

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 YABAN TİP ve MUTANT (Q9F ve S21Y/V22D)**
DEMİR OKSİDAZLARININ BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Biyolog Dilşat Nigar ÇOLAK

MAYIS 2014

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 YABAN TİP ve MUTANT (Q9F ve S21Y/V22D)**
DEMİR OKSİDAZLARININ BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Biyolog Dilşat Nigar ÇOLAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“DOKTOR (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30.04.2014
Tezin Savunma Tarihi : 30.05.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü


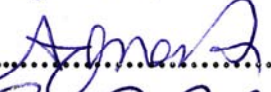



Biyoloji Ana Bilim Dalında

Dilşat Nigar ÇOLAK Tarafından Hazırlanan

***Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 YABAN TİP ve MUTANT (Q9F ve S21Y/V22D)
DEMİR OKSİDAZLARININ BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 13/05/2014 gün ve 1553 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan	: Prof. Dr. Yusuf TUTAR	
Üye	: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ	
Üye	: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI	
Üye	: Prof. Dr. Hacı DEVECİ	
Üye	: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ	

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Yaban Tip ve Mutant (Q9F ve S21Y/V22D) Demir Oksidazlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, 1055 kodlu, “Bazı Maden Ocaklarından Asidofilik Demir Oksitleyici Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı proje kapsamında KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden sağlanan destekle, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, çalışmalarım yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek yol gösterici olan sayın hocam Prof. Dr. Hacı DEVECİ’ye teşekkür etmeyi borç bilirim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda yardımlarıyla bana destek olan Arş.Gör. Halil İbrahim GÜLER’e, Arş.Gör. Aycan AŞIK’a, Miray ŞAHİNKAYA’ya, Müslüm TOKGÖZ’e ve her zaman yanımda olan Yrd.Doç.Dr. Kadriye İNAN’a çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren değerli aileme ve özellikle bu yolda bana en büyük desteği sağlayan *Babam*’a minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyuyorum.

Dilşat Nigar ÇOLAK
Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “*Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Yaban Tip ve Mutant (Q9F ve S21Y/V22D) Demir Oksidazlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 30/04/2014

Dilşat Nigar ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Biyo-madencilğin Gelişimi	3
1.3. Biyoliç Prensipleri	4
1.4. Asidofilik Mikroorganizmalar	6
1.5. Asidofilik Mikroorganizmaların Habitatları.....	7
1.6. Asidofilik Mikroorganizmaların Tanımlanmasında Kullanılan Bazı Teknikler.....	8
1.6.1. Mikroskoba Dayalı Yaklaşımlar.....	8
1.6.2. Kültivasyona Dayalı Yaklaşımlar.....	9
1.6.3. Moleküler Teknikler	11
1.6.3.1. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması	11
1.6.3.2. 16S-23S rRNA Genleri Arasındaki “Spacer” Bölgeler	12
1.6.3.3. 16S rDNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA).....	12
1.6.3.4. PCR'a Dayalı Yöntemler	13
1.6.3.4.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	13
1.6.3.4.2. Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR).....	14
1.6.3.4.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	14
1.7. Biyoliç İşlemlerinde Ticari Öneme Sahip Mikroorganizmalar	15
1.7.1. <i>Acidithiobacillus</i>	15

1.7.2.	<i>Leptospirillum</i>	17
1.7.3.	<i>Acidiphilium</i>	17
1.7.4.	Biyoliç İşleminde Kullanılan Diğer Mikroorganizmalar.....	18
1.8.	Demir Oksidasyonunun Mekanizması.....	20
1.9.	Demir Oksidaz (Iro) Proteinini	22
1.9.1.	[4Fe-4S] Kümesi.....	23
1.10.	Demir Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	24
1.10.1.	KMnO ₄ ile Analiz.....	25
1.10.2.	α -phenanthrolin ile Analiz	25
1.10.3.	EPR (Elektron Paramagnetik Rezonans) Spektroskopisi ile Ölçüm	26
1.11.	Demir Oksidaz Proteinini Üzerinde Yapılan Mutasyon Çalışmaları.....	26
1.12.	Füzyon Proteinler Vasıtası ile Ekspresyonun Artırılması	27
1.12.1.	Füzyon Proteininin Sahip Olması Gereken Özellikler	29
1.12.2.	Füzyon Proteinini Oluşturma.....	29
1.13.	Çalışmanın Amacı	30
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1.	Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler	31
2.2.	Hücre ve Plazmitler	31
2.3.	Moleküler Çalışmalar	32
2.3.1.	Bakır Madenlerinden Örneklerin Alınması ve İzolasyonu.....	32
2.3.2.	İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu	32
2.3.3.	16S rRNA Geninin PCR ile Artırılması	33
2.3.4.	16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması.....	33
2.3.5.	Demir Oksidaz Geninin (<i>iro</i>) Belirlenmesi	34
2.3.5.1.	Primer Sentezi.....	34
2.3.5.2.	Demir Oksidaz Geninin (<i>iro</i>) PCR ile Çoğaltılması.....	34
2.3.5.3.	Demir Oksidaz Geninin (<i>iro</i>) Klonlanması ve Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması.....	35
2.3.6.	<i>A. ferrooxidans</i> M1 Yaban Tip <i>iro</i> Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	36
2.3.7.	<i>Iro</i> Geninin Ekspresyonu.....	36
2.3.8.	<i>Iro</i> Enziminin Saflaştırılması.....	36
2.3.9.	Rekombinant Proteinlerin Oluşturulması	37

2.3.9.1.	Primer Dizaynı.....	37
2.3.9.2.	<i>Iro</i> Geninin pET/Rib Vektörü İçerisine Klonlanması	38
2.3.9.3.	Rekombinant Proteinin Kesilmesi	38
2.3.10.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	39
2.3.11.	<i>Iro</i> Proteininden Sinyal Peptidinin Çıkarılması.....	39
2.3.12.	Mutasyon Çalışmaları.....	40
2.3.12.1.	Q9F Mutasyonu	41
2.3.12.2.	S21Y/V22D Mutasyonu	41
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar.....	42
2.4.1.	Protein Miktarı Tayini	42
2.4.2.	Enzim Aktivitesi Tayini.....	43
2.4.3.	Yaban ve Mutant Enzimlerin (Q9F ve S21Y/V22D) Karakterizasyonu	43
2.4.3.1.	Optimum Sıcaklık.....	44
2.4.3.2.	Optimum pH	44
2.4.3.3.	Enzim Kararlılığı	44
2.4.3.4.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	44
2.4.3.5.	Enzim Kinetiği.....	45
2.5.	İstatistik Analizler.....	45
3.	BULGULAR.....	46
3.1.	İzolatların Kültivasyonu	46
3.2.	İzolatların Morfolojik Özellikleri	47
3.3.	İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri	47
3.4.	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> M1 Suşuna Ait Demir Oksidaz Kodlayan <i>iro</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması ve Klonlanması	49
3.5.	Demir Oksidaz Proteinini Kodlayan <i>iro</i> geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması.....	49
3.6.	<i>Iro</i> Geninin Ribulokinaz Geni ile Birleştirilmesi Sonucunda Oluşan Füzyon Proteini.....	50
3.7.	Sinyal Peptidi Çıkarılan Demir Oksidaz Proteini.....	52
3.8.	Mutant Demir Oksidazlar	53
3.9.	<i>Iro</i> Proteininin Üç Boyutlu Yapısı.....	53
3.10.	Enzimlerin Karakterizasyonu	54
3.10.1.	Demir Oksidaz Aktivitesi	54
3.10.2.	Aktivite Deneyinde Kullanılan Kimyasalların Reaksiyona Etkileri.....	55

3.10.3.	Optimum Sıcaklık.....	57
3.10.4.	Optimum pH.....	57
3.10.5.	Enzim Kararlılığı.....	58
3.10.6.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	59
3.10.7.	Kinetik İncelemeler.....	60
3.10.7.1.	<i>AfeIro</i> -WT Demir Oksidazı.....	60
3.10.7.2.	<i>AfeIro</i> -Q9F Demir Oksidazı.....	61
3.10.7.3.	<i>AfeIro</i> -S21Y/V22D Demir Oksidazı.....	62
3.11.	Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizlerle Doğrulanması.....	63
4.	TARTIŞMA.....	64
5.	SONUÇLAR.....	74
6.	ÖNERİLER.....	76
7.	KAYNAKLAR.....	77
8.	EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

Acidithiobacillus ferrooxidans M1 YABAN TİP ve MUTANT (Q9F ve S21Y/V22D) DEMİR
OKSİDAZLARININ BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Dilşat Nigar ÇOLAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2014, 88 Sayfa, 10 Ek Sayfa

Bu çalışmada, Espiye, Murgul ve Gümüşhane’de bulunan asidik su kaynaklarından su örnekleri alındı. Bu su örneklerinde asidofilik bakterilerin varlığı incelendi. Bu bölgelerden elde edilen 12 farklı izolatin 16S rRNA genlerine göre tür düzeyinde tanımlanması yapıldı. Buna göre izolatlardan beşinin *Acidithiobacillus*, üçünün *Acidiphilium* ve dördünün de *Acidocella* cinsine ait olduğu belirlendi.

Murgul bakır madeninden izole edilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşunun demir oksidaz proteinini kodlayan *iro* geni klonlanarak izole edildi ve baz dizilimi belirlendi. İzole edilen gen, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) suşu içerisinde yüksek miktarlarda üretildi. Demir oksidaz proteinine ait korunmuş bölgeler incelenerek, bölge özgün mutasyon yöntemiyle, klonlanan demir oksidaz üzerinde Q9F ve S21Y/V22D mutasyonları yapıldı. Yaban tip ve mutant enzimler saflaştırıldı ve karakterize edildi. Mutant enzimler yaban tip enzim ile biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri bakımından karşılaştırıldı. Yaban tip enzimin optimum pH’sı 4,0, optimum sıcaklığı 25°C, K_m ’si $0,27 \pm 0,09$ mM ve V_{max} ’ı ise $0,083 \pm 0,01$ μ mol/dk/mg protein olarak belirlendi. Yapılan mutasyonlar enzimin kinetik parametrelerinde önemli bir değişiklik meydana getirmezken, her iki mutantın optimum pH’sı da 3,5 olarak belirlendi. Ayrıca S21Y/V22D mutantında pH kararlılığının arttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Asidofilik, Demir oksidaz, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Bölge özgün mutasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF WILD TYPE and MUTANT (Q9F and S21Y/V22D) IRON OXIDASES ISOLATED FROM *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1

Dilşat Nigar ÇOLAK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Ali Osman BELDÜZ
2014, 88 Pages, 10 Appendix Pages

Acidophilic bacteria from Espiye, Murgul and Zigana has been isolated. Systematical analyses of twelve different isolates were carried out based on 16S rDNA gene sequences. According to 16S rDNA gene sequences, five of the isolates belong to the genus *Acidithiobacillus*, three of them belong to the genus *Acidiphilium* and four of them belong to the genus *Acidocella*.

iro gene coding the iron oxidase of *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 strain isolated from Murgul copper mine has been cloned and complete nucleotide sequence was revealed. The gene has been cloned into expression vector pET28(a)+ and overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3). Highly conserved amino acids are determined in iron oxidase and Q9F and S21Y/V22D mutations were performed with site directed mutagenesis techniques at cloned iron oxidase. Wild type and mutant enzymes are purified with HisLink Protein Purification Resin and characterized. Biochemical properties and kinetic parameters of the wild type and mutant enzymes were determined and compared. The wild type optimal temperature was 25°C and maximal activity was observed in pH 4.0. Its K_m and V_{max} value was calculated as $0,27 \pm 0,09$ mM and $0,083 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein respectively. The kinetic parameters of the mutant enzymes stayed unchanged. Nonetheless, the maximal activity of the mutant enzymes were moved to pH 3.5 and the pH stability of the S21Y/V22D have increased.

