, divalent kation atım sistemi ile gram pozitif ve gram negatiflerdeki arsenik atım sistemi ise kromozomal DNA bağlantılı olduğu belirtilmiştir [67].

Kromozomal ve plazmite dayalı temel metal dirençlilik sistemleri arasında bazı farklar vardır. Temel metal dirençlilik sistemleri genelde kromozomal DNA kökenlidir ve plazmit sistemlerinden daha komplekstir. Plazmitler, diğer organizmalara hızlı bir şekilde taşındıkları için ve gen üzerindeki taşıma yükünü azalttıkları için direnç genlerinin plazmitler üzerinde taşınmaları çok büyük bir olasılıktır. Bir bakteri, hücresel bileşenlerini metal toksisitesinden korumak için, metal direnç sistemini bir denemede geliştirebilmektedirler. Hücreye metal giriş sınırı veya hücresel bileşenlerin değişimi, hücrelerin metallere duyarlılığını azaltmaktadır. Bir mikroorganizmada direncin boyutunu birkaç faktör belirlemektedir. Bunlar; metal alımı için bazı mekanizmalar ve tipleri, her bir metalin normal metabolizmada oynadığı rol ve metal direncinin kontrolündeki plazmitler, kromozomlar veya transpozonlar üzerinde yerleşmiş genlerin durumudur [7].

Yapılan çalışmalarda çevresel ve klinik kaynaklardan gümüş iyonlarına dirençli suşlar izole edilmiştir. İzole edilen suşlar *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* ve *Salmonella typhimurium*'dur. Bu suşların gümüşe karşı dirençliliğinin plazmit aracılı olduğu gösterilmiştir [56].

Gümüş iyonları proteinlerdeki sülfidril gruplarına yüksek affinite ile bağlanarak veya metal atım mekanizması ile gümüş iyonları hücre dışına atılarak, bakterilerin gümüşe karşı dirençliliği sağlanmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, gümüş bulunan ortamda bakterilerdeki membran proteinlerinin ekspresyonu artarak direnç geliştirildiği de görülmüştür [18].



Şekil 1.8. Gümüş direnç genleri, transkripsiyon mekanizması ve protein üretimi [74]

Gümüş katyonları için bakterilerin geliştirmiş olduğu direnç mekanizmasında rol alan bazı proteinler ve bu proteinleri kodlayan genler vardır. Gümüş dirençliliğinde *silE* proteini 143 aminoasitten oluşmaktadır ve hücre membranındaki periplazmik boşlukta gümüş katyonlarını bağlama fonksiyonu vardır. *SilR* ve *silS*, yanıtlayıcı membran sensör proteinleridir. *SilB*, dış membran proteinleridir ve ortamda gümüş iyonları olduğunda membran geçirgenliğini azaltarak katyonların hücre içine girmesine engel olmaktadır. Bu genlerin başka metal dirençlilikleri için homologları vardır. Örneğin; *SilE* proteini; bakır dirençliliğini sağlayan *PcoE*

proteini ile homologdur, *silR* ve *silS* ise; kadmiyum, kobalt ve çinko dirençliliğini sağlayan *CzcR* ve *CzcS* proteinleri ile homologdur [74].

Mao ve arkadaşları [75], kirliliğin bulunduğu Pingdingshan bölgesinden izole ettikleri *Pseudomonas alcaligenes* suşunun Sr(II) iyonlarını absorblama yeteneklerini incelemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Sr(II) iyonları içeren solüsyonlar hazırlanmışlardır. *Pseudomonas alcaligenes* suşunun 4.0 ve 9.0 g/L arasında Sr(II) iyonlarını absorbladıklarını rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise aynı bölgeden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* suşunun Sr(II) iyonlarını absorbladığı bildirilmiştir. Sr(II) iyonlarının, *Pseudomonas fluorescens*'in hücre duvarındaki fonksiyonel gruplar olan –OH grupları, karboksil grupları ve –CH₃ gruplarına bağlandığını göstermişlerdir [19].

Raja ve Selvam [76], yağ fabrikası atık sularından izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa*'nın kadmiyum, krom, nikel ve kurşun metallerine karşı çoklu direnç profilini belirlemişlerdir. Transformasyon ve plazmit curing deneyleri sonucunda, nikel ve ampicillin direnç geninin plazmit DNA tarafından kodlandığı, kadmiyum direnç geninin, krom ve kurşun direnç genleri ile birlikte kromozomal DNA üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle *Pseudomonas aeruginosa*'nın plazmit aracılı nikel ve ampicillin antibiyotik direnç genlerinin diğer suşlara transfer edilerek metal dirençli popülasyonların gelişmesinde, ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve endüstriyel atık suların biyoremediasyonunda önemli bir izolat olduğu belirlenmiştir.

1.1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Kırıkkale il sınırları içerisinde geçen Kızılırmak'tan gümüş (Ag) ve stronsiyum (Sr) ağır metallerine dirençli suşların izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonudur. Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden su örnekleri alınarak, Ag ve Sr metallerine dirençli suşlar izole edilmiştir. Suşların her bir metal için MİK (Minimal inhibitör konsantrasyonu) değerleri belirlenmiş ve en yüksek MİK değerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere

seçilmiştir. Bu suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmıştır. Ag ve Sr dirençli her bir suş, antibiyotik ve diğer metallere dirençlilikleri bakımından da test edilmiştir. Böylece suşların antibiyotik ve çoklu metal dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Suşların metal direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla total protein, dış membran protein ve plazmit izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit varlığı gösterilen suşlarda plazmit eliminasyonu (curing) çalışmaları yapılarak antibiyotik, metal dirençliliği ve bunların plazmit ve kromozomal DNA ile ilişkilendirilmesi kurulmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Nutrient Agar

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

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

2.1.1.2. Nutrient Broth

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

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

2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Ag ve Sr dirençli suşların plazmit eliminasyon (curing) deneylerinde Çizelge 2.1’de gösterilen antibiyotik diskler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Konsantrasyon (µg/ml)
Gentamicin (G)	10
Rifampin (RA)	5
Erythromycin (E)	15
Penicilin (P)	10
Ampicillin (AM)	10
Chloramphenicol (C)	30
Tetracycline (TE)	30
Amoxycillin (AMC)	30
Cefoperazone/ Sulbactam (CES)	105
Oxacillin (OX)	1
Vancomycin (VA)	30
Bacitracin (B)	10

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1.1. Solüsyon I (Glukoz/Tris/EDTA)

0,990 gram glukoz, 0,394 gram Tris, 0,372 gram EDTA tartılarak 100 ml suyla (pH: 8) tamamlanır.

2.1.3.2.1.2. Solüsyon II (NaOH/SDS)

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

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

74 gram K-asetat tartılır ve 28,75 ml glasiyal asetik asit ile çözülür. Solüsyonun son hacimi 250 ml olacak şekilde steril su ile tamamlanır.

2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 gram Tris, 37,2 gram Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57,1 ml glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile tampon tamamlanır.

2.1.3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.3.2.2.1. Tris/EDTA Tamponu (250 ml)

0,3 gram Tris ve 0,008 gram EDTA tartılıp 250 ml steril suyla (pH: 8,0) tamamlanır.

2.1.3.2.2.2. %10 SDS Tamponu (100 ml)

10 gram SDS tartılarak 100 ml steril suda çözülmüştür.

2.1.3.2.2.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 ml)

0,0384 CaCl₂.2H₂O tartılarak, 5 ml gliserol ve 100 µl, 1 M Tris-HCl (pH: 8,0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 ml oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözültiden 10 ml alınarak 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

2.1.3.2.2.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 ml)

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

2.1.3.2.2.5. CTAB/NaCl Tamponu (100 ml)

4,1 gram NaCl tartılarak 90 ml steril suda çözülmüştür ve 10 gram CTAB yavaşça solüsyona eklenerek 65°C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 ml oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.2.2.6. Kloroform/ İzoamil Alkol Tamponu (100 ml)

96 ml kloroform, 4 ml izoamil alkol ile karıştırılmıştır.

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

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

2.1.3.2.2.8. İzopropanol Alkol (100 ml)

İzopropanol alkolden 100 ml alınarak plazmit izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.3.2.2.9. %70'lik ethanol (100 ml)

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

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

8,47 gram Tris-HCl tartılarak 50 ml steril suda çözülmüştür ve pH: 8,0'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml oluncaya kadar steril su ile tamamlanmıştır.

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

0,12 gram Tris-HCl tartılarak 100 ml steril suda çözülmüştür.

2.1.3.2.3. Total Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.3.1. Fosfat Tamponu: (KH_2PO_4 , K_2HPO_4)

6,8 gram KH_2PO_4 ve 8,7 gram K_2HPO_4 tartılıp 1000'er ml distile suda çözülür. Hazırlanan iki ayrı çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH: 7,0'ye ayarlanır.

2.1.3.2.4. Dış Membran Protein İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

0,1576 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve HCl ile pH: 8,0'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

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

1,75 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür ve 1,67 ml Triton X-100 eklenerek HCl ile pH: 7,6'ya ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2.1.3.2.5. Lipopolisakkarit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.5.1. PBS solüsyonu

8,47 g NaCl, 0,3 g NaH₂PO₄ ve 1,065 g Na₂HPO₄ tartılır ve 1000 ml distile suyla çözülür.

2.1.3.2.6. SDS PAGE Stok Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.2. SDS PAGE stok solüsyonları hazırlanışı

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24,2 gram Tris tartılır, 50 ml distile suda çözülür, derişik HCl ile pH: 8,8'e ayarlanıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Tris-HCl, 1 M	12,1 gram Tris tartılır, 50 ml distile suda çözülür, konsantre HCl ile pH: 6,8'e ayarlanıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
SDS (%10)	10 gram SDS tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Gliserol (%50)	50 ml %100'lük gliserol alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 ml distile su içinde çözülür.

2.1.3.2.7. SDS-PAGE Çalışma Solüsyonları ve Hazırlanışı

Çizelge 2.3. SDS PAGE çalışma solüsyonları

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid (100ml)	29,2 gram akrilamid ve 0,8 gram bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100ml)	2 M Tris-HCl (pH = 8,8) 75 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 21 ml. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100ml)	1 M Tris-HCl (pH = 6,8) 50 ml, %10'luk SDS 4 ml, distile su 46 ml. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat %10'luk (5 ml)	0,5 gram amonyum persülfat tartılıp distile su ile 5 ml'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 µM) 3 gram, glisin (192 mM) 14,4 gram, SDS (% 0,1) 1 gram tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH =8,3
ÖrnekTamponu (5x) (10ml)	1 M Tris-HCL (pH = 6,8) 0,6 ml, %50 Gliserol 5 ml, %10 SDS 2 ml; 0,5 ml 2-merkaptolanol, %1 Bromfenol mavisi 1 ml; 0,9 ml distile su. Buzdolabında saklanır.

2.1.3.2.7.1. Ayırıcı Jelin Bileşimi (% 12'lik)

Çizelge 2.4. Ayırıcı jelin hazırlanması

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

2.1.3.2.7.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi (%4'lük)

Çizelge 2.5. Dengeleyici jelin hazırlanması

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

2.1.3.2.8. Commassie Brillant Blue Solüsyonunun Hazırlanması

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri, 410 30' Kuzey, 360 05' Doğu koordinatları arasındadır ve 1150 km'den uzun su yatağı, 75.000 km² drenaj alanı ve yıllık ortalama 184,2 m³/s debisi ile Türkiye'nin en uzun nehri olup Kızılırmak Deltası'nı geçerek Karadeniz'e ulaşmaktadır [77].



Şekil 2.1. Kızılırmak'ın Lokasyonu

Kırıkkale ulaşım bakımından Türkiye'nin doğuya açılan kapısı olma, Makine Kimya Endüstrisi ile Tüpraş Rafinerisi gibi büyük sanayi kuruluşlarını bünyesinde barındırma ve Kızılırmak gibi Türkiye'nin en büyük nehirlerinden birinin güzergahında yer almasından dolayı oldukça önemli illerden biridir. Kırıkkale ili'nde sanayi oldukça gelişmiş bir durumdadır. Hemen hemen bütün sanayi kuruluşları Kızılırmak Nehri'nin çevresinde bulunmaktadır [78].

Çizelge 2.6. Örneklerin alındığı bölgeler ve koordinatları

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

Ag ve Sr ağır metallerine dirençli suşların seçimi için ağır metal içeren ortam kullanılmıştır. 12 bölgeden alınan su örneklerinden Ag ve Sr dirençli suşları seçmek için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı AgNO_3 ve SrCl_2 ağır metalleri içeren nutrient agar (NA) ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlara her bölgeden alınan su örnekleri seyreltme yapılarak ekilmiştir. 37°C 'de 48 saat inkübe edilen örneklerden üreme olan Ag ve Sr dirençli farklı koloniler seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır.