Key Words: Acidophilic, iron oxidase, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, site directed mutagenesis

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>A. ferrooxidans</i> 'ta RISC'ten oksijene kadar elektron taşınımı.....	22
Şekil 2. Doğada bulunan farklı demir-sülfür kümeleri.....	24
Şekil 3. <i>A. ferrooxidans</i> Iro proteininin genel yapısı.....	25
Şekil 4. α -phenanthrolin ile Fe(II) arasında gerçekleşen reaksiyon	26
Şekil 5. <i>A. ferrooxidans</i> ve diğer HiPIP proteinlerinin dizi benzerlikleri	28
Şekil 6. REIP_F1 primerinin içerdiği bölgeler.....	38
Şekil 7. Mutasyon primerlerinin <i>iro</i> geni üzerindeki dağılımı	42
Şekil 8. Iron salts (TK) besiyeri içerisinde bir haftalık inkübasyon sonucunda asidofilik bakterilerin gelişimi.....	48
Şekil 9. FeTSB besiyeri içerisinde asidofilik mikroorganizmaların gelişimi.....	48
Şekil 10. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinaz geni ile <i>A. ferrooxidans iro</i> geninin pET-28a(+) vektörü içerisinde SnapGene Viewer programı kullanılarak gösterilmesi	51
Şekil 11. <i>A. kestanbolensis</i> AC26 Sarı ribulokinazı ile ribulokinaz-Iro füzyon proteininin SDS-PAGE'de karşılaştırılması	51
Şekil 12. <i>A. ferrooxidans</i> M1 suşu yaban Iro proteini, Q9F mutanı ve S21Y/V22D mutantının SDS-PAGE analizi.....	52
Şekil 13. <i>A. ferrooxidans</i> (ATCC 23270) demir oksidaz (EC = 1.16.3) proteininin üç boyutlu yapısı	54
Şekil 14. Yaban ve mutant Iro proteinlerinde demir oksidaz aktivitesi	55
Şekil 15. Aktivite deneyinde kullanılan kimyasalların reaksiyona etkileri	56
Şekil 16. <i>AfeIro</i> -WT, <i>AfeIro</i> -Q9F ve <i>AfeIro</i> -S21Y/V22D demir oksidazlarının optimum sıcaklıkları	57
Şekil 17. <i>AfeIro</i> -WT, <i>AfeIro</i> -Q9F ve <i>AfeIro</i> -S21Y/V22D demir oksidazlarının optimum pH'ları	58
Şekil 18. <i>AfeIro</i> -WT, <i>AfeIro</i> -Q9F ve <i>AfeIro</i> -S21Y/V22D demir oksidazlarının kararlılığı	59
Şekil 19. İnhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri	60
Şekil 20. <i>AfeIro</i> -WT demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi.....	61
Şekil 21. <i>AfeIro</i> -Q9F demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi.....	62
Şekil 22. <i>AfeIro</i> -S21Y/V22D demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi.....	63
Şekil 23. Iro proteininde kısmen korunmuş olan amino asitler	68

Şekil 24. *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu yaban tip Iro proteininde
değiştirilen amino asitlerin açık formülleri 69

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. “İki tabakalı besiyeri”nde kullanılan mikroorganizmalar	10
Tablo 2. Asidofilik bakteriler ve arkeler.....	19
Tablo 3. Ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörünü, <i>iro</i> genini içerisine alabilecek şekilde değiştirmek için kullanılan primerler.....	38
Tablo 4. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler.....	41
Tablo 5. Asidik kaynaklardan alınan izolatların 16S rRNA gen dizilerine göre Genbank'ta bulunan bakterilere benzerlik oranları	49
Tablo 6. <i>A. ferrooxidans</i> M1 yaban tip ve mutant demir oksidaz enzimlerinin spektrofotometrede 512 nm dalga boyundaki ölçüm değerleri	56
Tablo 7. Yaban tip ve mutant enzimlerin sahip oldukları özellikler açısından karşılaştırılmaları	72

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	Amonyum peroksit sülfat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HiPIP	Yüksek potansiyelli demir sülfür proteini
HisTag	Histidin kuyruğu
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
Iro	Demir oksidaz proteini
kDa	Kilodalton
LB	Luria-bertoni broth
M	Molar
ml	Mililitre
mg	miligram
mM	Milimolar
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometre
ng	Nanonogram
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHP	Potasyum hidrojen phtalat
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
SDS- PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
V_{max}	Maksimum hız
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
μ g	Mikrogram
[4Fe-4S]	Demir sülfür kümesi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Madencilik, yer kabuğunda bulunan cevher, endüstriyel hammadde, kömür ve petrol gibi ekonomik değeri olan herhangi bir maddeyi yeryüzüne çıkarma ve bu maddeyi kullanılabilir hale dönüştürme işlemidir. Yenilenemeyen hammaddelere ve primer kaynaklara olan bağlılık, endüstrinin gelişimini sınırlandırmaktadır. Yeni teknolojiler vasıtası ile yeni kaynaklardan metallerin sağlanması gerekmektedir. Önceden var olan madencilik tekniklerinin geliştirilmesi ile günümüze kadar ekonomik bir değeri olmayan kaynaklardan metallerin ayrıştırılarak saf halde elde edilmesi sağlanabilmektedir. Geleneksel yöntemlerle değerlendirilemeyen cevherler, biyoliç yöntemleriyle değerlendirilebilmektedir (Bosecker, 1997; Brierley, 1978; Bryner vd., 1954; Torma ve Banhegyi, 1984). Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar metallerin suda çözünebilir formlarına dönüştürülmesine yardımcı olurlar. Mikrobiyal liç işlemlerinin uygulanması ile ikincil kaynaklar olarak tanımlanan endüstriyel atıklardan değerli metallerin kazanılması endüstriyel olarak mümkün olmaktadır (Brandl, 2001).

Antik çağlardan beri mikroorganizmalar ağır metallerin yer kabuğu üzerinde depolanmasında ve çözünmesinde önemli bir role sahiptir. Bu aktivitenin önemli bir kısmı demir ve sülfür döngüsü ile ilgilidir. Anaerobik sülfat indirgeyici bakteriler çeşitli metallerle reaksiyona girerek çözünmeyen sülfürlü minerallerin (Fe_2S_2 , ZnS , $CuFeS_2$ gibi) ve cevher yataklarının oluşmasını sağlarlar. Ters bir reaksiyonda bu sülfürlü mineraller, aerobik sülfür oksitleyici mikroorganizmalar için elektron vericisi olarak görev yapar ve metal sülfatlara dönüşürler. Metal sülfatların çoğunun çözünürlüğü yüksek olduğu için bu reaksiyon, maden ve mineral kaynaklarından metallerin kazanımında/uzaklaştırılmasında kullanılır. Çeşitli mikroorganizmaların madenlerdeki ağır metalleri çözünebilir hale getirebilme özellikleri biyo-madencilik endüstrisinin gelişimine yol açmıştır (Rawlings, 1997).

Genel olarak, metallerin ortamda doğal olarak bulunan belirli mikroorganizmalar vasıtası ile suda çözünür hale getirilmesi “biyoliç (bioleaching)” ya da mikroorganizmalar tarafından dönüştürülerek, bir sonraki ekstraksiyon işlemine hazırlanması “biyo-

oksidasyon (biooxidation)” olarak tanımlanır (Atlas ve Bartha, 1997) . “Biyoksidasyon” ve “biyoliç” çoğu zaman birbiri yerine kullanılır (Handsford ve Miller, 1993).

Sülfürlü minerallerin biyoliçi son yirmi yılda büyük ilerleme kaydetmiş ve günümüzde yerleşmiş bir biyoteknolojik uygulamaya dönüşmüştür. Bu teknik genellikle bakır, kobalt, nikel, çinko ve uranyum gibi madenlere uygulanır.

Biyoliç işleminde kullanılan bakterilerin biyolojisi oldukça karmaşıktır. 16S rDNA gen dizisi verilerindeki artışla, çok sayıda yeni bakteri tanımlanmış ve mevcut olan bazıları da yeniden sınıflandırılmıştır. Önceleri sadece mezofilik bakterilerin önemli olduğu düşünülürken, günümüzde termofilik bakteri ve ekstrem termofilik arkelerin de biyoliç işlemlerinde önemli olduğu belirlenmiştir (Johnson, 1998; Norris vd., 2000).

Biyoliçte kullanılan mikroorganizmaların birçok ortak fizyolojik özelliği vardır. Sülfürlü minerallerin biyoliçinde kullanılan tüm organizmalar kemolitotroftir ve elektron kaynağı olarak Fe^{+2} veya indirgenmiş inorganik sülfür kaynaklarını kullanırlar. Sülfür oksidasyonunun nihai ürünü sülfirik asit olduğu için bu organizmaların çoğu asidofiliktir ve pH 1,5-2,0 civarında optimum gelişme gösterirler. Biyoliç organizmaları elektron alıcısı olarak oksijen dışındaki maddeleri ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$) kullanmalarına karşın genellikle en iyi gelişmeyi yüksek oranda havalandırılmış çözeltilerde gösterirler.

Nötral pH civarında demir (Fe), Fe(II) ya da Fe(III) hidroksit formunda çökelir. Fe(III)'ün çözünürlüğü pH'nın azalması ile artar. pH'nın azalması aynı zamanda Fe(II)'nin kararlılığını da artırır. Asidik koşullarda Fe(II)-oksitleyici mikroorganizmaların biyokimyasal rolleri geniş çaplı olarak araştırılmıştır. Nötral pH'da mikrobiyal demir redoks döngüsü, hidromorfik toprak ve sedimentlerin jeokimyasını önemli ölçüde etkiler. Organik yapıların degradasyonunu, minerallerin çözünmesini, jeolojik olarak önemli minerallerin oluşumunu ve çeşitli anyon ve katyonların mobilizasyonunu ve immobilizasyonunu da sağlar (Baker ve Banfield, 2003; Chaudhuri vd., 2001; Lack vd., 2002).

Fe(II) ve Fe(III) arasındaki çevrim, modern çevresel biyokimyada temel bir role sahiptir ve muhtemelen yeryüzünün erken dönemlerinde de önemli bir biyokimyasal işlemdir. Mikroorganizmalar tarafından düzenlenen demir redoks reaksiyonları keşfedilmeden önce, bu işlemi abiyotik mekanizmaların yaptığı düşünülmekte idi. Ancak günümüzde birçok asidik çevrede demir redoks kimyasını mikroorganizmaların kontrol ettiği bilinmektedir. Bu işlemde, Fe(II) elektron kaynağı olarak kullanılır ve litotrofik Fe oksitleyici mikroorganizmaların hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda, biyokütlerdeki

karbonu özümleyebilmesi için uygun şartları oluşturur. Fe(III) ise, anaerobik şartlarda litotrofik ve heterotrofik Fe(III)-indirgeyici mikroorganizmalar için son elektron alıcısı olarak kullanılır.

Metal kazanımlarında mikroorganizmaların kullanımının geleneksel fizikokimyasal metotlara göre belirgin avantajları vardır. Biyoliç yöntemi çevre dostu bir yöntemdir. Kavurma ve ergitme metotlarında olduğu gibi sülfür dioksit gibi çevreye zararlı olan gazların salınımı olmaz. SO₂ asit yağmurlarına neden olan en önemli gazdır. Diğer taraftan biyoliçte kükürt sülfata dönüştüğü için bu tip bir kirliliğe rastlanmaz. Ek olarak, bu yeni yöntem, cevherin yer kabuğundan çıkarılma olan yerinde uygulanabilir. Örneğin bakır yer kabuğunun çok derinlerinden kolaylıkla çıkarılabilir. Metal türü ve jeolojik özelliklere bağlı olarak, metallerin ayrıştırılması doğal ortamlarında gerçekleştirilebilir. Bu işlemde mikroorganizmalar kullanılarak oluşturulan biyoliç solusyonları kullanılır. Bu yöntem hem daha ucuzdur hem de çevreye daha az zarar verir (Rawlings, 2002). Biyoliç yönteminin en önemli avantajı diğer geleneksel yöntemlerle işletilemeyen düşük tonörlü cevher yataklarının değerlendirilebilmesidir.

1.2. Biyo-madenciliğin Gelişimi

Günümüzde birçok mineral ve metalin işlenmesi temelde yüzlerce yıl önceki şekli ile aynıdır. Hammaddeler yer kabuğundan çıkarılır, hazırlanır ve pirometalurjik ve/veya hidrometalurjik yöntemlerle metaller ayrıştırılır.