2.2.4. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması

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

2.2.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Ag ve Sr ağır metallerine dirençli suşların MİK değerleri, nutrient agar ortamına giderek artan konsantrasyonlarda AgNO_3 ve SrCl_2 eklenerek saptanmıştır. 37°C 'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan petriyelerdeki kültürler daha yüksek konsantrasyondaki ayrı ayrı Ag ve Sr metalleri bulunan ortamlara ekilmiştir. 48 saat

süre sonunda üreme görülmeyen suşların son ağır metal konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır.

2.2.6. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

Kırıkkale-Kızılırmak'tan Ag ve Sr dirençli suşlar izole edilmiştir. Bu suşların MİK değerleri belirlenmiştir ve en yüksek MİK değerine sahip dirençli suşlar seçilmiştir. Seçilen suşların morfolojik özellikleri belirlenmiş ve API 20 NE kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapılmıştır. Bu sonuçlara göre suşlar identifiye edilmiştir [79, 80].

2.2.7. İzole Edilen Bakterilerin Çoklu Metal ve Antibiyotik Dirençliliği

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

Ag dirençli suşların, literatürde belirtilen konsantrasyonda Cd, Al, Li, Ba, Cr, Mn, Pb, Co, Fe, Cu, Sn, Ni, Zn, Hg, Sb, Sr ağır metallerine dirençlilikleri tespit edilmiştir. Nutrient agarlı ortama belirlenen konsantrasyonlarda ayrı ayrı ağır metaller eklenmiştir ve izole edilen Ag dirençli suşların ekimi yapılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve üreme olan suşların ortama eklenen metale karşı dirençli, üreme olmayanların ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sr dirençli suşlarda ise Ag dirençli suşlarda kullanılan metod uygulanmıştır.

2.2.8. Bakteri Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

MİK değerleri belirlenen Ag ve Sr metallerinin bulunduğu NB ortamında, kültürlerden 100 µl örnek alınarak, 100 ml NB içinde inoküle edilmiştir. Bu işlem belirlenen konsantrasyonlarda Ag ve Sr metallerinin bulunduğu NB ortamları için

de tekrarlanmıştır. Kùltürler 37°C'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir ve 0. saatten itibaren, OD 600 nm'de, her 2 saatte bir spektrofotometre ile ölçüm değerleri alınarak üreme eğrisi çıkarılmıştır.

2.2.9. Plazmit İzolasyonu

Saflaştırılmış izolatlardaki plazmitlerin varlığı alkali lizat metodunun modifiye hali kullanılarak saptanmıştır [81]. Plazmit izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO₃ ve SrCl₂ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilen kùltürlerden 1.5 ml alınarak 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır ve tekrar 1,5 ml kùltür konularak işlem tekrarlanmıştır. Pelletlerin üzerine 100 µl GTE (glukoz/ tris/ EDTA) ilave edilmiştir ve vortekslenerek 5 dakika buzda bekletilmiştir. 200 µl, 0,2 N NaOH/ %1 SDS solüsyonun üzerine ilave edilerek çok yavaş karıştırılmıştır ve 5 dakika bekletilmiştir. 150 µl, 3M potasyum asetat ilave edilmiştir ve karıştırılarak 5 dakika bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen solüsyonun üst kısmı toplama tüpüne alınarak pellet kısmı atılmıştır. %100'lük etanolden 900 µl tüplere konulmuş ve -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Gece sonunda beklemiş olan solüsyon 13.100 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine %70'lik etanolden 1 ml eklenerek 15 dakika 13.100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz atılmıştır ve pellet üzerine 20 µl su ve 5 µl boya ilave edilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.2.10. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzole edilen Ag ve Sr dirençli bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn [82] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. 15 ml'lik kùltür 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 5,7 ml TE tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Daha sonra 30 µL %10 SDS, 30 µL proteinaz K ve RNAaz eklenerek 60 dakika 37°C inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra 100 µL 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 800 µL CTAB/NaCl tamponu karışım üzerine eklenmiş ve 10 dakika 65°C’de tekrar inkübe edilmiştir. Kloroform/ izoamil alkol solüsyonu ekleyerek 5 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere alınarak fenol/ kloroform/ izoamil alkol tamponu eklenmiş ve tekrar 5 dakika 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılıp 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5 ml %70’lik etanol eklenmiş ve 10 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmıştır ve pellet kurutularak 200 µL TE tamponu eklenmiştir ve -20°C’de saklanmıştır.

2.2.11. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması

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

2.2.12. DNA’nın Etidyum Bromid ile Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlanınca jel elektroforez aparatından alınıp boyama kabına konulmuştur ve jel üzerine 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromid boyama solüsyonu eklenerek 45 dakika boyanmıştır. Boyanın fazlası jeli 1 mM MgSO₄ solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınmıştır. Jel daha sonra U.V. transillüminatör üzerine konularak fotoğrafları çekilmiştir [83].

2.12.13. Plazmit DNA Moleküler Ağırlık Belirlenmesi

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

2.2.14. Plazmit Eliminasyonu (Plazmit Curing)

İzole edilen Ag dirençli ve Sr dirençli bakterilerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmit varlığı belirlenen suşların yüksek sıcaklık kullanılarak plazmit eliminasyon (curing) çalışmaları yapılmıştır [84].

2.2.15. Total Protein İzolasyonu

Ag ve Sr metallerine dirençli suşların total proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşları [85] tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO₃ ve SrCl₂ metallerinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kültürlerden besiyerlerini uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletlerin üzerine 5 ml steril su eklenerek 2 kez yıka işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelletler üzerine 2 ml fosfat tamponu eklenmiştir ve 10 dakika 50 devir de sonikasyon işlemi uygulanmıştır. 2000 rpm de 2 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant temiz tüplere transfer edilmiştir. 75µl örnek üzerine 75µl örnek tamponu ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi öncesinde örnekler 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır.

2.2.16. Dış Membran Protein İzolasyonu

Dış membran proteinleri Achtman ve arkadaşları [86] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Dış membran proteinleri izole edilecek bakterilerin, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerine ve 100 ml'lik belirlenen konsantrasyonlarda AgNO₃ ve SrCl₂ metallерinin bulunduğu NB besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Kùltürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. 10 ml, 10 mM Tris-HCl pelletler üzerine eklenerek sonikasyon (80 sn, %50 devir) işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 3000 rpm'de, 20 dakika, 4°C'de santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır. Süpernatant temiz tüplere alınarak 20.000 rpm, 60 dakika, 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 150 µl steril su eklenerek -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. -20°C'den alınan örneklere 200 µl Triton-X içeren solüsyon eklenmiştir ve 20°C de bekletilmiştir. Örnekler 20°C'de, 90 dakika, 2000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Pelletler üzerine 50 µl örnek tamponu eklenmiştir ve elektroforezden önce 100°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

2.2.17. Dış Membran ve Total Protein Bandları Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

Dış membran ve total protein bandlarının moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla Protein Weight Marker MW-SDS-70 referans alınarak, her bir jel için ayrı ayrı standart eğri çizilmiştir. Jel üzerindeki marker bandlarının yürüdüğü mesafe ve bandların bilinen molekül ağırlık değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Bu metod ile bilinmeyen protein bandlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

2.2.18. Bakterilerin Lipopolisakkarit Analizi

İzole edilen Ag ve Sr dirençli bakterilerden LPS izolasyonu Achtman ve arkadaşları [86] tarafından tanımlanan metoda göre elde edilmiştir. Ag ve Sr dirençli bakterilerden LPS izole edilmesi için, 100 ml'lik metal içermeyen NB besiyerlerine

ve ayrı ayrı 8 mg/L AgNO₃ ve 2000 mg/L SrCl₂ bulunan 100 ml'lik NB besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kùltürler log fazının ortalarında alınarak santrifüj edilmiştir ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pelletler üzerine 1 ml fosfat tamponu eklenerek, 60°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler santrifüj yapılmıştır ve süpernatant temiz tüplere alınmıştır. 50 µL örnek üzerine 50 µL örnek tamponu eklenmiştir ve 100°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Alınan örneklere 40 µL proteinaz K ilave edilerek 60°C'de 60 dakika bekletilmiştir ve elektroforez yapılması için örnekler hazır duruma getirilmiştir.

2.2.19. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

Dış membran, total protein ve LPS analizleri Laemmli'ye [87] göre, %4'lük dengeleyici ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır.

2.2.19.1. Ayırma Jelinin Hazırlanışı

16,7 ml Akrlamid/Bis Akrlamid (%30'lük), 19,8 ml distile su, 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,6), 500 ml %10'lük APS (amonyum persulfat), 500 ml %10'lük SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 ml TEMED (N, N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

2.2.19.2. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı

3,4 ml %30'lük Akrlamid/Bis Akrlamid, 13,6 ml distile su, 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 200 ml %10'lük APS ve 200 ml %10'lük SDS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 ml TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım, polimerize olan

ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

2.2.19.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

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

2.2.19.4. SDS-PAGE Jellerinin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitleme çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama 1 gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [88]. Jellerin fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

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

Kırıkkale-Kızılırmak üzerinde belirlenen 12 bölgeden alınan su örneklerinden gümüş ve stronsiyuma dirençli suşlar izole edilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi gümüşe dirençli 5 suş ve stronsiyuma dirençli 7 suş izole edilerek, MİK değerleri saptanmıştır. En yüksek MİK değeri AgNO_3 için 8 mg/L, SrCl_2 için ise 2000 mg/L olarak belirlenmiştir. 8 mg/L gümüş konsantrasyonunda 10. ve 11. bölgelerden izole edilen iki suşun direnç gösterdiği belirlenmiş ve bu suşlara sırasıyla Ag10 ve Ag11 kodu verilmiştir. Stronsiyuma ise 2000 mg/L konsantrasyonunda 2. ve 11. bölgelerden izole edilen iki suşun direnç gösterdiği tespit edilmiş ve bu suşlara da sırasıyla Sr02 ve Sr11 kodu verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların bölgelere göre yayılımı

Örnek Alınan Bölgeler ve Bakteri Üreme Durumları												
Ağır metaller	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AgNO_3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
SrCl_2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+

(-) : üreme yok, (+) : üreme var

3.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi gümüş dirençli Ag10 ve Ag11 kodlu suşlar ile stronsiyum dirençli Sr02 ve Sr11 kodlu suşların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek teşhis edilmiştir.

Çizelge 3.2. Gümüş ve stronsiyum dirençli suşlarının biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Özellikler	Gümüş Dirençli Suşlar		Stronsiyum Dirençli Suşlar	
	Ag10	Ag11	Sr02	Sr11
Şekil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram Reaksiyon	(-)	(-)	(-)	(-)
Akışkanlık	Akışkan	Mukoid	Yapışkan	Yapışkan
Optik Özellikler	Saydam	Opak	Opak	Opak
Pigment	Yok	Beyaz	Sarı	Yeşilimsi sarı
DP300 (DP3)	+	-	-	+
Üre (URE)	-	-	-	-
Malonat(MLT)	-	+	+	-
İnositol (INO)	-	+	-	-
Arabinoz(ARA)	-	+	-	-
Glukoz (OFG)	+	+	+	+
Sitrat (CIT)	+	+	-	-
Mannitol(MAN)	-	+	+	-
Adonitol (ADO)	-	+	-	-
Glukoz (GLU)	-	+	-	-
Malonat(MAL)	-	+	-	-
Ksiloz(XYL)	+	+	+	+
Arjinin (ARG)	+	-	-	+
Asetamin(ACE)	-	-	-	-
TDA (TDA)	-	-	-	-
Rafinoz (RAF)	-	+	-	-
Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	-	-	-	-
Lizin Dekarboksilaz (LYS)	-	+	-	-
Eskülin (ESC)	-	+	-	-
Polimiksin B (PXB)	+	-	-	-
Sorbitol (SOR)	-	+	-	-
ONPG (ONP)	-	+	-	-
Ornitin(ORN)	-	-	-	-
Plant indican (PLI)	-	+	+	-
Laktoz %10 (LAC)	-	+	+	-
Sükroz (SUC)	-	+	+	-
Ramnoz(RHA)	-	+	-	-
Oksidaz (OXI)	+	-	-	+
Tanımlanan Türler	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

(-); negatif, (+); pozitif

Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların biyokimyasal testleri esas alınarak tanımlama yapılmıştır. Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi gümüş dirençli Ag10 ile Ag11 kodlu suşlar sırasıyla *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmışlardır. Stronsiyum dirençli Sr02 ile Sr11 kodlu suşlar ise *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır.