Biyo-madenciliğin kökeni çok eski zamanlara dayanır, ancak eski dönemlerde yapılan hidrometalurjik işlemlerde mikroorganizmaların rolü bilinmemekteydi. Esas olarak bakır çıkarılması işleminde mikroorganizmalar antik çağlardan beri kullanılmaktadır. Rio Tinto madeninde çok eski zamanlarda dahi mikroorganizmaların kullanıldığı bilinmektedir ancak bu organizmaların nasıl aktivite gösterdiği 1900'lü yıllara kadar aydınlatılamamıştır. İspanya'nın güneyinde bulunan Sevilla'daki Rio Tinto madeninde, Roma öncesi dönemde gümüş, Roma döneminde de bakır çıkarılmaktaydı. Rio Tinto, Kırmızı Nehir anlamına gelmektedir ve yüksek Fe(III) konsantrasyonundan dolayı suyu kırmızı renktedir. Nehirde bulunan çözülmüş Fe(III) ve bakır, mikroorganizmaların katkısı sonucu oluşmaktadır. Romalılar "sementasyon" işlemiyle ($Fe + Cu^{+2} \rightarrow Cu + Fe^{+2}$) çözülmüş bakır üzerine Fe ilave ettiklerinde bakır katı halde çöker, sonra bu bakır pirometalurjik yöntemlerle (ergitme) saflaştırılırdı. Bu işlem küçük bazı modifikasyonlarla günümüze kadar gelmiştir,

mikroorganizmaların bu işlemdeki rolü ise 1900'lü yıllarda ortaya çıkarılmıştır (Smith, 2005).

Mineral kaynaklardan metallerin ayrıştırılmasına dair oldukça eski tarihsel kayıtlar olmasına (Rossi, 1990; Ehrlich, 1999) ve indirgenmiş sülfür bileşiklerinin ve elemental sülfürün oksidasyonundan sülfirik asit oluşumunun 1880'lerde biliniyor olmasına rağmen (Winogradsky, 1887), metal sülfürlerin oksidasyonu ancak 1922 yılında, çinko sülfürden (sfalerit) çinkonun ayrıştırılması ile tanımlanmıştır (Rudolfs, 1922; Helbronner ve Rudolfs, 1922). Sfaleritin, çinko sülfata dönüşümünün mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu bilgilere dayanarak 1947 yılında çinko, çeşitli rezervlerden biyolojik metotlarla çıkarılmıştır. Bu metotta rolü olan mikroorganizmanın *Thiobacillus ferrooxidans* olduğu belirlenmiştir. İlk patent 1958 yılında alınmıştır (Zimmerley vd., 1958). Bu patente göre metal ekstraksiyonu için $Fe_2(SO_4)_3$ / sülfirik asit karışımı olan bir çözelti döngüsel olarak kullanılır. Çözeltideki Fe(III), ekstraksiyon sırasında Fe(II)'e dönüşür. Bu Fe(II) demir oksitleyici mikroorganizmalar tarafından oksijenli ortamda tekrar Fe(III)'e dönüştürülür ve liç reaktifi yerinde üretilir (Brandl, 2001).

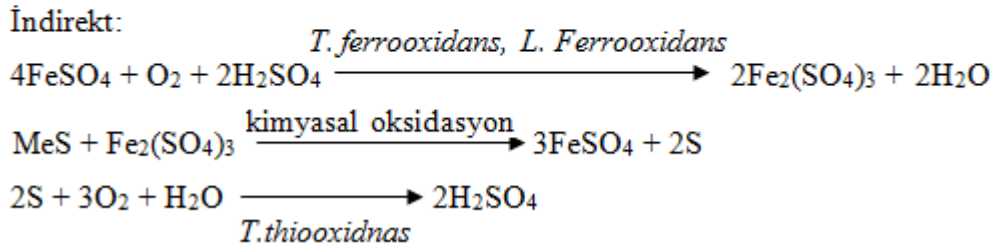
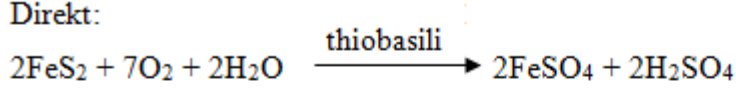
1.3. Biyoliç Prensipleri

Mikroorganizmalar metalleri; (1) organik ve inorganik asit oluşumu ile; (2) oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile ve (3) kompleks ajanların oluşumu ile mobilize ederler. Sülfirik asit, biyoliç ortamında bulunan temel inorganik asittir. Bu asit *Thiobacillus sp.* gibi sülfür oksitleyici mikroorganizmalar tarafından oluşturulur.

Mikroorganizmalar tarafından metallerin çözünmesini açıklayan iki mekanizma ortaya atılmıştır (Silverman ve Ehrlich, 1964; Ewart ve Hughes, 1991). (1) Mikroorganizmalar metal sülfürleri "direkt" olarak oksitler, metabolize eder. Direkt mekanizmaya göre hücreler mineral yüzeye tutunur. Hücrelerin mineral tanelerine/yüzeylerine tutunması birkaç dakika veya birkaç saat içerisinde gerçekleşir. Hücreler tutunmak için mineral yüzeyindeki aktif alanları tercih ederler (Ewart ve Hughes, 1991; Edwards vd., 1999). (2) İndirgenmiş metallerin "indirekt" mekanizma ile oksidasyonu Fe(III) tarafından kontrol edilir. Fe(III), sülfürlü mineraller için iyi bir oksitleyicidir (indirgeme potansiyeli 0,77 volt) ve ortamdaki Fe(II)'nin mikrobiyal

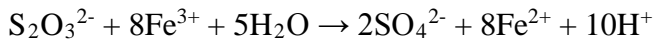
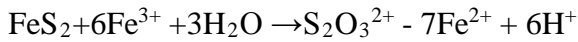
oksidasyonu ile oluşur. (Ewart ve Hughes, 1991) . Bu durumda, demir elektron taşıyıcısı görevi görür.

Piritin “direkt” ve “indirekt” mekanizmalar ile oksitlenmesi aşağıda gösterilmiştir (Murr, 1980; Schippers ve Sand, 1999).

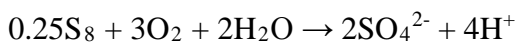
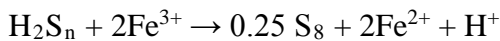
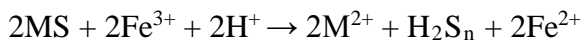


Günümüzde “direkt” modelin doğruluğu tartışmalıdır. Bu nedenle “indirekt” mekanizmaya dayanan yeni bir model ortaya atılmıştır (Schippers ve Sand, 1999). Bütün faktörler bir araya getirilmiş ve yeni model şu şekilde karakterize edilmiştir: (1) hücreler minerallere tutunur ve yüzeyle fiziksel bağlantı kurar; (2) hücreler ekzopolimer bir tabaka salgılar; (3) bu ekzopolimerik hücre kılıfı glukuronik asit ile kompleks oluşturmuş Fe(III) bileşikleri içerir; (4) sülfürlü bileşiklerin oksidasyonu sırasında thiosülfat oluşur; (5) hücre kılıfı veya periplazmik alanda, sülfür veya polithionat granülleri oluşur (Brandl, 2001). Aşağıdaki eşitlik oksidasyon mekanizmasının özetidir (Schippers ve Sand, 1999):

Thiosülfat mekanizması (FeS_2 , MoS_2 , WS_2):



Polisülfid mekanizması (PbS , CuFeS_2 , ZnS , MnS_2 , As_2S_3 , As_3S_4):



1.4. Asidofilik Mikroorganizmalar

Biyo-madencilikte ticari olarak kullanılabilceği düşünölen mikroorganizmaların sayısı giderek artmaktadır. Bu artışın nedenleri; çevrenin daha çok taranması ve en önemlisi bu organizmaları tanımlayabilmek için yeni tekniklerin geliştirilmesidir. Asidofilik kemolitotrofların incelenmesinde çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu bakterileri katı besiyeri ortamında çoğaltmak oldukça zordur. Katı besiyerinde katılaştırıcı ajan olarak kullanılan agar veya agarozdaki çok az miktarda bulunan şeker bile bu mikroorganizmaların gelişimini inhibe eder (Tuovinen vd., 1971). Yüksek oranda saflaştırılmış agar kullanmak bile yeterli olamayabilmektedir; çünkü asit hidrolizi sırasında ortaya çıkan az miktardaki şeker, hücrenin gelişimini engeller. Bazı alternatif katılaştırıcı ajanlar kısmen kullanılabilmesine rağmen, yine de asidofilik mikroorganizmaların katı ortamlarda yetiştirilmesi kolay değildir.

Günümüzde polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanılması ile asidofilik mikroorganizmaların tanımlanması kolaylaşmıştır. Madenlerde bulunan örneklerden kültivasyon yapmadan, total DNA izolasyonu yapılması ve bu DNA'ların 16S rRNA'larının PCR vasıtası ile analiz edilmesi sonucunda bu mikroorganizmalar tanımlanabilmektedir (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

PCR tekniğindeki gelişmelerden sonra biyoliç ortamında çok çeşitli mikroorganizmaların bulunduğu belirlenmiştir. Ekstrem çevresel şartlara rağmen (düşük pH değeri, yüksek metal konsantrasyonu gibi), maden ortamlarında çok çeşitli bakteri, mantar ve alg türlerine rastlanmıştır (Lopez-Archilla vd., 1993). Örneğin bir bakır madeninde; bakteri, maya, kamçılılar, amip ve protozoonar mikrobiyal çevreyi oluşturmaktadır (Erlich, 1963). Bu organizmalar çevrede homojen bir dağılım göstermezler ve aralarında sinerji, mutualizm, yarış ve birbirini avlama gibi mikrobiyal etkileşimler meydana gelir (Amaro vd., 1992; De Wulf-Durand vd., 1997; Ehrlich, 1997; Johnson, 1998; Edwards vd., 1999; Brandl, 2001).

Ekstrem asidik ortamlarda aktif olan prokaryotik mikroorganizmalar, bakteri ve Arke domainleri içerisinde dağılım gösterir. Asidofiller; sıcaklık (mezofil, orta derecede termofil ve yüksek termofil), optimum pH ve temel karbon kaynakları (ototroflar CO₂'yi kullanır, heterotroflar organik karbonu kullanırken, miksotroflar her ikisini de kullanır) gibi farklı kriterler kullanılarak gruplara ayrılır. Genellikle, ekstrem termofilik asidofiller arke

grubunda yer alır. Termo-asidofilik prokaryotlar genellikle jeotermal alanlarda ve fosil yakıtların bulunduğu bölgelerde yayılış gösterirler.

Asidofilik mikroorganizmaları ayırt etmeye yarayan bir diğer özellik mineralleri çözünür hale getirme yetenekleridir. Bazı asidofilikler, mineralleri oksidasyon yolu ile çözerken bazıları redüksiyon mekanizmasını kullanırlar. Pirit gibi bazı mineraller *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidimicrobium ferrooxidans* ve *Sulfolobus metallicus* gibi prokaryotlar tarafından çözünür. Cu_2S gibi bazı mineraller ise asidik ortamda çözünür ve *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ve *Metallosphaera sedula* gibi sülfürik asit oluşturan prokaryotlar tarafından ticari olarak kullanılabilir forma dönüştürülür (Johnson ve Hallberg, 2003).

Jarosit ve goethit (sulu demir-oksit minerali) gibi Fe(III) içeren mineraller ise redüksiyon mekanizması ile çözünür hale getirilir ve bu işlemde demir-indirgeyici mikroorganizmalar görev alır. Bu grupta *Acidiphilium* spp. gibi heterotrofik mezofilik bakteriler ve *Sulfobacillus* spp. gibi ılımlı termofiller yer alır. Heterotrofik mezofilik bakteriler Fe(II)'yi oksitleyemezken, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* ve ılımlı termofiller çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak hem Fe(II)'yi oksitleyebilir hem de Fe(III)'ü indirgeyebilirler (Bridge ve Johnson, 1998; 2000). Esasen oksijen yakıldığında Fe^{+3} son elektron alıcısıdır. Diğer asidofilik mikroorganizmalar minerallerin ayrışmasında direkt bir role sahip değildir. Bazı heterotrofik prokaryotlar (*Acidocella* ve *Thermoplasma*) demir ve sülfür-oksitleyici mikroorganizmalarla kommensal ilişkiler kurarak liç işlemine yardımcı olurlar. Bu mikroorganizmalar ortamdaki organik bileşikleri tüketerek “detoksifikasyon” yaparlar (Johnson, 1998).

1.5. Asidofilik Mikroorganizmaların Habitatları

Asidofilik mikroorganizmaların habitatları genellikle ‘ekstrem asidik çevreler’ olarak isimlendirilir. Bu çevrelerin pH'sı genellikle 3.0 ve altıdır. Ekstrem asidik ortamlar doğal olarak oluşmakla beraber son yıllarda endüstrinin gelişimi ile beraber endüstriyel atıklar nedeni ile yapay olarak da oluşabilmektedir. Özellikle maden endüstrisinin gelişimi ile bu tip ortamlarının yaygınlığı artmıştır.