3.3. İzole Edilen Bakterilerin Metal ve Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

İzole edilen gümüş dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları ile stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens* suşlarının metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Bu suşların dirençlilik sonuçları Çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Gümüş dirençli ve stronsiyum dirençli suşların metal dirençlilik ve antibiyotik dirençlilik profilleri

	Suş Adı	Metal Dirençlilik Profili	Antibiyotik Dirençlilik Profili
Gümüş Dirençli Suşlar	<i>Pseudomonas putida</i>	Ag, Al, Li, Sn, Ni, Sr	ATM, PEF, TIC, CA
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ag, Al, Li, Ba, Mn, Pb, Fe, Cu, Sn, Ni, Sr	ATM, IPM, PEF, PRL, TZP, TIC, CA
Stronsiyum Dirençli Suşlar	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Al, Li, Ba, Mn, Pb, Ag, Cu, Sn, Ni, Sr	ATM, CN, PEF, TOB
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Al, Li, Ba, Fe, Ni, Sr	ATM, CN, PEF, PRL, TOB, SXT

Al: Alüminyum, Ba: Baryum, Cu: Bakır, Fe: Demir, Li: Lityum Mn: Mangan, Ni: Nikel, Sn: Kalay, Pb: Kurşun, Sr: Stronsiyum; ATM: Aztreonam, PEF: Pefloxacin, CA: Ticarcillin/CA, IPM: Imipenem, PRL: Piperacillin, TZP: Piperacillin/Tazobactam, TIC: Ticarcillin

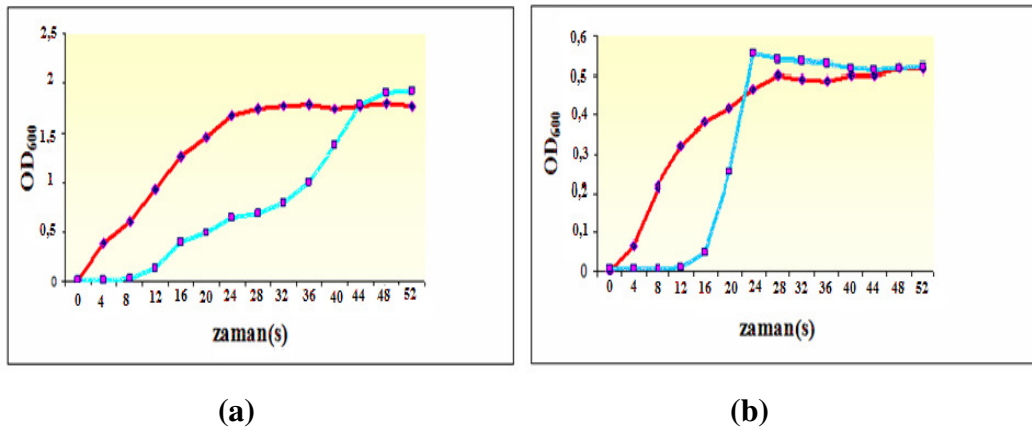
Gümüş dirençli suşların çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerine bakıldığında, *Klebsiella pneumoniae* suşunun *Pseudomonas putida*’ya göre daha fazla ağır metale ve antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.3’de

belirtildiği gibi *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine ve ATM, PEF, TIC, CA antibiyotiklerine ortak direnç gösterdikleri de saptanmıştır. Stronsiyum dirençli suşların çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerine bakıldığında *Sphingomonas paucimobilis*'in daha fazla metale direnç gösterdiği, *Pseudomonas fluorescens*'in ise daha fazla antibiyotik dirençliliği gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 3.3'de belirtildiği gibi *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının Al, Li, Ba, Ni metallerine ve ATM, CN, PEF, TOB antibiyotiklerine ortak direnç gösterdikleri saptanmıştır.

3.4. Bakteri Büyüme Eğrileri

3.4.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin Büyüme Eğrileri

İzole edilen suşlardan gümüş dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının büyüme eğrileri Şekil 3.1'de verilmiştir. Her iki suşun da gümüş içermeyen ortamda log fazına erken geçtiği ve gümüş içeren ortamda ise 12 saatlik bir gecikme fazı gösterdiği belirlenmiştir.

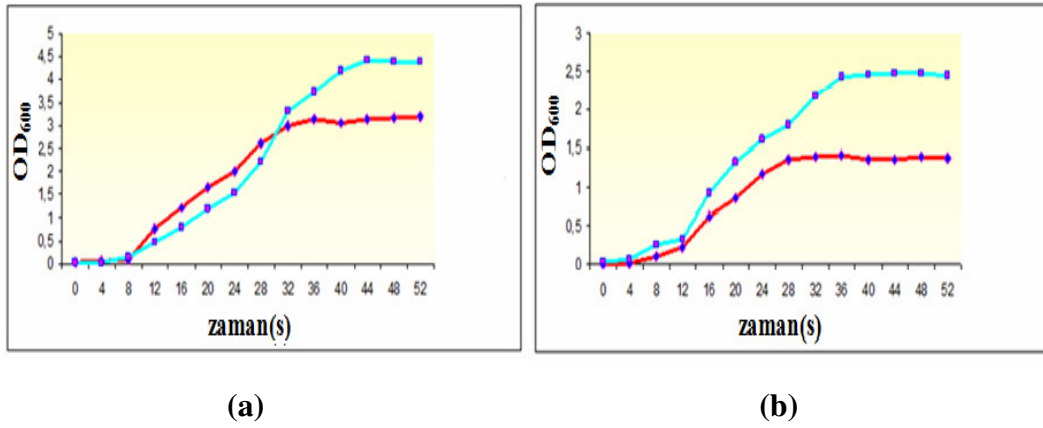




Şekil 3.1. *Pseudomonas putida* (a) ve *Klebsiella pneumoniae* (b) suşlarının

—◆— ; gümüş içermeyen ortamdaki ve —■— ; gümüş içeren ortamdaki büyüme eğrileri

3.4.2. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Büyüme Eğrileri

İzole edilen suşlardan stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının büyüme eğrileri Şekil 3.2’de verilmiştir. Bu suşların stronsiyum içeren ve içermeyen ortamda gecikme fazının olduğu belirlenmiştir. Stronsiyum içeren ortamdaki suşların logaritmik üreme fazının daha uzun olduğu gözlemlenmiştir.



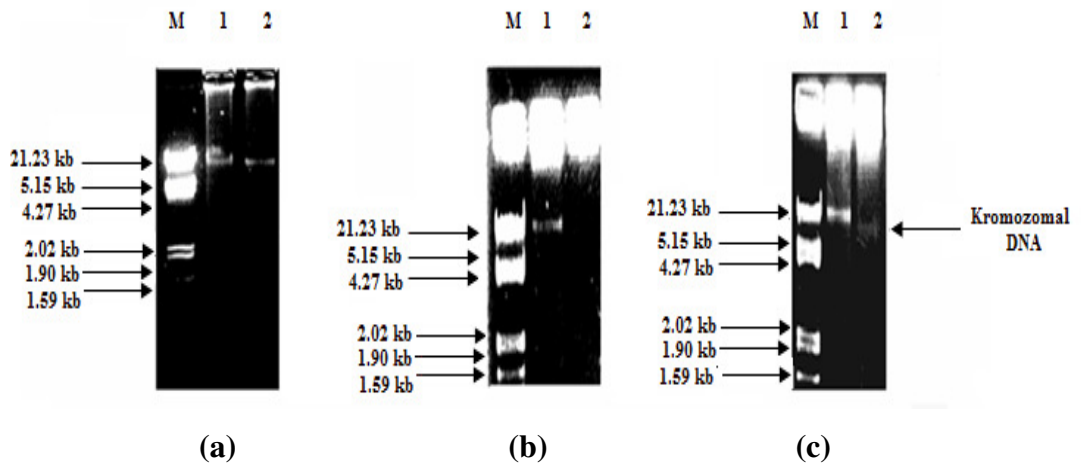
Şekil 3.2. *Sphingomonas paucimobilis* (a) ve *Pseudomonas fluorescens* (b) suşlarının  ; stronsiyum içermeyen ortam ve  ; stronsiyum içeren ortamdaki büyüme eğrileri

3.5. Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri

Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların metal dirençliliği ile plazmit profilleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla metal içeren ve içermeyen ortamlarda üretilen bakterilerden plazmit izolasyonu ve eliminasyonu çalışmaları yapılmıştır.

3.5.1. Gümüş Dirençli Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri

Gümüş dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının plazmit DNA ve kromozomal DNA profilleri çıkarılmıştır. Şekil 3.7’de her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlığı bilinmeyen plazmit DNA’ların moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Şekil 3.3 a’da gösterildiği gibi, *Pseudomonas putida* da gümüş içeren ve içermeyen ortamda 21 kb boyutunda plazmitler tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyonu yapılarak metal ve antibiyotik dirençliliğinin plazmit DNA ile ilişkisi araştırılmıştır. Plazmit eliminasyonu sonrasında *Pseudomonas putida*’nın gümüş içeren ortamda üreyemediği, rifampin, penicilin, oxacillin, vancomycin ve basitracin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği belirlenmiştir. Şekil 3.3 c’de *Pseudomonas putida* suşunun kromozomal DNA lokasyonu gösterilmiştir.



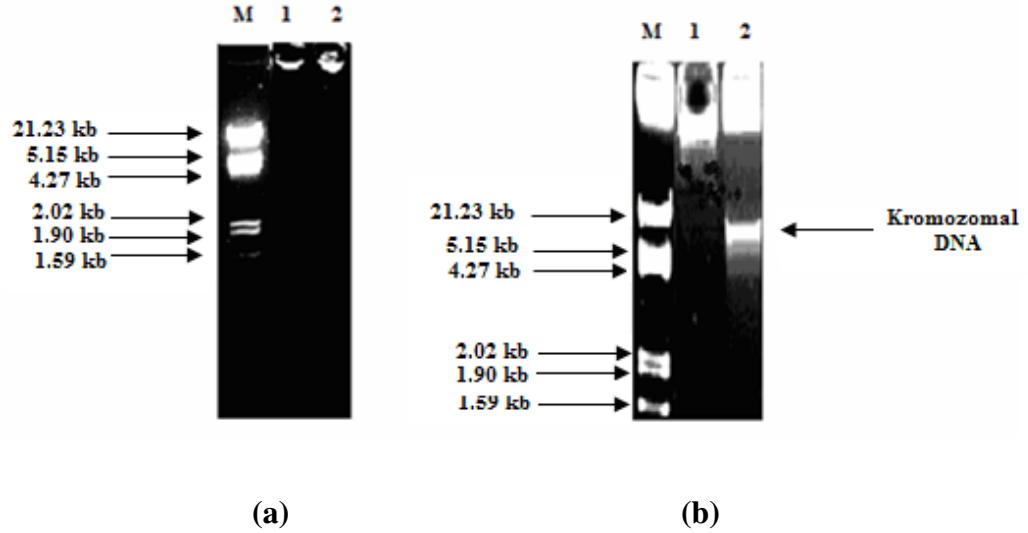
Şekil 3.3. *Pseudomonas putida* suşunun plazmit DNA profili (a), plazmit eliminasyonu (b) ve kromozomal DNA lokasyonu (c)

(a) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA (gümüş içermeyen ortam), 2; plazmit DNA (gümüş içeren ortam)

(b) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; plazmit eliminasyonu

(c) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; kromozomal DNA

Gümüş dirençli diğer bir suş olan *Klebsiella pneumoniae*'nin plazmit profil analizi ve kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 3.4 a'da belirtildiği gibi *Klebsiella pneumoniae*'de gümüş içeren ve içermeyen ortamda plazmit tespit edilememiştir. Şekil 3.4 b'de *Klebsiella pneumoniae*'nin kromozomal DNA lokasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *Klebsiella pneumoniae* suşunun plazmit (a) ve kromozomal DNA (b) lokasyonu

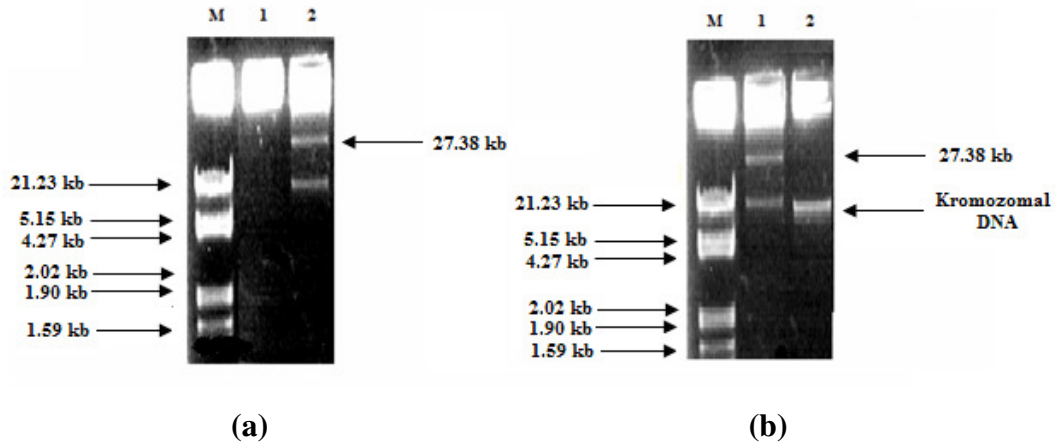
(a) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA (gümüş içermeyen ortam), 2; plazmit DNA (gümüş içeren ortam)
(b) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; kromozomal DNA

3.5.2. Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Plazmit ve Kromozomal DNA Analizleri

Stronsiyuma dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının plazmit DNA ve kromozomal DNA profilleri çıkarılmıştır. Şekil 3.7'de her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen plazmit DNA'ların moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Şekil 3.5 a'da gösterildiği gibi *Sphingomonas paucimobilis* stronsiyum içeren ortamda 21 ve 27 kb

boyutlarında iki plazmit bulundurmasına rağmen stronsiyum içermeyen ortamda ise herhangi bir plazmit varlığı gösterilememiştir.

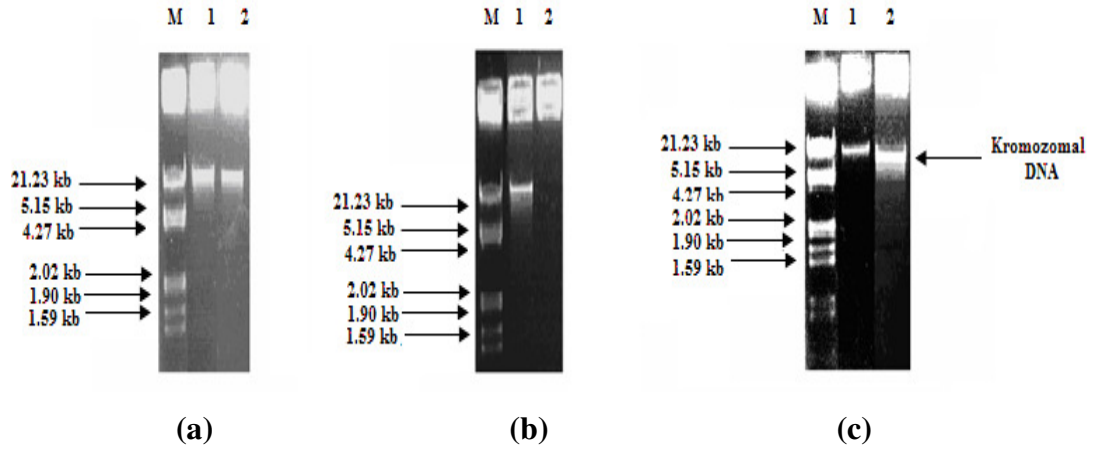
Plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda, *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamda ürediği ve antibiyotik dirençlilik profilinde ise herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Şekil 3.5 b'de *Sphingomonas paucimobilis* suşunun kromozomal DNA lokasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.5. *Sphingomonas paucimobilis* suşunun plazmit (a) ve kromozomal DNA (b) lokasyonu

(a) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA (stronsiyum içermeyen ortam) izolasyonu, 2; plazmit DNA (stronsiyum içeren ortam)
(b) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; kromozomal DNA

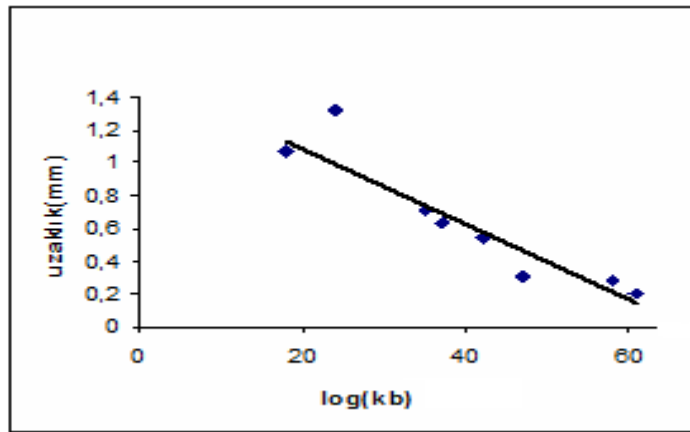
Şekil 3.6 a'da gösterildiği gibi stronsiyum dirençli diğer bir suş olan *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum içeren ve içermeyen her iki ortamda da 21 kb boyutunda plazmit tespit edilmiştir. Şekil 3.6 b'de, plazmit eliminasyonu öncesi ve sonrası plazmit DNA profilleri gösterilmiştir. Plazmit eliminasyonundan sonra *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyumlu ortamda ürediği, gentamicin, rifampin, erythromycin, penicilin, ampicillin, chloramphenicol, amoxycillin, cefoperazome/sulbactam, oxacillin, vancomycin ve bacitracin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği de tespit edilmiştir. Şekil 3.6 c'de *Pseudomonas fluorescens* suşunun kromozomal DNA lokasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.6. *Pseudomonas fluorescens* suşunun plazmit DNA profili (a), plazmit eliminasyonu (b) ve kromozomal DNA (c) lokasyonu

- (a) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA (stronsiyum içeren ortam), 2; plazmit DNA (stronsiyumlu ortam)
 (b) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; plazmit eliminasyonu
 (c) M; Marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII), 1; plazmit DNA, 2; kromozomal DNA

Şekil 3.7’de örneği gösterildiği gibi Lambda DNA/EcoRI+HindIII markera göre her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğriden plazmit DNA’ların molekül ağırlıkları belirlenmiştir.



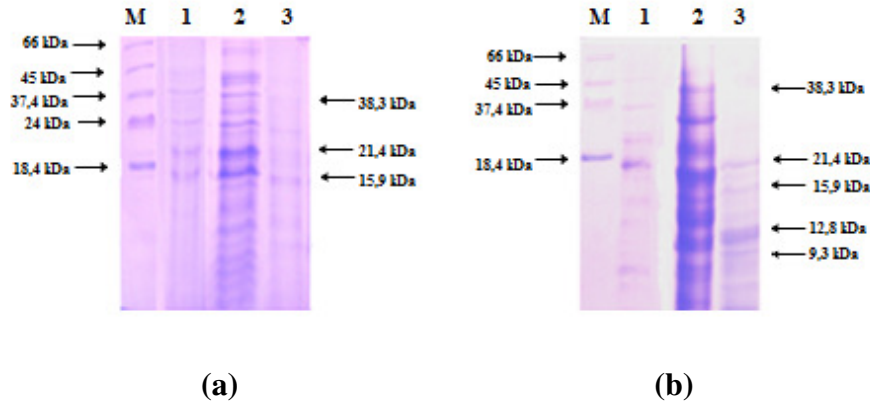
Şekil 3.7. Plazmit DNA moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.6. Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Analizi

Gümüş ve stronsiyum dirençli suşların metal içeren ve içermeyen ortamlardaki dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir.

3.6.1 Gümüş Dirençli Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Analizi

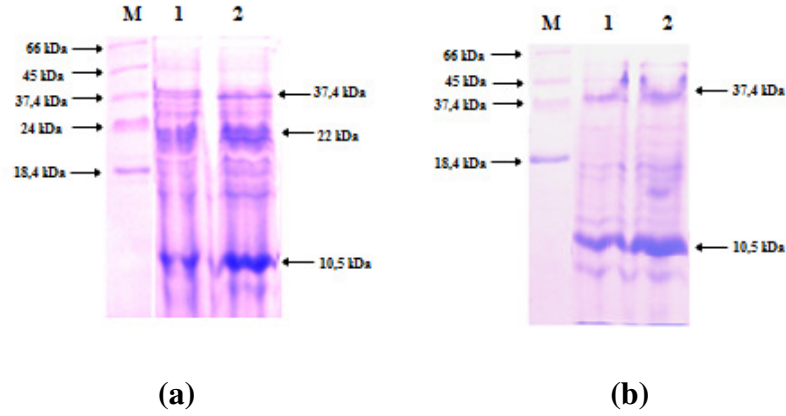
Gümüş dirençli *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının dış membran ve total protein profilleri çıkarılmıştır. Şekil 3.12’de bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bandlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. *Pseudomonas putida* suşunun dış membran ve total protein profilleri Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Gümüş içeren ortamda 38,3, 21,4, 15,9 kDa boyutlarındaki dış membran proteinlerinin ve 38,3, 21,4, 15,9, 12,8, 9,3 kDa boyutlarındaki total proteinlerin ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Plazmit eliminasyon sonrasında söz konusu bu dış membran ve total proteinlerin ekspresyonlarında azalma olduğu da görülmüştür.



Şekil 3.8. *Pseudomonas putida*'nın dış membran (a) ve total protein (b) profilleri

- (a) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Pseudomonas putida*'nın gümüş içermeyen ortamdaki dış membran protein profili, 2; *Pseudomonas putida*'nın gümüş içeren ortamdaki dış membran protein profili, 3; *Pseudomonas putida*'nın plazmit eliminasyonundan sonraki dış membran protein profili
- (b) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Pseudomonas putida*'nın gümüş içermeyen ortamdaki total protein profili, 2; *Pseudomonas putida*'nın gümüş içeren ortamdaki total protein profili, 3; *Pseudomonas putida*'nın plazmit eliminasyonundan sonraki total protein profili

Klebsiella pneumoniae'nin dış membran ve total protein analizleri Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Bu suşun dış membran protein profilleri incelendiğinde 37,4, 22 ve 10,5 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Gümüş içeren ortamda yapılan total protein analizinde ise 37,4 ve 10,5 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunun artışı belirlenmiştir.



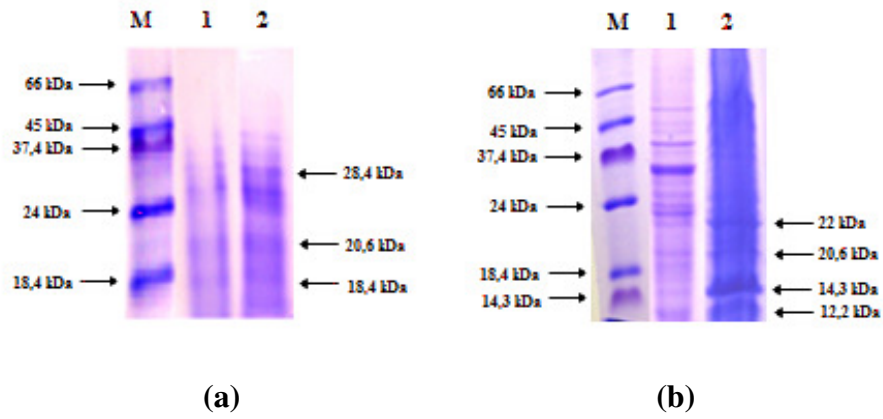
Şekil 3.9. *Klebsiella pneumoniae*'nin dış membran (a) ve total protein (b) profilleri

(a) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içermeyen ortamdaki dış membran protein profili, 2; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içeren ortamdaki dış membran protein profili
(b) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içermeyen ortamdaki total protein profili, 2; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içeren ortamdaki total protein profili

3.6.2 Stronsiyum Dirençli Bakterilerin Dış Membran ve Total Protein Analizi

Stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir. Şekil 3.12'de bir örneği gösterildiği gibi her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğri ile moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bantlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir.

Sphingomonas paucimobilis suşunun dış membran ve total protein profilleri Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Stronsiyum içeren ortamda 28,4, 20,6 ve 10,5 kDa boyutlarındaki dış membran proteinlerinin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Stronsiyum içeren ortamda total protein analizinde ise 22, 20,6, ve 14,3 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir.