Çeşitli mikrobiyal aktiviteler ortamın asiditesinin artışı sağlar. Fermantasyon ve nitrifikasyon sırasında organik asitlerin oluşumu pH değerini düşürür. Ancak ekstrem

asidofilik çevrelerin oluşumunun en önemli etkeni elemental sülfür, indirgenmiş sülfür bileşikleri ve piritin oksidasyonu sırasında ortaya çıkan asittir. Sülfürün ototrofik ve heterotrofik bakteriler tarafından oksitlenmesi ile sülfürik asit oluşur. Birçok metal doğada sülfid halinde bulunur. Sülfürlü mineraller ticari öneme sahip bakır, çinko ve kurşun gibi birçok metalin mineral formudur. En yaygın olarak bulunan sülfürlü mineral (FeS_2)'dir ve genellikle diğer metal sülfürler ile bir arada bulunur ve madenlerin işlenmesi sırasında atık materyallerin oluşumuna neden olur.

Ekstrem asidik çevrelerin diğer bir önemli fiziko-kimyasal özelliği, içerisindeki çözülmüş metal konsantrasyonunun nötral pH'lı ortamlara göre daha fazla oluşudur. Belirli bir ortamda bulunan ağır metallerin tipi ve konsantrasyonu jeokimyasal özelliklere bağlıdır. Bu metaller direkt sülfür minerallerinin oksidasyonu ile oluşabileceği gibi, belirli minerallerin alterasyonu sonucu da oluşabilmektedir (Johnson, 1998).

Ekstrem asidik ortamlar çoğunlukla düşük konsantrasyonda çözülmüş organik karbona ($<20 \text{ mg l}^{-1}$) sahiptir ve bu nedenle oligotrofik olarak sınıflandırılır. Bu ortamlarda enerji genellikle Fe(II) ve indirgenmiş sülfür bileşiklerinden sağlanır. Kemolitotrofik asidofiller, bu ortamlarda en yaygın olarak bulunan canlılardır.

1.6. Asidofilik Mikroorganizmaların Tanımlanmasında Kullanılan Bazı Teknikler

Biyoliç işlemleri büyük oranda, ortamda bulunan asidofilik bakterilerin varlığına ve hayatta kalabilme özelliklerine bağlı olduğundan, bu organizmaların hızlı, güvenilir ve etkili bir şekilde tanımlanması oldukça önemlidir. Günümüzde klasik metotlar kullanılarak asidofilik organizmaların varlığı belirlenebilmektedir. Klasik metotlar arasında mikroskopik belirleme, kültür bağımlı tanımlama ve indirekt metotlar sayılabilir.

1.6.1. Mikroskoba Dayalı Yaklaşımlar

Mineral oksitleyici mikroorganizmalar ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak gözlemlenebilir. Faz-kontrast mikroskobu canlı organizmaların gözlenmesini sağlamaktadır. Bazı asidofilik mikroorganizmalar çok hareketli olmaları ve farklı morfolojiye (virgül veya spiral şekilli; örn *Leptospirillum* spp.) sahip olmaları nedeniyle faz-kontrast mikroskopunda tanımlanabilmektedir. Endospor oluşturan *Sulfobacillus* spp.

gibi bakteriler de bu yolla belirlenebilir. Endosporlar hücre içerisinde, parlak yoğun cisimcikler olarak görülür. Mikroskopik yolla bakterilerin ortamdaki sayısı da hesaplanabilmektedir.

Mikroskopik incelemelerdeki en önemli problem, asidofilik organizmaların ortamda bulunan mineral parçacıklarından ayırt edilmesindeki güçlüklerdir. Fe(III) bileşikleri en çok sıkıntıya neden olan bileşiklerdir. Amorf ve kristal yapıdaki Fe(III) bileşiklerini ortamdan uzaklaştırmak için okzalik asit kullanılabilir. Ancak bu asit incelenecek olan bakterilere de zarar verebilir. Katı ortamlara tutunmuş olan mikroorganizmaların mikroskopik incelenmesi de oldukça zordur. (Rawlings ve Johnson, 2007; Cotoras ve Viedma, 2011).

1.6.2. Kültivasyona Dayalı Yaklaşımlar

Kültivasyona bağlı tanımlamalar, sadece belirli mikroorganizmaların geliştirilmesini sağlayan farklı özelliklere sahip besiyerleri kullanılarak yapılmaktadır. Ancak mineral-biyoliç ortamında bulunan mikroorganizmaların bazıları laboratuvar ortamında *in vitro* olarak büyütülememektedir. Yine de biyoliç işleminde en yaygın olarak kullanılan asidofilik bakteriler, hem sıvı hem de katı besiyerinde büyütülebilir.

Kültivasyon işleminde hedef mikroorganizmanın varlığını belirleyebilmek için özel besiyerleri oluşturulmuştur. Ayrıca sıcaklık, pH ve oksijen konsantrasyonu da hedef mikroorganizmaya bağlı olarak belirlenir. Çok çeşitli ayırt edici besiyerlerinin varlığına rağmen, bu besiyerleri ayırıda her zaman yeterli olmaz. Örneğin, demir-oksitleyici kemolitotroflar için geniş bir kullanım alanına sahip olan demir-sülfat sıvı besiyerinde hem *Acidithiobacillus ferrooxidans* hem de *Leptospirillum* spp. rahatlıkla büyüyebilir ancak *A. ferrooxidans* daha hızlı büyüdüğü için bu ortamda birincil olarak tanımlanan organizma *A. ferrooxidans* olur. Diğer yandan, katı besiyerinin kullanımı ile bu dezavantaj ortadan kaldırılabilir.

Uzun yıllar boyunca demir ve sülfür-oksitleyici asidofillerin katı besiyerinde büyütülmesinin çok zor veya imkansız olduğu düşünülmüştür. Bunun nedeni agar ve agaroz gibi katılaştırıcı ajanlarda bulunan organik bileşiklerin, asidofillerin gelişimini inhibe etmesidir (Tuovinen ve Kelly 1973). Ancak “iki tabakalı besiyeri” ile bu sorunun da üstesinden gelinmiştir (Johnson ve McGinness, 1991; Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003; Johnson vd., 2005). Bu yöntemde, katılaştırıcı ajanlarda bulunan toksik maddelerle

birlikte inkübasyon sırasında asit hidrolizi ile ortaya çıkan toksik materyaller de heterotrofik asidofilik bakteriler vasıtası ile ortadan kaldırılır. İnkübasyon petrisi iki aşamada hazırlanır. İlk olarak petrinin dip kısmına kullanılacak olan besiyerinden dökülür ve bu tabakaya heterotrofik asidofilik bir bakteri ekilir (örneğin; *Acidiphilium cryptum*). Daha sonra bu tabakanın üzerine yine aynı besiyerinden dökülür ve buraya ilgilenilen asidofilik bakterilerin ekimi yapılır. İnkübasyon sırasında heterotrofik bakteriler, kemolitotrofik mikroorganizmalar için toksik olan organik bileşikleri parçalayarak bu organizmaların da üst tabakada gelişebilmesini sağlar (Johnson, 1995). Farklı asidofilleri ve mineral-oksitleyicileri belirleyebilmek amacıyla çok çeşitli iki tabakalı besiyeriler geliştirilmiştir (Tablo 1).

İki tabakalı besiyeri kullanımı, mineral-oksitleyici bakterilerin ve diğer asidofillerin belirlenmesinde oldukça avantajlıdır. Öncelikle ortamda bulunan bütün bakterilerin gelişimini sağlar, zayıf gelişim gösteren mikroorganizmalar elimine olmaz. Bunun yanında, asidofilik mikroorganizmalar çok farklı koloni morfolojilerine sahiptir. Koloni büyüklüğü ve morfoloji aynı türün suşları arasında bile farklılık gösterebilir. Bu yüzden katı besiyerinde koloni oluşumu ile kolaylıkla ayırt edilebilirler (Johnson vd., 2005). Örneğin, demir-oksitleyici izolatların oluşturduğu kolonilerde Fe(III) bileşiklerinin birikimi görülür ve koloni pas benzeri bir yapı kazanır.

Tablo 1. “İki tabakalı besiyeri”nde kullanılan mikroorganizmalar

Alt tabakada kullanılan mikroorganizma	Enerji kaynağı	pH	Hedef izolatlar
<i>Acidiphilium cryptum</i> (SJH suşu)	Fe(II)	~2.5	Zor gelişen demir-oksitleyiciler
	Fe(II)/TSB	~2.5	Demir-oksitleyiciler (ve bazı heterotroflar)
	Fe(II)/Tetrathionat/TSB	~2.5	Demir-oksitleyiciler ve sülfür-oksitleyiciler (ve bazı heterotroflar)
	Fe(II)/Thiosülfat/TSB	~4.0	İlımlı asidofilik demir-oksitleyiciler, sülfür-oksitleyiciler ve heterotroflar
<i>Acidocella aromatica</i> (PFBC suşu)	Maya ekstraktı	~3.0	Ekstrem asidofilik heterotroflar
	Maya ekstraktı	~4.0	İlımlı asidofilik heterotroflar

1.6.3. Moleküler Teknikler

Bakterilerin tanımlanmasında organizmaların morfolojileri ve fizyolojileri gibi fenotipik özellikleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu özellikler birbirine çok yakın olan organizmaların ayırımında yeterli olamayabilirler. 1960'lı yıllarda DNA'nın kalıtım ve protein sentezi üzerindeki rolünün anlaşılmasıyla, sınıflandırma çalışmalarında moleküler tekniklerin morfolojik tekniklerden daha başarılı olabileceği düşünülmüştür. Nükleik asitler tüm bakterilerde bulunur ve bu bakteriler üzerinde geniş çaplı karşılaştırmaları sağlar (Logan, 1994). Ayrıca genetik materyalin çevresel şartlardan etkilenmemesi ve evrimsel yayılış göstermesi daha doğru ve kesin bir sınıflandırmanın yapılmasını sağlar (Vandamme vd., 1996).

Moleküler biyolojideki tekniklerin gelişimi ile mikrobiyal ekolojide de önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Günümüzde, kültürasyon yapılmadan, mikroorganizmaların doğal habitatlarından DNA'ları izole edilerek tanımlanmaları yapılabilmektedir (Hugenholtz vd., 1998). En yaygın olarak kullanılan moleküler teknik 16S rRNA dizin analizidir. Bunun yanında 16S-23S rRNA genleri arasındaki "spacer" bölgeler ve ARDRA analizleri de asidofilik bakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır (Rawlings ve Johnson, 2007).

1.6.3.1. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması

Son yıllarda 16S rRNA molekülünün bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde oldukça önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Organizmaları sınıflandırmak için kullanılan bu yöntem ilk kez Woese ve arkadaşları tarafından (1987) uygulanmıştır. 16S rDNA geni ribozomların yapı ve fonksiyonunda hayati rol oynayan 16S rRNA molekülünü kodlar ve bu nedenle bütün canlı organizmalarda bulunur. Bununla birlikte, hem bütün organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş 8 adet değişmeyen bölgeye, hem de 9 adet benzersiz ve değişken bölgeye sahiptir (Gray vd., 1984). Bu değişken bölgeler organizmaların filogenetik ilişkilerini belirlemede sıklıkla kullanılır. 16S rDNA dizilerine uygun olarak dizayn edilen primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmıştır. PCR ile çoğaltılan 16S rDNA baz dizilerininin karşılaştırılması ile türler arasındaki akrabalık dereceleri belirlenebilmektedir.

Stackebrandt ve Goebel (1994) tarafından yapılan bir çalışmada; 16S rRNA baz dizileri %97'den daha az benzerlik gösteren suşların, farklı türlere ait olduğu ortaya konmuştur.

1.6.3.2. 16S-23S rRNA Genleri Arasındaki “Spacer” Bölgeler

16S-23S rRNA genleri arasında bulunan “spacer” bölgeler bakterileri cins, tür ve alt tür seviyesinde tanımlamada sıklıkla kullanılan araçlardır. Bu bölgeler uzunluğu ve baz dizilimi bakımından türler arasında yüksek oranda çeşitlilik gösterir (Jensen vd., 1993).