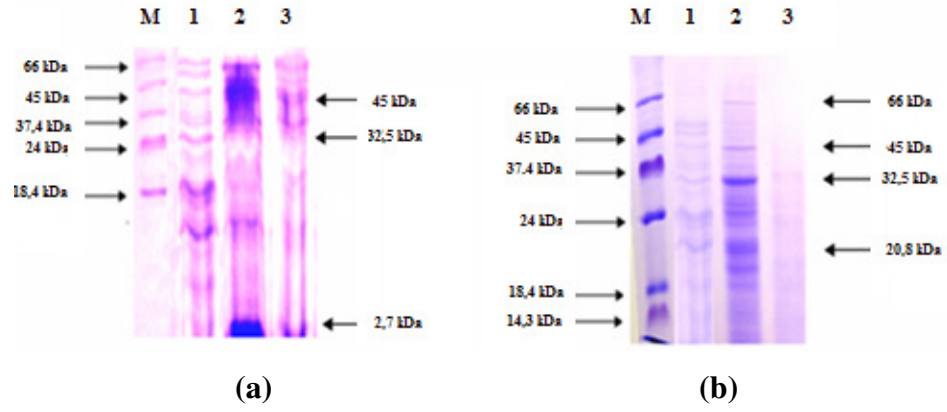


Şekil 3.10. *Sphingomonas paucimobilis*'in dış membran (a) ve total protein (b) profilleri

(a) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki dış membran protein profili, 2; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamdaki dış membran protein profili

(b) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki total protein profili, 2; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamdaki total protein profili

Diğer bir stronsiyum dirençli suş olan *Pseudomonas fluorescens* suşunun dış membran ve total protein analizleri Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Bu suşun dış membran protein profilleri incelendiğinde 45, 32,5, 14,1 ve 2,7 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Stronsiyum içeren ortamda yapılan total protein analizinde ise 66, 45, 32,5 ve 20,8 kDa boyutlarındaki proteinlerin stronsiyum içeren ortamda ekspresyonunda artma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca plazmit eliminasyonu sonrasında söz konusu bu dış membran ve total proteinlerin ekspresyonunda ciddi azalmanın olduğu belirlenmiştir.

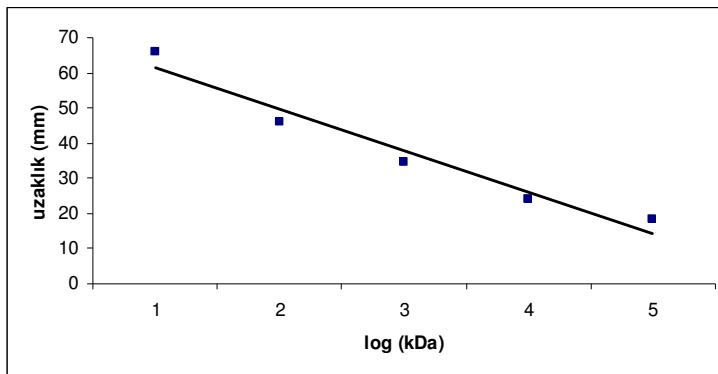


Şekil 3.11. *Pseudomonas fluorescens*'in dış membran (a) ve total protein (b) profilleri

(a) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki dış membran protein profili, 2; *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum içeren ortamdaki dış membran protein profili, 3; *Pseudomonas fluorescens*'in plazmit eliminasyonundan sonraki dış membran protein profili

(b) M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki total protein profili, 2; *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum içeren ortamdaki total protein profili, 3; *Pseudomonas fluorescens*'in plazmit eliminasyonundan sonraki total protein profili

Şekil 3.12'de bir örneği gösterildiği gibi protein marker referans alınarak her bir jel için ayrı ayrı elde edilen standart eğriden moleküler ağırlıkları bilinmeyen protein bandlarının molekül ağırlıkları belirlenmiştir.



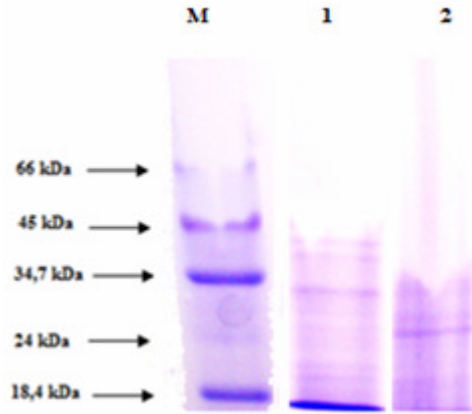
Şekil 3.12. Total ve dış membran protein moleküler ağırlık belirleme standart eğrisi

3.7. Bakterilerin Lipopolisakkarit (LPS) ve Ekzopolisakkarit (EPS) Profilleri

Patojen olarak bilinen *Klebsiella pneumoniae* ve *Sphingomonas paucimobilis* suşlarının metal içeren ve içermeyen her iki ortamda da LPS ve EPS profilleri incelenmiştir.

3.7.1. Gümüş Dirençli *Klebsiella pneumoniae*'nin LPS Profili

Klebsiella pneumoniae suşunun gümüş içeren ve içermeyen ortamdaki LPS profilleri Şekil 3.13'de gösterilmiştir. *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içeren ve içermeyen her iki ortamda R tipi LPS'ye sahip olduğu belirlenmiştir.

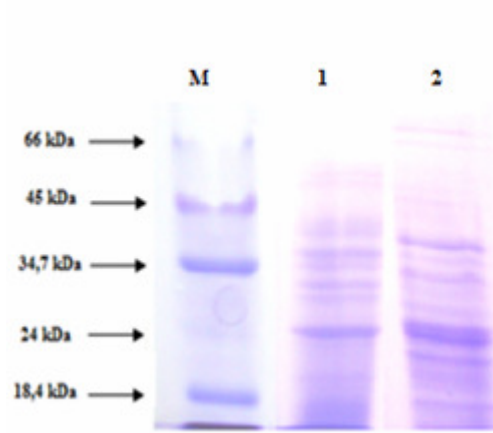


Şekil 3.13. *Klebsiella pneumoniae*'nin LPS profili

M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içermeyen ortamdaki LPS profili, 2; *Klebsiella pneumoniae*'nin gümüş içeren ortamdaki LPS profili

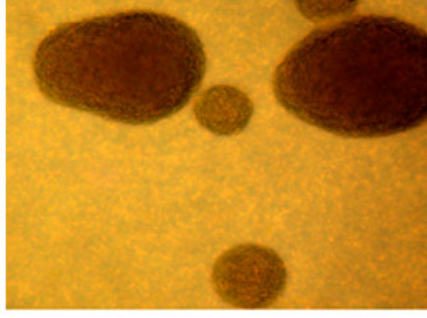
3.7.2. Stronsiyum Dirençli *Sphingomonas paucimobilis*'nin EPS Profili

Sphingomonas paucimobilis suşunun stronsiyum içeren ve içermeyen ortamda EPS profilleri Şekil 3.14'de gösterilmiştir. *Sphingomonas paucimobilis*'nin stronsiyum içeren ve içermeyen her iki ortamda EPS'ye sahip olduğu belirlenmiştir.

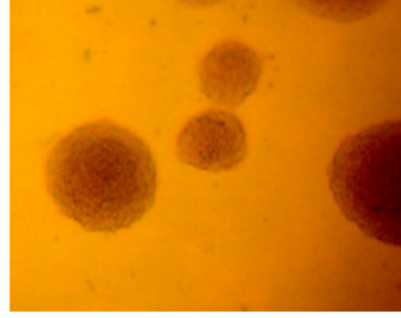


Şekil 3.14. *Sphingomonas paucimobilis*'in EPS profili

M; Marker (Protein Weight Marker MW-SDS-70), 1; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki EPS profili, 2; *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamdaki EPS profili



(a)



(b)

Şekil 3.15. *Sphingomonas paucimobilis*'in EPS üretimi

- (a) *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içermeyen ortamdaki EPS üretiminin mikroskopik görüntüsü (40x),
(b) *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamdaki EPS üretiminin mikroskopik görüntüsü (40x)

Sphingomonas paucimobilis suşunun stronsiyum içeren ve içermeyen ortamdaki EPS üretimi Şekil 3.15'de gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Kızılırmak üzerindeki gümüşe dirençli suşlar 10 ve 11. bölge olarak numaralandırılan yerlerden izole edilmiştir. Bu suşlar için maksimum MİK değeri 8 mg/L olarak belirlenmiştir. Morfolojik özellikleri ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak suşlar sırasıyla *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmışlardır. Ayrıca 2 ve 11. bölge olarak numaralandırılan yerlerden de stronsiyuma dirençli suşlar izole edilmiş ve maksimum MİK değeri 2000 mg/L olarak belirlenmiştir. Stronsiyum dirençli suşlar morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak sırasıyla *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmışlardır. Gümüş dirençli suşlar, Kırıkkale-Kapulukaya Hidroelektrik Santralinin bulunduğu 10. bölgeden ve Kırıkkale-Makine Kimya Fabrikalarının yakın olduğu 11. bölgeden izole edilmişlerdir. Stronsiyum dirençli suşlar ise Kırıkkale-Kesikköprü Hidroelektrik Santralinin bulunduğu 2. bölgeden ve Kırıkkale-Makine Kimya Fabrikalarının yakın olduğu 11. bölgeden izole edilmişlerdir.

Otitoloju ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [89], Thames nehrinden su örnekleri olarak AgNO₃ dirençli suşları izole etmişlerdir. Nutrient agar besiyerine 10 mM'dan başlayarak artan konsantrasyonlarda AgNO₃ eklenerek en yüksek direnci gösteren 3 suşu seçmişlerdir. Bu suşlar *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp.'dir.

Birçok raporda, maden işletmelerinin bulunduğu kirli alanlardan, fotoğraf film üretim veya işleme ile ilgili alanlardan ve endüstriyel su dağıtım sistemlerinden gümüş dirençli bakterilerin izole edildiği gösterilmiştir. Bazı gümüş dirençli bakteri türleri de çeşitli çevrelerden izole edilmiştir ve gümüş toksisitesi dirençli bakteri seçimi için belirleyici olmuştur. Gümüş dirençli bakteriler *Salmonella* suşları, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* R1 ve *Pseudomonas stutzeri* bakterileridir [89]. AgNO₃ için yapılan MİK değeri belirleme çalışmalarında ise, *Staphylococcus aureus* (100 suş) ve *Pseudomonas* sp. (100 suş) için MİK değeri, 8 ile 80 mg/L aralığında hesaplanmıştır [90]. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cepacia*, *Bacillus multivorans*, *Bacillus cenocepacia*, *Bacillus stabilis*,

Bacillus vietnamiensis, *Bacillus dolosa*, *Bacillus ambifaria* ve *Bacillus anthia* gibi bakterilerin gümüş iyonlarına karşı dirençlilikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin MİK değerleri 1 ve 10 µg/ml aralığında belirlenmiştir [91]. Percivala ve arkadaşları [92], *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin gümüşe karşı direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Anderson ve arkadaşları [93] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas fluorescens*'in stronsiyum iyonlarına karşı direnç geliştirdiğini göstermişlerdir. Bu dirençliliği ise stronsiyum iyonlarının kristal şeklinde ekstrasellüler çökmesi sonucunda oluştuğunu belirtmişlerdir. Valentine ve arkadaşlarının [94] yaptığı çalışmada ise, metal kontaminasyonunun olduğu Washington Hanford bölgesinden izole edilen *B. simplex* ZAN-044 suşu ile *B. subtilis* ve *E. coli* suşlarının stronsiyuma karşı direnç geliştirdiklerini göstermişlerdir.

Gümüş dirençli ve stronsiyum dirençli bakterilerin diğer ağır metallere karşı dirençlilik profilleri de incelenmiştir. *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*'ya göre daha fazla ağır metale ve antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. *Pseudomonas putida* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının Al, Li, Sn, Ni, Sr metallerine ve ATM, PEF, TIC, CA antibiyotiklerine ortak direnç gösterdikleri de saptanmıştır. Stronsiyum dirençli suşların çoklu metal dirençlilik profiline bakıldığında *Sphingomonas paucimobilis*'in metal dirençliliğinin *Pseudomonas fluorescens*'e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik profili incelendiğinde ise, *Pseudomonas fluorescens*'in daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği görülmüştür. *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının Al, Li, Ba, Ni metallerine ve ATM, CN, PEF, TOB antibiyotiklerine ortak direnç gösterdikleri saptanmıştır.

Abosereh ve arkadaşları [95], *Pseudomonas* suşlarında çoklu metal ve antibiyotik dirençlilik profillerini çıkarmışlardır. Gümüşe dirençli olan suşların, bakır, nikel, demir, civa, çinko, kadmiyum ve kurşun metallerine de ortak direnç gösterdiklerini saptamışlardır. Ayrıca gümüş dirençli *Pseudomonas* suşlarının, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline ve ampicillin antibiyotiklerine de ortak direnç gösterdikleri

saptanmıştır. Zolgharnein ve arkadaşları [24], Basra körfezinden izole ettikleri *Pseudomonas putida* suşlarının kadmiyum, bakır, kurşun ve çinko metallerine dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Leedjarv ve arkadaşları [42], *Pseudomonas putida* KT2440 suşunda çoklu metal direnci üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *Pseudomonas putida* KT2440 suşunu ayrı ayrı çinko, kadmiyum, kurşun, kobalt ve nikel metallerin bulunduğu ortamda inkübe etmişler. *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun en çok direnci çinkoya ve en az direnci de kadmiyum metaline karşı gösterdiği saptanmıştır. Singh ve arkadaşları [96], endüstriyel kirliliğin etkin olduğu Hindistan'ın Paonta Sahib H. P. bölgesinde ağır metallerle dirençli sekiz *Pseudomonas* suşunu izole etmişlerdir. Bu suşların antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır ve izole edilen suşların dirençlilik profilleri belirlenmiştir. En fazla dirençliliğin tetracycline antibiyotiğine olduğu, en az dirençliliğin de meropenem, bacitracin, amikacin antibiyotiklerine olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, Li ve arkadaşları [56], gümüş dirençli *E. coli* 116, 496 ve B1 suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeylerini incelemişlerdir. Bu suşların cephaloridine, cephalothin, cefepime, cefpirom, tetracycline ve chloramphenicol antibiyotiklerine karşı dirençlilikleri gösterilmiştir. Bu 3 suşun en fazla dirençliliği cephalothin antibiyotiğine gösterdiği belirtilmiştir. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerine dayanılarak tanımlanarak edilen *Klebsiella pneumoniae* türlerinin ampicillin, streptomycin, gentamicin, ofloksasin, tetracycline ve chloramphenicol farklı derecelerde direnç gösterdikleri gösterilmiştir [73]. Yapılan diğer bir çalışmada ise, Rajbanshi [51] ve arkadaşları, krom metaline direnç gösteren *Klebsiella pneumoniae* suşunun antibiyotik dirençliliği de incelenmiştir. Bu suşun, gentamycin, cotrimoxazole antibiyotiklerine duyarlılığı, tetracycline, ciprofloxacın, chloramphenicol, ampicillin antibiyotiklerine karşı da dirençlilikleri tespit edilmiştir.

Xie ve arkadaşları [98], metal kontaminasyonun olduğu ortamdan izole ettikleri *Sphingomonas paucimobilis* suşunun, bakıra dirençli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu suşun en fazla direnci de kadmiyum metaline karşı gösterdiğini tespit etmişlerdir. *Sphingomonas paucimobilis*'in kadmiyum metaline karşı yüksek adsorblama kapasitesinin olduğunu ve metal kontaminasyonu olan kirli sulardan kadmiyumu %84 oranında uzaklaştırdığını belirlemişlerdir. Moreira ve

arkadaşlarının [98] yaptıkları çalışmada içme suyu arıtma tesislerinden izole ettikleri *Sphingomonas* suşlarında antibiyotik dirençlilik profillerini incelemişlerdir. *Sphingomonas* üyelerinin beta-laktam antibiyotiklerine, ciproflaxacin ve cotrimoxazol'e karşı dirençliliğinin fazla olduğunu göstermişlerdir. Thavasi ve arkadaşlarının [99] yaptıkları çalışmada ise, denizden izole ettikleri *Pseudomonas fluorescens* suşlarının antibiyotik dirençliliklerini incelemişlerdir. En fazla dirençlilik peniciline, en az dirençlilik ise cephataxime ve nalidixic acid antibiyotiklerine karşı olduğunu göstermişlerdir. Doğal çevredeki metal kontaminasyonunun, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasını ve korunmasını desteklediğini göstermektedir [55]. Wright ve arkadaşları [55] yaptıkları çalışmada As, Cu, Mn, Zn, Co ve Ag metallerine direnç geliştiren suşların aynı zamanda Cip, Tet, Chlor ve β -lactams antibiyotiklerine de direnç geliştirdiklerini tespit etmişlerdir. Bakterilerdeki metal ve antibiyotik dirençliliğinin ortak direnç mekanizmaları ile kazanıldığı da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [55].

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. Zehirli kimyasal atıkların olduğu bölgede izole edilen bakteriler temiz sulardan izole edilen bakterilere göre daha sıklıkla plazmit DNA içerirler ve antibiyotik dirençliliği gösterirler. Yapılan çalışmalarda, endüstriyel olarak kirli nehirlerde yaşayan *Pseudomonas*'da plazmit insidansı (%18) kirlilik olmayan bölgede yaşayan *Pseudomonas* plazmit insidansına (%7) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur [18].

Ağır metal dirençliliğinin plazmit veya kromozomal DNA aracılı olup olmadığının tespiti için gümüş dirençli suşlar ile stronsiyum dirençli suşların plazmit DNA profilleri belirlenmiştir. Yapılan deneylerde, *Pseudomonas putida*'nın gümüş içeren ve içermeyen ortamda plazmit bulundurduğu gözlemlenmiştir. Her iki ortamda üretilen *Pseudomonas putida*'dan izole edilen plazmitlerin 21 kb boyutunda oldukları tespit edilmiştir. Bu suşa plazmit eliminasyonu çalışmaları yapılmıştır. Plazmit eliminasyon sonrasında *Pseudomonas putida*'nın gümüş içeren ortamda

üreyemediği, rifampin, penicilin, oxacillin, vancomycin ve basitracin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği belirlenmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde *Pseudomonas putida* suşunun gümüş ve antibiyotik dirençlilik genlerinin aynı plazmit (21 kb) üzerinde olduğu düşünülmektedir. Abosereh ve arkadaşları [95], *Pseudomonas* suşlarında gümüş dirençlilik profillerini incelemişlerdir. Bu dirençliliğin düşük ve yüksek molekül ağırlıklı plazmitler ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *Pseudomonas* suşlarında çinko, demir, civa, kobalt, nikel gibi metaller ile antibiyotiklere dirençliliğin de plazmitler ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada, gümüş dirençliliğinin kodlandığı 180 kb boyutundaki pMG101 plazmitinin civa, tellürit gibi metallerin ve bazı antibiyotik dirençlilik genlerinin de bu plazmit üzerinde olduğu tespit edilmiştir [89].

Gümüş direnci gösteren *Klebsiella pneumoniae*'de ise gümüş içeren ve içermeyen her iki ortamda plazmit varlığı gösterilememiştir. Bu nedenle bu suşun gümüş dirençlilik genlerinin kromozomal DNA üzerinde olduğu düşünülmektedir. Kromozomal DNA'ya transpozonlar aracılığı ile gümüş dirençlilik genlerinin entegre olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da değişik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu nedenle bizim çalışmamızı doğrular niteliktedir. Yapılan çalışmalarda *Klebsiella pneumoniae* suşunun gümüş dirençliliğinin kromozomlar üzerindeki genler ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [100]. Gümüş dirençlilik genlerini kodlayan, plazmitler üzerindeki *silCBA* gen bölgesi homologlarının, *Klebsiella pneumoniae*'deki kromozomal DNA üzerinde tespit etmişlerdir [100]. Gupta ve arkadaşları [100], gümüş dirençliliğinin ilişkili olduğu pMG101 plazmiti üzerindeki *sil* genlerinin, *E. coli* K-12 ve O157:H7 suşlarındaki kromozomal DNA üzerindeki *agr* genleri ile homolog olduklarını göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda klinik alanlardan ve çevresel kaynaklardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının gümüş dirençliliğinin plazmit ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [56]. Diğer bir çalışmada ise, Lok ve arkadaşları [101], gümüş miktarını adım adım arttırarak gümüşe en çok direnç gösteren bakteriyi izole etmişlerdir. İzole edilen bu bakteriyi *E. coli* olarak tanımlamışlardır ve gümüş dirençliliğinin kökeninin kromozomal DNA ile bağlantısı olduğunu göstermişlerdir. Gram negatif bakterilerdeki gümüş dirençliliğinin genellikle plazmit aracılı olduğu

yapılan çalışmalarda görülmüştür. Enerjiye bağımlı atım mekanizması ile gümüş iyonlarının atılmasından sorumlu genlerin plazmit üzerinde olduğu belirtilmiştir [18].

Stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarının da plazmit profilleri belirlenmiştir. *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içermeyen ortamda plazmit tespit edilmezken, stronsiyum içeren ortamda 21 ve 27 kb boyutunda iki plazmit içerdiği belirlenmiştir. Plazmit eliminasyonu sonucunda, *Sphingomonas paucimobilis* suşunun stronsiyum içeren ortamda ürettiği ve antibiyotik dirençliliğini kaybetmediği görülmüştür. Bu bulgular değerlendirildiğinde, *Sphingomonas paucimobilis* suşunun stronsiyum dirençliliğinin 21 ve 27 kb boyutunda olan plazmitler ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir. *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum içeren ortamda plazmitlerin ekspresyonunun arttığı fakat stronsiyum dirençliliği üzerinde etkisi olmadığı belirlenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında, Dressler ve arkadaşları [102], çevresel kaynaklardan izole ettikleri *Sphingomonas paucimobilis* suşunun ağır metal dirençliliğinin kökenini incelemişlerdir. Bakır, çinko, kobalt ve nikel metallerine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. *Sphingomonas paucimobilis* suşunun metal dirençliliğinin 210 ve 40 kb boyutundaki plazmitler ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımızla uyuşmamaktadır.

Diğer bir stronsiyum dirençli suş olan *Pseudomonas fluorescens* de ise stronsiyum içeren ve içermeyen ortamda 21 kb boyutunda plazmit içerdiği gösterilmiştir. Plazmit eliminasyonu sonrasında bu suşun stronsiyumlu ortamda ürettiği, gentamicin, rifampin, erythromycin, penicilin, ampicillin, chloramphenicol, amoxycillin, cefoperazone/sulbactam, oxacillin, vancomycin ve bacitracin antibiyotiklerine karşı dirençliliğini kaybettiği de tespit edilmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde, stronsiyum dirençliliğinin kromozomal DNA ile ilişkili olduğu ve antibiyotik dirençliliğinin ise plazmit DNA ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas fluorescens* 13 ve 16 suşlarının metal ve antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir. Bu suşların, bakır, kurşun, nikel, çinko, demir ve gümüş metalleri ile chloramphenicol, kanamycin, tetracycline ve ampicillin antibiyotiklerine ortak direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu dirençlilik genlerinin de düşük ve yüksek molekül ağırlıklı plazmitler üzerinde kodlandığını tespit etmişlerdir [95]. Wasi ve arkadaşları [103], metal kirliliğinin olduğu bölgeden izole ettiği *Pseudomonas fluorescens* suşunun metal dirençliliğini incelemişlerdir. *Pseudomonas fluorescens*'in kadmiyum, krom, nikel, bakır, kurşun metallerine dirençli olduğunu ve bu dirençlilik genlerinin 43,6 kb boyutundaki plazmit üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* suşunun antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır.

Ortamdaki ağır metal konsantrasyonu arttıkça bakterilerin farklı direnç sistemleriyle metallere karşı tolerans geliştirdikleri görülmüştür. Örneğin, *Desulfovibrio* sp., *Alcaligenes* sp. ve *E. coli* gibi bakteriler ağır metal dirençliliğini enzimatik transformasyonla, prespitasyon mekanizmaları ve metallothioneinlere bağlanarak sağlamaktadırlar [104]. Metal direnç yollarında stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler anahtar rolü oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir [105, 106].

Gümüş dirençli *Pseudomonas putida* ile *Klebsiella pneumoniae* ve stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ile *Pseudomonas fluorescens* suşlarının metal içeren ve içermeyen ortamlarda dış membran ve total protein profilleri belirlenmiştir. *Pseudomonas putida* suşunun gümüş içeren ortamda 38,3, 21,4 ve 15,9 kDa boyutlarında dış membran proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. *Pseudomonas putida*'nın total protein profili incelendiğinde ise 38,3, 21,4, 15,9, 12,8 ve 9,3 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunu arttığı görülmüştür. Bu bulgular değerlendirildiğinde *Pseudomonas putida* da gümüş dirençliliğinin hem dış membran hem de total proteinlerin ekspresyonunu artırarak direnç geliştirdiği düşünülmektedir. Ayrıca plazmit eliminasyon sonrasındaki analizlerde dış membran ve total proteinlerin sentezinde plazmitlerin etken olduğu da düşünülmektedir. Canovas ve arkadaşları [14] *Pseudomonas putida* KT2440 suşunun krom atım mekanizması için ChrA proteini, gümüş ve bakır atım sistemi için de CusC, CusB, CusA proteinlerinin rolleri olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan

çalışmalarda *Pseudomonas putida* da metal dirençlilik mekanizması araştırılmıştır ve metallerin proteinlere bağlanarak hücre içinde alıkonmasıyla ağır metallere karşı dirençlilik geliştirdiğini gösterilmiştir. *Pseudomonas putida*'nın metallothioneinlere benzeyen, 3 farklı sistein bakımından zengin protein ürettiği tespit edilmiştir [43]. *Pseudomonas putida* 06909 suşunda ilk olarak ATPaz ın sorumlu olduğu CadA sistemi keşfedilmiştir. CadA sisteminin gen ürünleri hücre içindeki ağır metallere bağlanarak bakterinin direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Bu sistem *Pseudomonas putida* 06909 suşunun, kadmiyum ve çinkoya karşı direnç kazanmasını sağlamıştır. Aynı sistem *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 ve *Pseudomonas putida*'da karakterize edilmiştir [42]. *Enterococcus hirae* bakterisinde Cu(II) dirençliliğinden sorumlu cop operonunun bulunduğu bildirilmiştir. Bu operonun genleri Cu(II)'nin hücre içinden hücre dışına salınmasında görev alan proteinleri kodlamaktadır [5]. Bazı *Pseudomonas* suşlarında da benzer bir operon bulunduğu bildirilmiştir [62].