Ribozomal RNA genleri bakterilerde, rRNA operonu (*rrn*) üzerinde 16S, 23S ve 5S rRNA sırası ile bulunurlar. 16S-23S genleri ve 23S-5S genleri arasında intergenik kopyalanan “spacer” bölgeler bulunur. Bu bölgeler sırası ile ITS 1 ve ITS 2 adını alır. ITS 1 bölgesi, tRNA genlerini ($tRNA^{Glu}$ veya $tRNA^{Ala}$ veya her ikisi birden) ve *rrn*'in transkripsiyonunu düzenleyen ve yöneten bölgeleri içerir. rRNA operonlarının sayısı bakterilerde 1-10 arasında değişiklik gösterir. Bu operonların uzunluğu ve baz dizilimi aynı genom üzerindeki farklı bölgelerde değişiklik gösterdiği gibi farklı türler arasında da farklılıklar gösterir (Condon vd., 1995; Gürtler, 1996; Naimi vd., 1997; Iteman vd., 2000). Organizmada fonksiyonel olan tRNA dizileri iyi bir şekilde korunurken, herhangi bir fonksiyona sahip olmayan dizilerde sürekli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle fonksiyonel olmayan bölgeler yakın ilişkili türler arasında dahi yüksek farklılıklar göstermektedir (Nguimbi vd., 2003).

1.6.3.3. 16S rDNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA)

Restriksiyon enzimleri (Restriksiyon endonükleazlar) DNA'yı spesifik bölgelerden tanıyarak kesen enzimlerdir (Dowling vd., 1990). Bu enzimler yardımıyla, PCR ile çoğaltılan 16S rDNA geni belirli bölgelerden kesilerek çift zincirli parçacıklar elde edilir. Biyokimyasal özelliklerine göre restriksiyon enzimleri Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV olmak üzere dört farklı gruba ayrılır. Genomik DNA analizleri ve genetik mühendisliğinde genellikle Tip II endonükleazlar kullanılmaktadır. Tipik bir restriksiyon bölgesi genellikle 4-6 baz çiftinden oluşur. Bazı DNA molekülleri belirli bir enzim için çok sayıda restriksiyon bölgesi içerirken bazıları bu bölgeleri taşımaz. 16S rDNA restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde, restriksiyon bölgelerinin birbirine olan uzaklığına bağlı olarak

farklı uzunlukta DNA parçaları oluşur. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu elde edilen fragmentler kullanılarak “DNA parmak izleri” oluşturulur. Bu parmak izlerinin karşılaştırılması sonucunda tür içerisindeki benzer gruplar ortaya çıkarılabilmektedir (Palleroni, 1993).

1.6.3.4. PCR’a Dayalı Yöntemler

PCR tekniği 1985 yılında Kerry B. Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik basit ve oldukça verimli olması nedeniyle birçok filogenetik yöntemin temel taşı olmuştur (Giovannoni, 1991). PCR ile oluşturulan parmak izleri bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve genetik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

1.6.3.4.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA tekniği, PCR teknikleri içerisinde en basit olanıdır. İlk olarak Williams ve arkadaşları (1990) tarafından insan DNA örnekleri üzerinde çalışılırken kullanılmıştır. Bu teknikte genom üzerinde rastgele bölgeler PCR tekniği ile çoğaltılır. 10 baz çiftlik spesifik olmayan primerler genomik DNA üzerinde rastgele bölgelere bağlanır. PCR sonucunda genomik DNA’dan farklı uzunluklara sahip 3-10 arasında farklı DNA parçaları üretilir (Wolfe ve Liston, 1998; Andersen, 2000). Eğer primerin bağlanma bölgesinde bir mutasyon meydana gelmişse RAPD sonucunda elde edilen fragmentlerin uzunluğu da farklı olacaktır. Bu nedenle genomik varyasyonları ölçmek için RAPD analizleri basit ve güvenilir bir metod sağlar.

RAPD tekniğinin diğer genetik analiz yöntemlerine göre birçok avantajı vardır. Bunlardan bazıları genel primerlerin kullanılması, prob izolasyonu gibi ön çalışmaların veya nükleotid dizin analizinin gerekmemesidir (Williams vd., 1990). Kolaylığı ve sadeliği nedeniyle bu teknik gen haritalarının oluşturulması, DNA parmak izi analizleri ve populasyon genetiğinde yaygın olarak kullanılır.

1.6.3.4.2. Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR)

Gram negatif bakterilerin çoğunda ve birçok gram pozitif bakteride, genom üzerinde çok sayıda kopyası bulunan, yüksek oranda korunmuş, tekrarlanan diziler doğal olarak bulunur. Rep-PCR tekniğinde bu tekrarlanan bölgelere uygun primerler hazırlanarak DNA'nın çoğaltılması amaçlanır (Lupski ve Weinstock, 1992). Genom üzerinde bulunan tekrar diziler üç sınıfa ayrılır. Bunlar: 35-40 bp'lik tekrarlanan "ekstrajenik palindromik" (REP) diziler, 124-127 bp'lik enterobakteriyal tekrarlanan "interjenik" korunmuş (ERIC) diziler ve 154 bp'lik BOX elementleridir (Versalovic vd., 1994). Bu diziler genom üzerinde farklı interjenik bölgelerde bulunurlar ve her iki oryantasyonda da bulunabilirler. Oligonükleotid primerler PCR sırasında REP ve ERIC bölgelerinin ters çevrilmiş dizilerinin dış kısmından ve BOX bölgesinin boxA alt ünitesinden PCR'ı başlatırlar. Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementleri arasında bulunan farklı genomik bölgelerin çoğaltılması sağlanır. Çoğaltılmış DNA parçacıkları jelde yürütülerek organizmaya ait rep-PCR genomik parmak izi profili elde edilir (Versalovic vd., 1994). Rep-PCR tekniği ile bakterilerden elde edilen genomik DNA parmak izleri cins, tür ve alt tür seviyesinde farklılıkların ortaya çıkarılmasını sağlar. Bu teknik farklılıkların belirlenmesinin yanı sıra bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında da yaygın olarak kullanılan bir metoddur (Van Berkum vd., 1994; Louws vd., 1996; Versalovic vd., 1996).

1.6.3.4.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA parçacıklarının rastgele çoğaltılması ile yüksek çeşitliliğe sahip DNA profillerinin oluşumunu sağlar (Vos vd., 1995). Bu teknik çok sayıda DNA işaretçi bölgeleri içeren gen haritalarının oluşturulmasında sıklıkla kullanılır. Bu yöntemde bakteri DNA'sı iki farklı restriksiyon enzimiyle kesilir ve oluşan parçacıklar spesifik adaptörlere bağlanır. Bu spesifik adaptörler hem restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini hem de PCR primerlerinin bağlanacağı bölgeleri içerirler. Restriksiyon dizilerine ve adaptöre bağlanma yeteneğindeki primerler kullanılarak DNA parçacıkları çoğaltılır. Bununla beraber, bütün restriksiyon parçacıkları çoğaltılmaz çünkü AFLP primerleri 3' ucunda seçici nükleotidler içerirler. Bu seçici dizilere sahip primerler genomik restriksiyon parçalarının sadece bir

altkümesinin çoğaltılmasını sağlarlar (Lin vd., 1996; Janssen vd., 1996). AFLP sonucu oluşturulan parmak izleri yüksek polimorfizm gösterdiği için aynı türe ait suşlar arasındaki farklılığı belirlemede oldukça önemlidir (Rademaker vd., 2000; Duim vd., 2001).

1.7. Biyoliç İşlemlerinde Ticari Öneme Sahip Mikroorganizmalar

Uzun yıllar boyunca *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın, biyoliç işlemlerinde en önemli rolü oynayan mikroorganizma olduğu düşünülmekteydi. Moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemelerden sonra çok sayıda asidofilik mikroorganizmanın bu işlemi yapabildiği belirlenmiştir (Tablo 2). Asidik ortamlarda en iyi bilinen mikroorganizma *A. ferrooxidans* olmasına rağmen, bu organizmanın dominant olduğu düşünülmemelidir. Özel çevresel koşullarda *Leptospirillum* sp. daha yaygın olarak bulunabilmektedir (Sand, 1992; Schrenk vd., 1998).

1.7.1. *Acidithiobacillus*

Bu cinse ait olan bakteriler önceleri *Thiobacillus* olarak isimlendirilmekteydi. 16S rRNA dizin analizleri sonucunda *Thiobacillus* cinsinin, Proteobakterilerin α -, β -, ve γ - alt gruplarında yer alan sülfür-oksitleyici bakterileri içerdiği belirlenmiştir. Bu anormalliği çözmek için *Thiobacillus* cinsi bölünmüş ve yüksek asidofilik organizmalar, *Acidithiobacillus* cinsi içerisine aktarılmıştır (Kelly ve Wood, 2000). Günümüzde bu cinse ait 6 tür bulunmaktadır. Bunlar; *A. thiooxidans* (Waksman ve Joffe, 1922; Kelly ve Wood, 2000), *A. albertensis* (Bryant vd., 1988; Kelly ve Wood, 2000), *A. caldus* (Hallberg ve Lindström, 1995; Kelly ve Wood 2000), *A. ferrooxidans* (Temple ve Colmer, 1951; Kelly ve Wood, 2000), *A. ferrivorans* (Hallberg vd., 2010) ve *A. ferridurans* (Hedrich ve Johnson, 2013)'dır. Bu bakteriler birçok asidik ortamda gelişme gösterebilmektedirler.

A. ferrooxidans

Mineralleri oksitlediği keşfedilen ilk bakteri *A. ferrooxidans*'tır (Colmer ve Hinkel, 1947). GC molar konsantrasyonu %57-59 arasındadır (Harrison, 1982). Tipik *A. ferrooxidans* izolatları zorunlu ototroftur. Çubuk şeklinde olan bu bakteri genelde tek tek ya da çift halinde bulunur. Spor oluşturmaz, gram negatif ve hareketlidir (Murr, 1980;

Leduc ve Ferroni, 1994; Horan, 1999). Karbon kaynağı olarak CO₂ kullanılır, Fe(II) ve S⁰/S oksitlenir. Nitrojen kaynağı olarak amonyum kullanılır. *A. ferrooxidans* aerobik bir mikroorganizma olarak tanımlanmasına rağmen, elemental sülfür veya metal sülfürlerin bulunduğu ortamlarda, Fe(III)'ü elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle oksijensiz olarak da büyüebilmektedir (Pronk vd., 1992; Donati vd., 1997).

Biyomadencilikte yıllarca 40 °C ve altındaki sıcaklıklarda kullanılan en önemli mikroorganizma *A. ferrooxidans* olmuştur. Günümüzde düşük pH, yüksek sıcaklık ve yüksek Fe(III) konsantrasyonlarında *A. ferrooxidans*'ın baskın olmadığı anlaşılmıştır (Rawlings vd., 1999). Yine de, Fe(II) konsantrasyonunun yüksek olduğu (≥ 5 g/l) uranyum ve bakır oksit/sülfid liç ortamlarında *A. ferrooxidans* dominant organizma olabilmektedir (Pizarro vd., 1996). *A. ferrooxidans* diğer biyoliç bakterilerine göre nispeten daha hızlı büyüebilmektedir ve genellikle 20-35 °C arasındaki sıcaklıklarda rahatlıkla gelişme gösterir. Fe(II)'nin Fe(III)'den daha fazla konsantrasyona sahip olduğu pH:1,8-2,0 arasında optimum gelişmeyi gösterir. Optimal pH dışında gelişmeye de adapte olabilmektedir (Vian, 1986). Çeşitli metal iyonlarının çözülmüş formları birçok bakterinin gelişimini inhibe ederken *A. ferrooxidans* metal iyonlarına yüksek oranda tolerans gösterir (Leduc ve Ferroni, 1994; Rawlings, 2002).

Bu çalışmada asidik ortamlarda en yoğun olarak bulunan ve laboratuvar ortamında kültivasyonu oldukça kolay olan *A. ferrooxidans* üzerinde çalışılacaktır.

A. thiooxidans

A. thiooxidans beslenme açısından *A. ferrooxidans*'a oldukça benzerlik gösterir ancak Fe(II)'yi oksitleme yeteneği yoktur. Bu nedenle sadece indirgenmiş sülfür bileşiklerinin bulunduğu ortamlarda gelişme gösterir. Mezofiliktir ve gelişme sıcaklığı ortalama 35 °C ile sınırlıdır fakat asit toleransı daha yüksektir (pH:0,5-5,5). GC molar konsantrasyonu %53'tür (Harrison, 1982).

A. caldus

A. caldus, indirgenmiş sülfürlü bileşikleri oksitlemesi ve düşük pH değerlerine tolerans göstermesi bakımından *A. thiooxidans*'a benzer (Hallberg ve Lindström, 1994). *A. thiooxidans*'tan farklı olan yönü orta derecede termofilik olmasıdır, optimum büyüme

sıcaklığı ortalama 45 °C'dir. 16S rRNA dizileri bakımından *A. thiooxidans*'a oldukça yakındır. 35-50 °C'de gerçekleştirilen biyoliç işlemlerinde dominant sülfür-oksitleyici mikroorganizmanın *A. caldus* olduğu belirlenmiştir (Rawlings vd., 1999). *A. caldus*'un bazı suşları *A. thiooxidans*'tan farklı olarak miksotrofik olarak yaşayabilir ve maya veya glukozu besin kaynağı olarak kullanır (Rawlings, 2002).

1.7.2. *Leptospirillum*

Acidithiobacillus cinsine benzer şekilde gram negatif, spor oluşturmeyen, kemolitotrofik ve yüksek asit toleransına sahip (pH: 1,3-4,0) bakterilerdir. Ancak diğer özellikleri bakımından farklılık gösterirler (Johnson, 2001). Virgül veya spiral şekilli olan bu bakteriler 16S rRNA dizin analizine göre *Nitrospira* grubuna dahildirler. Mezofilik ya da ılımlı termofilik olan bu cinsin bazı türleri 55 °C'ye kadar tolerans gösterebilmektedir. Elektron kaynağı olarak sadece Fe(II)'yi kullanırlar ve *A. ferrooxidans*'la karşılaştırıldığında daha yüksek Fe(III) toleransına sahiptir. Asidik ortamlarda *Acidithiobacillus* kadar yaygın bulunabilmektedir, ancak yavaş büyüdüğünden dezavantajlıdır. Yüksek sıcaklığa sahip ortamlarda *Acidithiobacillus* cinsine göre daha iyi gelişim gösterir (Norris, 1989). Günümüzde bu cinse ait üç tür bulunmaktadır. Bunlar: *L. ferrooxidans* (Markosyan 1972; Hippe 2000); *L. ferriphilum* (Coram ve Rawlings, 2002) ve *L. thermoferrooxidans* (Hippe, 2000)'dır.

1.7.3. *Acidiphilium*

Bir tür dışında *Acidiphilium* cinsine ait olan bakteriler asit tolerant ve gram negatiftir. Demir ve sülfür oksitleyici ototroflardan farklı olarak heterotrofturlar. Biyoliç ortamlarında birincil olarak bulunan organizmalar değildir (Hallberg ve Johnson, 2001). Genellikle *A. ferrooxidans* gibi demir ve sülfür oksitleyici bakteriler ile birlikte bulunurlar ve bu bakterilerin işlevleri sonucunda açığa çıkan organik bileşikleri tüketirler. Laboratuvar ortamında, katı besiyerinde *Acidithiobacillus* türlerinin yetiştirilebilmesi için detoksifiye edici ajan olarak kullanılırlar (Johnson ve McGinness, 1991; Johnson, 1995). Bir diğer önemli özellikleri de oksijen konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda Fe(III)'ü elektron

alıcısı olarak kullanmaları ve böylece *Acidithiobacillus* türleri için Fe(II) oluşturmalarıdır (Rawlings, 2002).

1.7.4. Biyoliç İşleminde Kullanılan Diğer Mikroorganizmalar

Sulfobacillus Ilımlı termofilik (40-60 °C) olan bu bakteriler gram pozitifdir ve endospor oluşturma yeteneğine sahiptir. Ototrof veya heterotrof olarak gelişim gösterirler ve ototrof geliştiklerinde elektron kaynağı olarak Fe(II)'yi kullanırlar (Golovacheva ve Karavaiko, 1979; Norris vd., 1996). Yüksek sıcaklıklardaki biyoliç işlemlerinde, *Sulfobacillus* türleri kullanılabilir (Bridge ve Johnson, 2000).

Ferroplasma: Bu organizmalar arke grubuna dahildir ve hücre duvarları yoktur. Fe(II)'yi oksitleyebilir ancak sülfür oksidasyonuna rastlanmamıştır. Optimum gelişme sıcaklığı 33 °C olmakla beraber 45 °C'ye kadar gelişme gösterebilir. Optimum pH 1,7 civarındadır. Bununla beraber, biyoreaktörlerde pH değeri azaldığında (pH 0,5) diğer bakterilere oranla sayılarında artış görülür (Edwards vd., 2000).

Sulfolobus: Zorunlu ototrof olan ve arke grubuna dahil olan bu mikroorganizma enerji kaynağı olarak Fe(II), indirgenmiş inorganik sülfür bileşikleri ve sülfürlü mineralleri kullanır. *S. metallicus* termofiliktir (optimum 68 °C) ve optimum pH aralığı 1,3-1,7'dir. (Norris, 1997). Son yıllarda 80-85 °C'de mineral oksitleme özelliği gösteren *Sulfolobus* benzeri mikroorganizmalara rastlanmıştır (Norris vd., 2000).

Metallosphaera: Arke grubundaki bu organizmalar oksijenli ortamda demir ve sülfür oksitleyen kemolitotroflardır. Aynı zamanda maya veya bazı amino asitlerin bulunduğu ortamlarda da büyüyebilirler. pH 1,0-4,5 arasında ve 80-85 °C sıcaklıkta oksitleme faaliyeti gösterebilmektedirler. Yüksek sıcaklıkta çalışabilmelerinden dolayı kalkopirit liçinde en etkili mikroorganizmadır (Norris, 1997).

Acidianus: Mineral oksitleme özelliğine sahip türleri bulunmasına rağmen, bu arke grubu mikroorganizmalar *Sulfolobus* ve *Metallosphaera* kadar ticari öneme sahip değildir. Optimum sıcaklığı 70 °C ve optimum pH: 1,5-2,0 civarındadır (Seegerer, 1986).

Tablo 2. Asidofilik bakteriler ve arkeler (Brandl, 2001)

Domain	Organizma	Beslenme tipi	Temel liç maddesi	pH aralığı	Sıcaklık (°C)
Arke	<i>Acidianus ambivalens</i>	Fakült. hetretotrof	Sülfürik asit		
	<i>Acidianus brierleyi</i>	Fakült. hetretotrof	Sülfürik asit	Asidofil	45-75
	<i>Acidianus infernus</i>	Fakült. hetretotrof	Sülfürik asit		
	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Kemolitoototrof	Fe(III)	1,3-2,2	15- 45
	<i>Metallosphaera prunae</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit		
	<i>Metallosphaera sedula</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit	asidofil	Ekstrem termofil
	<i>Picrophilus oshimae</i>	Heterotrof			İlımlı termofil
	<i>Picrophilus torridus</i>	Hetretotrof			İlımlı termofil
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit	0,9-5,8	55-85
	<i>Sulfolobus ambivalens</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit		Ekstrem termofil
	<i>Sulfolobus brierleyi</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit		Ekstrem termofil
	<i>Sulfolobus hakonensis</i>	Kemolitoototrof			
	<i>Sulfolobus metallicus</i>	Kemolitoototrof			Ekstrem termofil
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit		Ekstrem termofil
	<i>Sulfurococcus mirabilis</i>	Miksotrof	Fe(III), sülfürik asit	asidofil	Ekstrem termofil
	<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i>	Miksotrof	Fe(III), sülfürik asit		
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>				İlımlı termofil
	<i>Thermoplasma volcanicum</i>	Heterotrof			İlımlı termofil
	Bakteri	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>			
<i>Acidiphilium angustum</i>					
<i>Acidiphilium cryptum</i>		Heterotrof	Organik asitler	2,0-6,0	Mezofil
<i>Acidobacterium capsulatum</i>		Kemoorganotrof		3,0-6,0	Mezofil
<i>Acidocella</i> sp.		Heterotrof			Mezofil

Tablo 2'nin devamı

Domain	Organizma	Beslenme tipi	Temel liç maddesi	pH aralığı	Sıcaklık (°C)
Bakteri	<i>Acidomonas methanolica</i>	Heterotrof			Mezofil
	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Kemolitoototrof	Fe(III)		30
	<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Kemolitoototrof	Fe(III)		45-50
	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit	Estrem asidofil	50
	<i>Acidiphilum acidophilum</i>	Miksotrof	Sülfürik asit	1,5-6,0	25-30
	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit	2,0-4,5	28-30
	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit		45
	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit	5,0-7,0	30
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Kemolitoototrof	Fe(III), sülfürik asit	1,4-6,0	28-35
	<i>Thermothiobacillus tepidarius</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit		
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit	0,5-6,0	10-37
	<i>Thiobacillus thioparus</i>	Kemolitoototrof	Sülfürik asit	4,5-10,0	11-25
	<i>Thiomonas cuprinus</i>	Fakült.heterotrof	Sülfürik asit		30-36

1.8. Demir Oksidasyonunun Mekanizması

Mikrobiyal demir redoks döngüsü, hidromorfik kayaların ve sedimentlerin jeokimyasını değiştirerek organik kısımların bozunmasını ve minerallerin çözünerek endüstride kullanılabilir hale getirilmesini sağladığı için oldukça önemlidir. Bu nedenle Fe(II)-oksitleyici mikroorganizmaların biyokimyası üzerinde çok çeşitli araştırmalar yapılmış ve belirli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmada görevli olan enzimler cinse göre farklılık göstermekle beraber aynı cinsin türleri içerisinde de farklılıklar gösterebilmektedir.

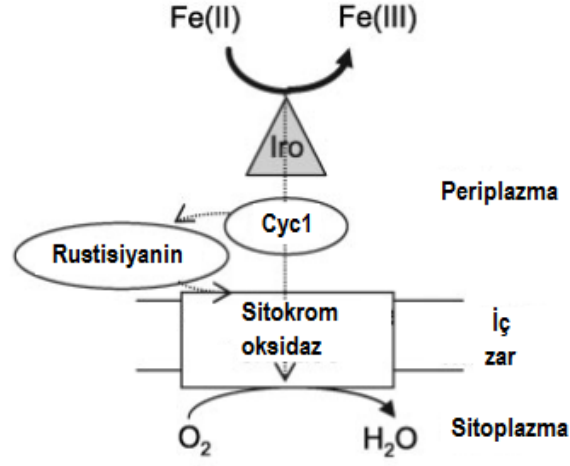
Demir, sülfür ve indirgenmiş inorganik sülfür bileşiklerini (RISC- reduced inorganic sulfur compounds) oksitleyen mikroorganizmaların çoğunlukla *Acidithiobacillus* cinsinin üyeleri olduğu düşünülmektedir. Bu alanda en çok çalışılan bakteri de *A. ferrooxidans*'tır. Fe(II)- oksitleyici asidithiobasili üyeleri heterojen bir grup oluşturur. Örneğin son yıllarda yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerden elde edilen 12 izolatın *A. ferrooxidans* türüne ait

olduğu belirlenmiş ve bu türlerin genomik düzeyde oldukça farklı olduğu görülmüştür (Luo vd, 2009). Genetik çeşitliliğe ek olarak, hareketlilik, optimum pH ve sıcaklık gibi çeşitli fenotipik farklılıklar da görülmektedir (Harrison, 1982; Kupka vd.,2007; Dave vd., 2008; Ni vd., 2008; Hallberg vd., 2009, 2010).

Demir oksitleyici bakterilerin en önemli farklılıklarından biri de Fe(II) ve RISC oksitleme mekanizmalarıdır. Farklı suşlar arasında çok farklı Fe(II) oksitleme oranları görülmektedir (Suzuki vd., 1990). Bazı türler substrata bağlı olmaksızın Fe(II)'yi hemen oksitleyebilirken, bazı türler enerji kaynağı olarak ortamda sadece Fe(II) varsa oksidasyonu gerçekleştirebilir (Suzuki vd., 1990). Bunun yanında bazı türler Fe(II) ve sülfürü aynı anda oksitleyebilirken bazıları da önce Fe(II)'yi daha sonra sülfürü oksitler (Suzuki vd.,1990; Yarzabal vd., 2004). Bu gözlemlere ek olarak oksidasyon yolundaki enzimleri kodlayan genler arasında da farklılık görülmektedir. Örneğin, *A. ferrooxidans*'ta bulunan yüksek potansiyelli demir-sülfür proteini (HiPIP- High Potential Iron Sulfur Protein), bazı suşlarda sülfür oksidasyonunda görev alırken diğer bazı suşlarda Fe(II)'den ilk elektron alıcısı olarak görev yapar (Şekil 1) (Fukumori vd., 1988; Kusano vd., 1992; Cavazza vd., 1995). Bu protein sülfür oksidasyon mekanizmasında bulunduğu Hip, demir oksidasyon mekanizmasında bulunduğu ise Iro (Iron-oxidizing/ demir oksitleyici) adını alır. Bunun dışında oksidasyon işleminde görev alan Rustisiyanin ve Sitokrom proteinlerinin sayısı ve yapısı da türden türe farklılık gösterebilmektedir.