Klebsiella pneumoniae'nin protein profilleri incelendiğinde 37,4, 22 ve 10,5 kDa boyutlarındaki dış membran proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Total protein profilleri incelendiğinde ise 37,4 ve 10,5 boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunda da artış olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, *Klebsiella pneumoniae* suşunun dış membran protein ekspresyonunu belirgin olarak arttırarak, hücre dışına gümüş iyonlarını atmasıyla direnç geliştirdiğini düşündürmektedir. Otitoloju ve arkadaşları [89], *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının gümüş dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Gümüş içeren ortamda 45,2 kDa boyutundaki TolC dış membran proteinin ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Farklı mikroorganizmalarda işleyiş bakımından farklılıklar gösterse de en iyi karakterize edilmiş Cd(II) dirençliliği sağlayan taşıma sistemi *S. aureus*'daki, plazmit tarafından kodlanan, cad sistemi (cadA, cadB, cadC) ve *A. eutropus*'daki czc (czcA, czcB, czcC, czcD) sistemidir. Her iki operonun gen ürünleri; hücre içindeki Cd(II)'yi kendine bağlayıp yine operon tarafından kodlanan kanal proteinine taşınmakta ve operonun diğer gen ürünleri aracılığı ile de hücre dışına salınmaktadır [4, 103].

Stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşlarında stronsiyum içeren ve içermeyen ortamlarda dış membran ve total protein profilleri incelenmiştir. *Sphingomonas paucimobilis* suşunun stronsiyum içeren ortamda 28,4, 20,6 ve 18,4 kDa boyutlarında dış membran proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. *Sphingomonas paucimobilis*'in total protein profili incelendiğinde 22, 20,6, 14,3 ve 12,2 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunu arttığı görülmüştür. Bu bulgular değerlendirildiğinde *Sphingomonas paucimobilis*'in stronsiyum dirençliliğinde her iki proteinin de aktif rol aldığı düşünülmektedir.

Pseudomonas fluorescens'in protein profilleri incelendiğinde ise 45, 32,5, ve 2,7 kDa boyutlarında dış membran proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Total protein profili incelendiğinde 66, 45, 32,5 ve 20,8 kDa boyutlarındaki proteinlerin ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca plazmit eliminasyonu sonrasındaki dış membran ve total proteinlerin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Bu bulgulardan *Pseudomonas fluorescens* suşunun metal dirençliliğinde dış membran proteinlerinin etkin rol aldığı düşünülmektedir. Sharma ve arkadaşları [105], *Pseudomonas fluorescens*'in ağır metal stresine karşı gösterdiği direnç mekanizmasında proteinlerin rolünü proteomik bir yaklaşımla açıklamışlardır. Çalışmada bakteri çeşitli ağır metallere maruz bırakıldığında farklı olarak sentezlenen proteinleri 2D jel elektroforezi ile belirlenmiş ve tanımlanmıştır. Bakteri Pb(II) ve Cu(II)'ye maruz bırakılınca spo VG ile enolaz proteinlerinin sentezinin arttığı görülmüştür. Mikroorganizma Co(II) ağır metale maruz kaldığında ise varsayılan proteinin sentezinin azaldığı, ksilotransferaz, ORF 18 faj fi KZ, OMP H1 ve translasyonel uzama faktör (EF-Tu) gibi proteinlerin ise yalnızca bu metale maruz kalındığında sentezlendiği görülmüştür. Araştırmacılar bütün bu sonuçlar ışığı altında, bakterinin ortamda ağır metaller varken çalışmada tanımlanan proteinler aracılığı ile bakterinin ağır metal stresine karşı bir savunma mekanizması geliştirdiğini göstermişlerdir. Literatürde *Sphingomonas paucimobilis*'in metal dirençliliğinin protein ekspresyonu üzerindeki etkisi ile ilgili benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

Patojen olarak bilinen gümüş dirençli *Klebsiella pneumoniae* ile stronsiyum dirençli *Sphingomonas paucimobilis* suşlarında, metal içeren ve içermeyen ortamlardaki LPS ve EPS profilleri incelenmiştir. *Klebsiella pneumoniae* suşunun R tipi LPS içerdiği gösterilmiştir. *Klebsiella pneumoniae*'nin metal içeren ve içermeyen her iki metal dirençliliği ile LPS profili arasında direkt bir ilişki kurulamamıştır.

Kawahara ve arkadaşları [106], *Sphingomonas paucimobilis* suşunun gram negatif bakterilerde önemli bir komponent olarak bulunan LPS'den yoksun olduğunu belirtmişlerdir. Dış membranda LPS yerine geçen uzun zincirli aminoalkol olan sfingozin yapılarının olduğunu göstermiş ve bu yapıyı analiz etmişlerdir.

Sphingomonas paucimobilis suşunun EPS profilinde ve ışık mikroskobu altındaki görüntüsünde ise stronsiyum içeren ve içermeyen her iki ortamda da EPS üretiminin olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde *Sphingomonas paucimobilis*'in metal dirençlilik ile EPS profili arasında direkt bir ilişki kurulamamıştır. White ve arkadaşları [107], *Sphingomonas paucimobilis* suşunun da ekzopolisakkarit yapısını analiz etmişlerdir. Bu polisakkarit yapılarının endüstriyel uygulamalarda kullanıldığını ve *Sphingomonas paucimobilis*'den üretilen ksantan zankının ilaç ve gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı olarak kullanıldığını belirtmişlerdir.

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

KAYNAKLAR

- [1] Kahveciođlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S, Metallerin Çevresel Etkileri-I, Metalurji, http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, Sayı: 136., (2009).
- [2] Kavamura, V. N., Esposito, E., Biotechnological Strategies Applied to the Decontamination of Soils Polluted with Heavy Metals, Biotechnology Advances, Vol: 28, 61–69, (2010).
- [3] Gutnick, D. L., Bach, H., Engineering Bacterial Biopolymers for the Biosorption of Heavy Metals, Taylor & Francis Group, LLC, 507-527, (2005).
- [4] Toppi, S., L., Gabbrielli, R., Response to Cadmium in Higher Plants, Environ. Exp. Bot., Vol: 41, 105–130, (1999).
- [5] Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F. W., Microbial Resistance to Metals in the Environment. Ecotox. Environ. Safe., Vol: 45, 198-207, (2000).
- [6] Jaysankar, D., Ramaiah, N., Vardanyan, L., Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bacteria Highly Resistant to Mercury. Marine Biotechnology, Vol: 10, 471-477, (2008).
- [7] Sevgi, E., Ağır Metallerle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Dirençliliğın Plazmitlerle Olan İlişkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, (2007).
- [8] Özden, Y., Enne ve Porsuk Barajı Sedimentine Bağlı Ağır Metallerin *Cyprinus carpio*'nun Değışik Dokularına Biyoakümülyasyonunun Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, (2008).

- [9] Alp, T., Ağır Metal Kirliliği İçeren Atıksularda Çeşitli Türdeki Maya ve Küf Mantarı Hücrelerinin Büyüme Kinetiğinin ve Hücrelerdeki Metal Biyobirikimi ile Biyobirlikiminin Karşılaştırmalı İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, (2006).
- [10] Brown, D. S., Martin, M., Deshpande, S., Seal, S., Huang, K., Alm, E., Yang, Y., Wu, L., Yan, T., Arkin, A., Chourey, K., Zhou, J., Thompson, K. D., Cellular Response of *Shewanella oneidensis* to Strontium Stres. Applied and Environmental Microbiol., Vol: 72, 890-900, (2006).
- [11] Dopson, M., Austin, C. B., Koppineedi, P. R., Bond, P. L., Growth in Sulfidic Mineral Environments: Metal Resistance Mechanisms in Acidophilic Microorganisms, Microbiology, Vol: 149, 1959–1970, (2003).
- [12] Wackett, L. P., Dodge, A. G., Ellis L. B. M., Microbial Genomics and the Periodic Table, Applied and Environmental Microbiol., Vol: 70(2), 647-55, (2004).
- [13] Ehrlich, H. L., Microbes and Metals. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol: 48, 687-692, (1997).
- [14] Canovas, D., Cases, I., Lorenzo V., Heavy Metal Tolerance and Metal Homeostasis in *Pseudomonas putida* as Revealed by Complete Genome Analysis. Environ. Microbiol., Vol: 5, 1242–1256, (2003).
- [15] Lawrence, J.G., Clustering of Antibiotic Resistance Genes: Beyond the Selfish Operon. ASM News, Vol: 66(5), 281-286, (2000).
- [16] Ratul Saikia, R., Microbial Biotechnology. New India Publishing, (2008).
- [17] Ron, E. Z., Minz, D., Finkelstein, N. P., Interactions of Bacteria with Cadmium, Biodegradation, Vol: 3, 161-170, (1992).

- [18] Silvestry- Rodriguez, N., Ruleas- Sicaïros, E. E., Gerba, C. P., Bright, K. K., Silver as a Disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol.*, Vol: 191, 23–45, (2007).
- [19] Wang, Y., Zhang, H., Guo, D., Pei, Z., Sr(II) Removal from Aqueous Solution by *Pseudomonas fluorescens* Biomass, Equilibrium and Kinetic Studies. Third International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation, (2011).
- [20] Alluri, H. K., Ronda, S. R., Settalluri, V. S., Bondili, J. S., Suryanarayana, V, Venkateshwar, P., Biosorption: An Eco-friendly Alternative for Heavy Metal Removal. *African Journal of Biotechnology* Vol: 6 (25), 2924-2931, (2007).
- [21] Tony Jong, T., Parry, D L., Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on Bacterially Produced Metal Sulfides. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol: 275, 61–71, (2004).
- [22] Nies, D. H., Microbial Heavy-Metal Resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Vol: 51, 730±750, (1999).
- [23] Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., Kimyasallar ve Çevre, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, No: 50, (2001).
- [24] Khan, M. M. A., Umar, R., Lateh, H., Study of Trace Elements in Groundwater of Western Uttar Pradesh. *Scientific Research and Essays* Vol: 5 (20), 3175-3182, (2010).
- [25] Langley, S., Gault, G. A., Ibrahim, A., Takahashi, Y., Renaud, R., Fortin, D., Clark, I. A., Ferris, F. G., Strontium Desorption from Bacteriogenic Iron Oxides (BIOS) Subjected to Microbial Fe(III) Reduction. *Chemical Geology* Vol: 262, 217–228, (2009).

- [26] Dan'Azumi, S., Bichi , M. H., Industrial Pollution and Heavy Metals Profile of Challawa River in Kano. Department of Hydraulics and Hydrology, Vol: 5 (1), 23-29, (2010).
- [27] Tsezos ve Volesky, Biosorption of Uranium and Thorium. Biotech. And Bioeng, Vol: 23, 583-604, (1981).
- [28] www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/periodydik/kullanim2.html
(Erişim Tarihi: 06.08.2011)
- [29] Tsezos,M., Volesky, B., The Mechanism of Uranium Biosorption by *Rhizopus arrhizus*. Biotechnology and Bioengineering, Vol: 24, 385-401, (1982).
- [30] Malik, A., Metal Bioremediation Through Growing Cells. Science Direct Environmental International, Vol: 30, 261-278, (2004).
- [31] Tefloncu A., Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Yayınlar, İzmir,(1995).
- [32] Vijayaraghavan, K., Palanivelu, K., Velan, M., Biosorption of Copper(II) and Cobalt(II) from Aqueous Solutions by Crab Shell Particles. Bioresource Technology, Vol: 97, 1411–1419, (2006).
- [33] Pieper, D. H., Seeger, M., Bacterial Metabolism of Polychlorinated Biphenyls. J. Mol. Microbial Biotechnol, Vol: 15, 121-138, (2008).
- [34] Gadd, G. M., Metals, Minerals and Microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. Division of Molecular Microbiology, Vol: 156, 609-643, (2010).
- [35] Saier, M. H., Beneficial Bacteria and Bioremediation. J. Mol. Microbial Biotechnol., Vol: 9, 63-64, (2005).