Acidithiobacillus ferrooxidans en çok çalışılan biyoliç bakterilerinden bir tanesidir. Özellikle enerji metabolizması, biyoliç işleminden sorumlu mekanizma olduğu için bu metabolizmanın anlaşılması üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. *A. ferrooxidans*'ın elektron taşınım yolunda, Fe(II)'den elektronun alınıp son elektron alıcısı olan oksijene iletilmesine kadar çeşitli enzimler görev yapmaktadır. Bu enzimler genel olarak; Fe(II)'den ilk elektronu alan bir demir oksidaz (Iro), bir sitokrom *c*, bir mavi bakır proteini olan rustisiyanin ve son olarak da bir sitokrom oksidaz'dır (Amouric vd., 2011).

Farklı bir modele göre; ilk elektron alıcısı *cyc2* geni tarafından kodlanan bir sitokrom *c*'dir. Bunu takiben fonksiyonu bilinmeyen bir protein yer alır, daha sonra *rus* geni tarafından kodlanan bir rustisiyanin, *cyc1* geni tarafından kodlanan bir sitokrom *c*₄ ve son olarak da elektronu oksijene ileten bir aa₃ tip sitokrom oksidaz yer alır (Quatrini, 2009).



Şekil 1 *A. ferrooxidans*'ta RISC'ten oksijene kadar elektron taşınımı

1.9. Demir Oksidaz (Iro) Proteinini

Acidithiobacillus ferrooxidans bakterisinin demir oksidasyon mekanizmasını anlamak için birçok araştırma yapılmış ve çok çeşitli redoks proteinlerinin varlığı belirlenmiştir. Bu enzimlerden biri olan Iro (HiPIP) tanımlanarak klonlanmıştır (Fukumori vd., 1988; Kusano vd., 1992). Iro proteini, Fe(II)'den oksijene elektron taşınım zincirinde ilk elektron alıcısı olarak düşünülmektedir.

Iro proteinini kodlayan *iro* geni, bakteri genomunda tek bir kopya halinde bulunur. 322 baz çiftlik bir açık okuma zincirinden oluşan *iro* geni, 96 amino asitlik bir proteini kodlar. Polipeptit dizisinde sinyal peptidinin bulunuşu bu proteinin periplazmik olduğunu kanıtlar (Kusano, 1992). HiPIP proteinlerinin moleküler yapısı X-ray kristalografi ya da NMR ile belirlenmiştir. Karakterizasyonu yapılan birçok HiPIP monomerik bir yapıya sahiptir.

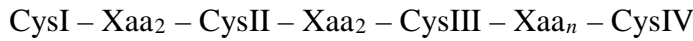
MALDI-TOF analizleri, HiPIP ailesine dahil olan Iro proteininin holoprotein yapıda olduğunu göstermiştir. Bu protein monomerlerine ayrıldığında aktif olan apoprotein kısmının 6,5 kDa olduğu belirlenmiştir. Proteinin aktif bölgesini oluşturan apoprotein kısmında [4Fe-4S] kümesi bulunmaktadır (Zeng, 2007). [4Fe-4S] kümesi, proteinin demir molekülüne bağlanmasını sağlayan yapıdır ve genel olarak bütün HiPIP proteinlerinde bulunur (Yamanaka, 1991).

1.9.1. [4Fe-4S] Kümesi

Demir-sülfür kümeleri (Iron-sulfur cluster – ISC) yaşamın erken dönemlerinde oluşmuş antik yapılardır. En ilkel arkebakterilerde dahi ISC içeren ferredoksin proteinine rastlanmaktadır. Sülfür ve demir moleküllerinin oldukça farklı bir yapıya sahip olmaları nedeni ile ISC'ye sahip proteinlerin yapısı da oldukça karmaşıktır ve çok yüksek spesifiteye sahiptir. Doğada farklı ISC yapıları görülebilmektedir (Şekil 2). En basit olarak ferredoksin'de [Fe-0S] yapısı görülürken en kompleks yapılar [7Fe-8S] ve [8Fe-8S] şeklinde bakteriyel nitrogenazlarda bulunur. ISC proteinlerinin birincil fonksiyonu elektron taşıma olmakla beraber, katalitik fonksiyona da sahiptirler. Ayrıca gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde, demir ve oksidasyon stresinde, DNA hasarlarının tanınmasında ve onarılmasında da görev yaparlar. (Brozka vd., 2006).

Demir ve sülfür oksitleyici mikroorganizmalarda görülen yapı genellikle [4Fe-4S] kümesidir. Bu küme tipik olarak kübik bir yapı gösterir. Demir ve sülfür iyonları küp şeklinin köşelerinde yerleşim gösterir. Demir iyonları sistein ligandları ile bağlanarak daha kararlı bir yapı haline gelir. [4Fe-4S] kümesi, düşük potansiyelli (bakteri tipi) ve yüksek potansiyelli (HiPIP) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Yüksek potansiyelli olanlarda elektron taşıma potansiyeli +50 ile +450 mV arasında değişkenlik gösterir (Bian ve Cowan, 1999).

[4Fe-4S] kümesinin bağlanma birimi yüksek oranda korunmuştur ve sistein amino asitleri bakımından zengindir. Genel olarak:

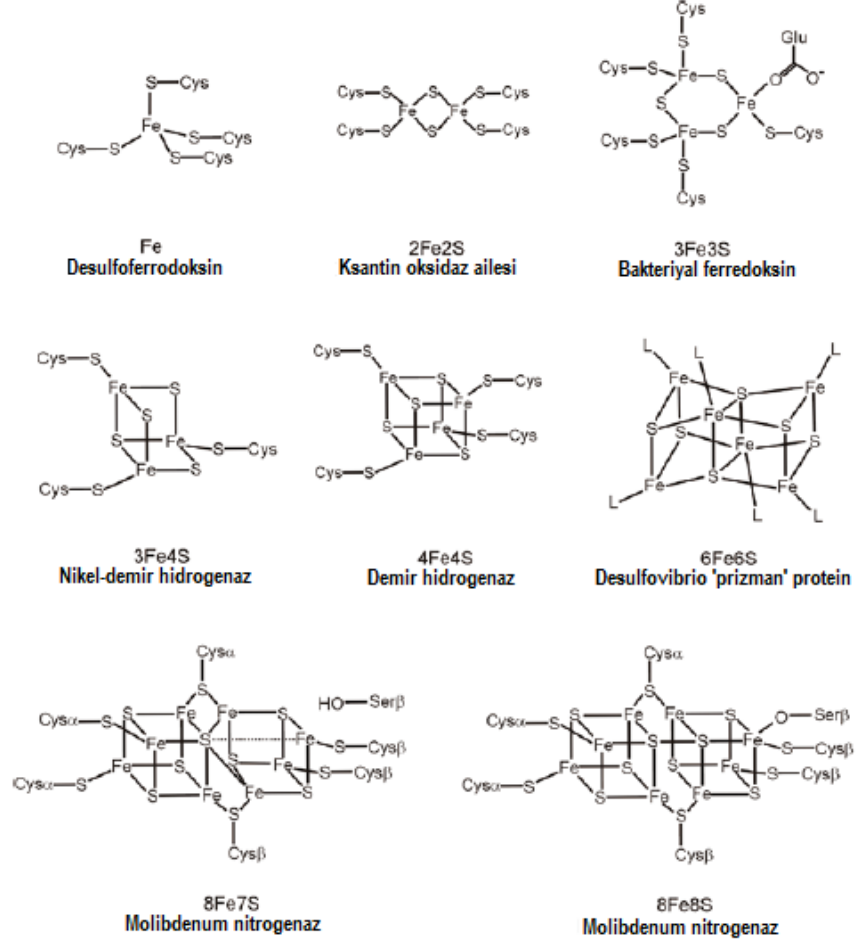


şeklinindedir. Bu yapı 'klasik [4Fe-4S] kümesi bağlanma motifi' olarak isimlendirilir. [4Fe-4S] kümesi proteinin merkezine yerleşmiştir ve etrafı aromatik amino asitlerle çevrelenmiştir (Şekil 3). Bu amino asitlerin proteinin kararlılığını korumada görevli olduğu düşünülmektedir (Breiter vd., 1991; Agarwal vd., 1995; Iwagami vd., 1995).

Acidithiobacillus ferrooxidans Iro proteininde [4Fe-4S] kümesi bağlanma motifinin varlığı belirlenmiştir. Burada sisteinler [4Fe-4S] kümesine bağlanmakla görevlidir. Sistein amino asitlerinin yerleşimi Cys20, Cys23, Cys32 ve Cys45 şeklindedir (Zeng vd., 2010).

Sistein amino asitlerinin yanı sıra Tyr10 amino asidi de yüksek oranda korunmuştur ve [4Fe-4S] kümesinin kararlılığında görev aldığı düşünülmektedir. Phe26 ve Phe48 amino

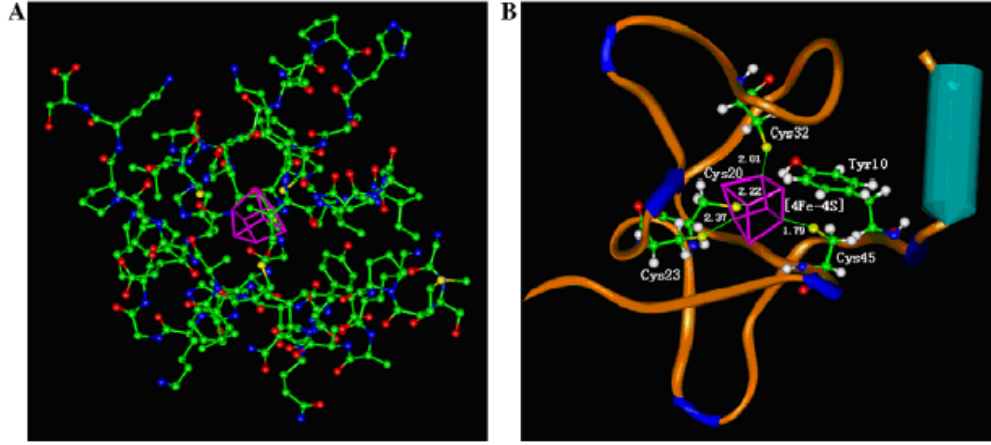
asitleri de Iro proteini içerisinde korunmuş amino asitler olarak bulunur ve yine kararlılıkta önemli oldukları belirlenmiştir (Zeng vd., 2010).



Şekil 2. Doğada bulunan farklı demir-sülfür kümeleri.

1.10. Demir Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

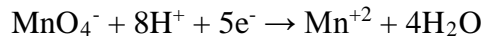
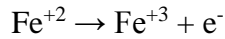
Demir oksidaz enziminin aktivitesini belirlemek için genellikle ortamda azalan Fe(II) miktarı ya da artan Fe(III) miktarı ölçülür. Bu ölçümler kolorimetrik olabileceği gibi spektrofotometrik olarak da gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 3. (A) *A. ferrooxidans* Iro proteininin genel yapısı, [4Fe-4S] kümesi mor renkli gösterilmiştir. (B) [4Fe-4S] kümesi bağlanma kısmını gösteren moleküler yapı modeli (Zeng vd., 2008).