- [36] Saikita, R., Bezbaruah, R. L., Bora, T. C., Microbial Biotechnology. Jai Bharet Printing Press, Delhi, (2008).
- [37] Choong, C. C., Ting, A. S. Y., Bioaccumulation and Biosorption Efficacy of Trichoderma Isolate SP2F1 in Removing Copper (Cu(II)) from Aqueous Solutions. World J Microbiol Biotechnol., Vol: 25, 1431–1437, (2009).
- [38] Gavrilesco, M., Removal of Heavy Metals from Environment by Biosorption. Eng. Life Sci., Vol: 3, 219-232, (2004).
- [39] Gazso, L. G., The Key Microbial Processes in the Removal of Toxic Metals and Radionuclides from the Environmen. Cejoem, Vol: 7(3-4): 178- 185, (2001).
- [40] Emtiaza, G., Ethemadifar, Habibi, M. H., Production of Extra-cellular Polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal by Exopolymer. Afr. J. Biotech., Vol: 3(6), 330-333, (2004).
- [41] Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Heino, N., Selective Accumulation of Heavy Metals by Three Indigenous *Bacillus* Strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from Drain Waters of a Uranium Waste Pile. FEMS Microbiology Ecology., Vol: 29, 59-67, (1999).
- [42] 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, Vol: 59(6), 817-27, (2004).
- [43] Hussein et. Al., Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida*: Growth and Uptake of Cadmium. Gen Microbiol., Vol: 13, 2539-2544, (1984).

- [44] Anderson, S., Appanna, V. D., Deposition of Crystalline Strontium Carbonate by *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiology Lett., Vol: 116, 43-48, (1994).
- [45] Yılmaz, E. İ., Metal Tolerance and Biosorption Capacity of *Bacillus circulans* Strain EB1, University of Dicle. Faculty of Sciences, Department of Biology, Diyarbakır, Turkey, (2003).
- [46] Valls, M., Lorenzo, V., Exploiting the Genetic and Biochemical Capacities of Bacteria for the Remediation of Heavy Metal Pollution. FEMS Microbiology Reviews, Vol: 26, 327-338, (2002).
- [47] Kılıç, N. K., Dönmez, G., Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, No: 6, 27-33, (2008).
- [48] Silver, S., and L. T. Phung., A Bacterial View of the Periodic Table: Genes and Proteins for Toxic Inorganic Ions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., Vol: 32, 587– 605, (2005).
- [49] Sherameti, I., Varma, A., Soil Heavy Metals. Springer Heidelberg Dordrecht London, New York, (2010).
- [50] 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).
- [51] Rajbanshi A., Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant. Our Nature, Vol: 6, 52-57, (2008).
- [52] Gangle, B.J., Sources and Ocurence of Antibiotic in The Environment. Master of Science, Universty of Maryland, Baltimore, USA, (2005).

- [53] Poole, K., Efflux Pumps as Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Annals of Medicine*, Vol: 39. 162–176, (2007).
- [54] Karbasizaed, V., Badami, N., Emtiazi, G., Antimicrobial, Heavy Metal Resistance and Plasmid Profile of Coliforms Isolated from Nosocomial Infections in a Hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology*, Vol: 2 (10), 379-383, (2003).
- [55] 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).
- [56] 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).
- [57] Salmi C., Loncle C., Vidal N., Letourneux Y., Fantini J., Squalamine: An Appropriate Strategy Against the Emergence of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria, *Plos One*, Vol: 3(7), e2765, (2008).
- [58] Vila, J., Marti, S., Sa´nchez-Ce´spedes, J., Porins, Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol: 59, 1210–1215, (2007).
- [59] Leonhuser, J., Wang, W., Deckwer, W.-D., Wagner-Dobler, I., Functioning of the Mercury Resistance Operon at Extremely High Hg(II) Loads in a Chemostat: A Proteome Analysis. *Journal of Biotechnology*, Vol: 132, 469-480, (2007).
- [60] Haas, A., Schaible, U. E., *Intracelluler Niches of Microbes*, Betz-duch GmbH, Darmstad, (2009).

- [61] Small, T., Sorption of Strontium to Bacteria, Fe(III) Oxide and Bacteria-Fe(III) Oxide Composites in Relation to Contaminant Fate. Graduate Department of Geology University of Toronto, (2000).
- [62] Sandrin T. R., Chech A. M., Maier R. M., “A Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity During Naphthalene Biodegradation”, Appl. Environ. Microb., Vol: 66(10), 4585-4588 (2000).
- [63] Silver, S., Genes for all Metals – A Bacterial View of the Periodic table the 1996 Thom Award Lecture. J. Ind. Microbiol. Biotech., Vol: 20, 1-12., (1998).
- [64] Mamelli L., Petit S., Chevalier J., Giglione C., Lieutaud A., New Antibiotic Molecules: Bypassing the Membrane Barrier of Gram Negative Bacteria Increases the Activity of Peptide Deformylase Inhibitors. PLoS ONE, Vol: 4(7), e6443, (2009).
- [65] Silver, S., Misra, T. K., Bacterial Transformation of and Resistances to Heavy Metals, Basic Life Sci., Vol: 28, 23-46, (1984).
- [66] Rosen, B. P., Bacterial Resistance to Heavy Metals and Metalloids. JBIC, Vol: 1, 273–277, (1996).
- [67] Silver, S., Phung, T., Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. Annu. Rev. Microbiol., Vol: 50, 753–789, (1996).
- [68] Kanan, K. S., Mahadevan, S., Krishnamoorthy, R., Characterization of a Mercury-Reducing *Bacillus cereus* Strain Isolated from the Pulicat Lake Sediments, South East Coast of India. Arch Microbiol., Vol: 185, 202–211, (2006).

- [69] Lemire, J., Auger, C., Bignucolo, A., Appanna, V. P., Appanna, V. D., Metabolics Strategies Deployed by *Pseudomonas fluorescens* to Combat Metal Pollutants: Biotechnological Prospects. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex, 177-187, (2010).
- [70] Leedjařrv, 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).
- [71] Cloete, T. E., Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol: 51, 277-282, (2003).
- [72] Ji, G., Silver, S., Bacterial Resistance Mechanism for Heavy Metals of Environmental Concern. J. Ind. Microbiol., Vol: 14, 61-168, (1995).
- [73] Zolgharnein, H., Azmi, M. L. M., Saad, M. Z., Mutalib, A. R., Mohamed, C. A. R., 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).
- [74] Silver. S., Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F., Resistance to Ag(I) Cations in Bacteria. Environments, Genes and Proteins. Department of Microbiology and Immunology, Vol: 6(4-5), 315-20, (1999).
- [75] Mao, Y., Wang, X., Luo, S., Liu, W., Adsorptive Removal of Strontium from Aqueous Solution by Utilizing *Pseudomonas alcaligenes* Biomass as Biosorbent. Third International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation, (2011).
- [76] Edward Raja, 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).

- [77] Yılmaz, M., <http://www.cevreorman.gov.tr/sulak/sulakalan/kizilirmak.htm>, (Erişim Tarihi: 04.03.2011).
- [78] Gündoğan, Y., Kızılırmak Nehri'ndeki (Kırıkkale) *Cladophora*'da Ağır Metal Birikimi Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Çevre Bilimleri, Gazi Üniversitesi, Ankara, (2005).
- [79] 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).
- [80] 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).
- [81] Birnboim HC., Doly J., Arapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucleic Acids Res., Vol: 7, 1513-1523, (1979).
- [82] Cutting, S.M., and Horn, PB., Edited by: Harwood C, Cutting S. John Wiley and Sons, Chichester, Genetic Analysis in Molecular Biological Methods for *Bacillus.*, 27-74, UK, (1990).
- [83] Manniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory., 545, (1982).
- [84] Salam, A., Abosereh, N. A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M. , Resistance Plasmids of Indigenous *Pseudomonas* in Egypt, Journal of Applied Sciences Research, Vol: 3(9), 873-878, (2007).
- [85] Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., Total Soluble Protein and Membrane Lipopolysaccharide Profiles in Differentiating *Rhizobium* isolates, Microbios, Vol: 86, 143-156, (1996).

- [86] Achtman, N., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A. & Silver, R. P., Six Widespread Bacterial Clones Among *Escherichia coli* K Isolates. *Infection and Immunity*, Vol: 39, 315-335, (1983).
- [87] Laemli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, Vol: 227, 680-684, (1970).
- [88] Demiralp, H., Celik, S., Koksel 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).
- [89] Otitolaju, A. A., Rogers, G. B., Bury, N. R., Hogstrand, C., Bruce, K. D., Chromosomal Genes Conferring Tolerance to Heavy Metal (Ag) Toxicity. *Environmentalist*, Vol: 29, 85–92, (2009).
- [90] Chopra, I., The Increasing Use of Silver-Based Products as Antimicrobial Agents: a Useful Development or a Cause for Concern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol: 59, 587–590, (2007).
- [91] Burke, A., Balch, A. L., Enemark, J. H., “Palladium and Platinum Complexes Resulting from the Addition of Hydrazine to Coordinated Isocyanide. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol: 92, 2555-2557, (1970).
- [92] Percivala, S. L., Bowlera, P. G., Russell, D., Bacterial Resistance to Silver in Wound Care. *Journal of Hospital Infection*, Vol: 60, 1–7, (2005).
- [93] Anderson, S., Appanna, V. D., Deposition of Crystalline Strontium Carbonate by *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Lett.*, Vol: 116, 43-48, (1994).

- [94] Valentine, N. B., Bolton, H., Kingsley, M. T., Drake, G. R., Balkwill, D. L., Plymale, A. E., Biosorption of Cadmium, Cobalt, Nickel, and Strontium by a *Bacillus simplex* Strain Isolated from Vadose Zone. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol: 16, 189-196, (1996).
- [95] Salam, A., Abosereh, N. A., El-Salam, A., Ibrahim, S.A., Sa'eb, A.T.M. , Resistance Plasmids of Indigenous *Pseudomonas* in Egypt, *Journal of Applied Sciences Research*, Vol: 3(9), 873-878, (2007).
- [96] Singh, V., Chauhan, P. K., Kanta, R., Dhewa, T., Kumar, V., Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Resistant to Heavy Metals Contaminants, Vol: 3, Issue 2, (2010).
- [97] Xie, X., Fu, J., Wang, H., Liu, J., Heavy Metal Resistance by Two Bacteria Strains Isolated from a Copper Mine Tailing in China. *African Journal of Biotechnology*, Vol: 9(26), 4056-4066, (2010).
- [98] Moreira- Vaz, I., Nunes, C., Manaia, M., Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of *Sphingomonadaceae* Isolated from Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol: 77(16), 5697-706, (2011).
- [99] Thavasi, R., Aparnadevi, K., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Plasmid Mediated Antibiotic Resistance in Marine Bacteria. *Journal of Environmental Biology*, Vol: 28(3), 617-621, (2007),
- [100] Gupta, A., Phung, L. T., Taylor, D. E., Silver, S., Diversity of Silver Resistance Genes in IncH Incompatibility Group Plasmids, *Microbiology*, Vol: 147, 3393-3402, (2001).

- [101] Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., Tam, P., Chiu, J. F., Che, C. M., Proteomic Identification of the Cus System as a Major Determinant of Constitutive *Escherichia coli* Silver Resistance of Chromosomal Origin, *J. Proteome Res.*, Vol: 7 (6), 2351–2356, (2008).
- [102] Dressler, C., Kues, U., Nies, D. H., Friedrich, B., Determinants Encoding Resistance to Several Heavy Metals in Newly Isolated Copper-Resistant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol: 57, No: 11, 3079-3085, (1997).
- [103] Wasi, S., Jeelani, G., Ahmad, M., Biochemical Characterization of a Multiple Heavy Metal, Pesticides and Phenol Resistant *Pseudomonas fluorescens* Strain. *Chemosphere*, Vol: 71, 1348–1355, (2008).
- [104] Vals, M., Lorenzo, M., Exploiting the Genetic and Biochemical Capacities of Bacteria for the Remediation of Heavy Metal Pollution. *FEMS Microbiology Reviews* Vol: 26, 327-338, (2002).
- [105] Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., Gade, W.N., Role of Proteins in Resistance Mechanism of *Pseudomonas fluorescens* Against Heavy Metal Induced Stress with Proteomics. *Approach. Journal of Biotechnology*, Vol: 126, 374-382, (2006).
- [106] Kahawara, K, Seydel, U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietschel, E. T., Za”hringer, U., Chemical Structure of Glycosphingolipids Isolated from *Sphingomonas paucimobilis*, Vol: 292, Page: 107-110, (1991).
- [107] White, D. C., Sutton, S. D., Ringelberg, D. B., The Genus *Sphingomonas*: Physiology and Ecology, *Environmental Biotechnonology*, Vol: 7, 301-306, (1996).