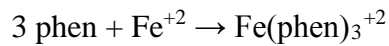
1.10.1. KMnO₄ ile Analiz

Bu işlemde ortamda bulunan Fe(II) miktarını belirlemek için KMnO₄ kullanılır. 1mM KMnO₄ sülfirik asit içerisinde çözünerek hazırlanır ve titrasyon yöntemiyle Fe(II) miktarının ölçüleceği tüp içerisine aktarılır. Titrasyonun bitiş noktası hafif pembe rengin oluştuğu noktadır (McGinness, 1991). Reaksiyon şu şekilde gerçekleşir:

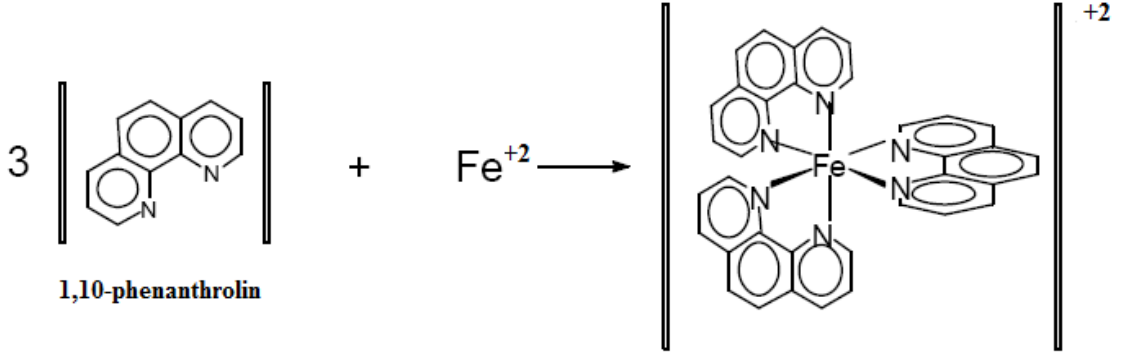


1.10.2. α -phenanthrolin ile Analiz

1,10-phenanthrolin (α -phenanthrolin, phen) heterosiklik organik bir bileşiktir ve birçok metal iyonu ile kuvvetli bağlar oluşturur. Bu bileşik Fe(II) ile bir araya geldiğinde yoğun kırmızı bir renk oluşur. Bu renk değişimine bağlı olarak ortamda artan veya azalan Fe(II) miktarı belirlenebilir (Sandell, 1944; Fortune, 1938). Reaksiyon şu şekilde gerçekleşir:



Reaksiyonun açık formülle gösterimi Şekil 4’de görülmektedir.



Şekil 4. α -phenanthrolin ile Fe(II) arasında gerçekleşen reaksiyon

1,10-phenanthrolin ile yapılan ölçümler spektrofotometrik olarak da gerçekleştirilebilir. Fe(II) varlığında oluşan renk değişimi 400-600 nm arasında ölçülür. En iyi absorbands değeri 510-522 nm arasındadır. Beer yasasına bağlı olarak standart grafik oluşturulması ile Fe(II) konsantrasyonu kolaylıkla tayin edilebilir.

1.10.3. EPR (Elektron Paramagnetik Rezonans) Spektroskopisi ile Ölçüm

EPR spektroskopisi eşleşmemiş elektronlara sahip moleküllerde, serbest elektronların ölçümüne dayanır. Bu işlem için özelleşmiş spektrofotometreler kullanılır. İlk olarak 1944 yılında Zavoisky tarafından uygulanan bu yöntem, günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fe(II) molekülü eşleşmemiş elektronlara sahip olduğu için EPR spektra vasıtası ile ölçülebilmektedir.

1.11. Demir Oksidaz Proteini Üzerinde Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Farklı kaynaklardan elde edilen HiPIP proteinlerinin dizilerinin karşılaştırılması sonucu Cys20, Cys23, Cys32 ve Cys45 amino asitlerinin yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir (Şekil 5). HiPIP ailesindeki korunmuş sisteinlerin [4Fe-4S] kümesini oluşturmada görevli olduğu düşünülmektedir (Benning vd., 1994; Banci vd., 1995; Kerfeld vd., 1998; Nogi vd., 2000). Bunu doğrulamak için Zeng ve arkadaşları (2008), *A. ferrooxidans* Iro proteininde bulunan dört sistein amino asidini nokta mutasyonu ile değiştirmişlerdir. Her bir sisteini değiştirmek için farklı primer setleri kullanılarak

pHiPIP(C25A), pHiPIP(C28A), pHiPIP(C37A) ve pHiPIP(C50A) ekspresyon primerleri oluşturulmuş ve sistein amino asitleri alanin amino asidine dönüştürülmüştür. Ayrı ayrı meydana getirilen bu dört mutasyona sahip proteinler EPR spektroskopisi ile incelenmiş ve sonuçta her bir mutantın aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Buna bağlı olarak Cys20, Cys23, Cys32 ve Cys45 amino asitlerinin, proteinin aktif bölgesinde [4Fe-4S] kümesini oluşturmakla görevli olduğu doğrulanmıştır (Zeng vd., 2008).

Sistein amino asitlerinin yanında, bazı aromatik amino asitlerin de Iro proteininde korunmuş olduğu bilinmektedir. Zeng (2008), bu aromatik amino asitlerden Tyr10, Phe26, Trp44 ve Phe48'in protein fonksiyonunda önemli bir role sahip olup olmadığını belirlemek için yine nokta mutasyonları yapmıştır. Bu mutasyonlar sonucunda Tyr10'un, [4Fe-4S] kümesinin kararlılığının korunmasında kritik bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Bu aromatik grubun [4Fe-4S] kümesini korumak için hidrofobik bir bariyer oluşturduğu düşünülmektedir. Nokta mutasyonu çalışmaları sonucunda; Tyr10, Phe26 ve Phe48'in asidik şartlarda proteinin kararlılığını korumak için zorunlu olduğu, Trp44'ün ise kararlılıkta herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Zeng vd., 2010).

1.12 Füzyon Proteinler Vasıtası ile Ekspresyonun Artırılması

Bir proteinin yapısını ve fonksiyonunu anlamak için, proteinin yüksek miktarda ekspresyonunun sağlanması oldukça önemlidir (Terpe, 2003; Smyth vd., 2003). Yapısal analizler için proteinleri yüksek miktarda elde etmede en yoğun olarak kullanılan metot, klonlanmış genlerin *E. coli* hücresi içerisinde ekspresyonudur. Bu yöntemde sıklıkla karşılaşılan problemler, proteinlerin az miktarda ekspresyonu veya çözünmeyen inklüzyon cisimciklerinin oluşumudur. İlgilenilen proteini bir füzyon kuyruğa takarak ekspresyonunu sağlamak, bu problemlerin üstesinden gelmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgilenilen protein, konakçı bir proteine veya normal fonksiyon gösteren bir proteine bağlanır ve tek bir protein halinde sentezlenmesi sağlanır. Daha sonra füzyon proteini saflaştırılır ve ardından ya olduğu gibi kullanılır ya da kimyasal veya enzimatik yolla iki protein birbirinden ayrılarak incelenir. Genellikle konakçı protein hücre içerisinde yüksek miktarda ekspresyonu sağlanan, yüksek oranda çözünen, kararlı olan ve saflaştırılması kolay olan proteinlerden seçilir (Ashima vd., 2005).

HiP-23270	---AGNCPGTTPKAEVQYQPHPK-----GKAQCSVCANFI-----AP 34
HiP-33020	---AGNCPGTTPKAEVQYQPHPK-----GKDQCSVCANFI-----AP 34
Iro	-----GSMPKAAWQYQDTPK-----GKDHCSVCAQFI-----AP 29
R.g	-----QDKIDPKMWQYQDSPK-----DGNKCSSTCVNFE-----AP 30
R.t	-----GTNASMRKAFNYQEVSKT-----AGKNCANCAQFIPGAS---ASAA 38
C.v	SAPANAVAADDATAIALKYNQDATKSERVAAARFGLPPEEQHCANCQFMQADAAGATDEW 60
T.t	AAPANAVTADDP TAIALKYNQDATKSERVAAARFGLPPEEQHCANCQFMQANVG---EGDW 58
C.p	-VPANAVTESDPAAVALKYHRDAASSERVAAARFGLPPEEQHCENCQFMNPDSA---AADW 57
	. .: * : . : * * :
HiP-23270	KCCCKVVAG--PVAPDGYCIAFTMPA--- 58
HiP-33020	KCCCKVVAG--PVAPDGYCIAFTMPA--- 58
Iro	HSCCKVVAG--NISPNGWCVAFVPKSA--- 53
R.g	SSCKIVAG--KISPNGWCIAIYAPMEDKKG 57
R.t	GACKVIPGDSQIQPTGYCDAYIVKK--- 63
C.v	KGQQLFPG-KLINVNGWCASWTLKAG--- 85
T.t	KGQQLFPG-KLINVNGWCASWTLKAG--- 83
C.p	KGQQLFPG-KLINLSCWCASWTLRAG--- 82
	* * . . * : * * * ! :

Şekil 5. *A. ferrooxidans* ve diğer HiPIP proteinlerinin dizi benzerlikleri. HiP-23270: *A. ferrooxidans* 23270 HiPIP proteini; HiP-33020: *A. ferrooxidans* 33020 HiPIP proteini; Iro: *A. ferrooxidans* Fe-I Iro proteini; R.g: *Rhodopila globiformis* HiPIP proteini; R.t: *Rhodocyclus tenuis* HiPIP proteini; C.v: *Chromatium vinosum* HiPIP proteini; T.t: *Thermochromatium tepidum* HiPIP proteini; C.p: *Chromatium purpuratum* HiPIP proteini.* ile işaretli amino asitler tüm türlerde korunmuştur. Sadece bazı türlerde korunmuş olanlar : ile işaretlenmiştir. Korunmuş sisteinler kırmızı ile işaretlenmiştir (Zeng vd., 2008).

Füzyon oluşturmak için yaygın olarak kullanılan proteinlerden bazıları *E. coli* maltoz bağlanma proteini (MBP) (Guan vd., 1988), *Schistosoma japonicum* Glutasyon S-Transferaz proteini (GST) (Smith ve Johnson, 1988) ve histidin affinite kuyruğudur (Hochuli vd., 1987). Son yıllarda Harrison ve arkadaşları *E. coli*'de bulunan 4000 proteinin çözünebilirliklerini incelemişlerdir. Sonuçta NusA, BFR ve GrpE proteinlerinin en yüksek çözünürlüğe sahip olduklarını bulmuşlardır (Davis vd., 1999). NusA geninin NusA-hLL3 füzyonunun ise çok daha yüksek çözünürlük gösterdiğini saptamışlardır. Farklı kaynaklardan elde edilebilecek olan ve yüksek çözünürlük gösteren başka proteinlerin de varlığı bilinmektedir. Örneğin sıçan sitokrom b5 proteininin demir-bağlayıcı domaini %95 oranında çözünürlük göstermektedir (Davis vd., 1999). Bu protein *E. coli* içerisinde yüksek ekspresyon oranına sahiptir ve iyi bir füzyon proteini olmak için gerekli şartları taşır (Asima, 2005).

1.12.1 Füzyon Proteininin Sahip Olması Gereken Özellikler

Son yıllarda moleküler biyoloji çalışmalarında, saflaştırılabilme oranı yüksek olan ve kolaylıkla karakterize edilebilen rekombinant proteinlerin oluşturulması oldukça önem kazanmıştır. Günümüzde rekombinant proteinlerin üretilmesi için çeşitli epitop peptitler veya proteinler geliştirilmiştir. Bu sistemlerin ortak özellikleri: (I) kolaylıkla saflaştırılabilmesi, (II) ilgilenilen proteinin tersiyer yapısına ve kararlılığına minimal etki göstermesi, (III) doğal proteini elde etmek için kolaylıkla ayrıştırılabilmesi ve (IV) farklı proteinlere uygulanabilmesidir (Terpe, 2003).

Geniş çapta kullanılacak rekombinant proteinlerin üretilmesi için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi, proteinin yapısına katılmayacak çok küçük peptitlerin kullanımudur. Yaygın olarak kullanılan küçük peptitler poly-Arg, FLAG-, poly-His, c-myc, S- ve Strep II-tag'dır. Bazı uygulamalarda bu küçük peptitlerin uzaklaştırılması gerekmez. Küçük peptitlerin tersiyer yapıya ve aktiviteye etkisi, bulunduğu yere ve amino asit içeriğine bağlıdır (Bucher vd., 2002). Diğer bir yaklaşım füzyon partner olarak büyük peptitlerin veya proteinlerin kullanımudur. Bu tip proteinlerin kullanımı hedef proteinin çözünürlüğünü artırır. Büyük protein kullanımının dezavantajı, farklı yollarla uzaklaştırılmasının gerekmesidir. Genellikle belirli bir proteinin füzyon sistemini belirlemek oldukça zordur. Hedef proteinin yapısı, ekspresyon sistemi ve saflaştırılan proteinin kullanım alanı, füzyon sistemini belirlemede dikkate alınan hususlardır (Terpe, 2003).

1.12.2. Füzyon Proteini Oluşturma

Bir füzyon protein sistemi, spesifik primerler kullanılarak oluşturulur. Sistemde kullanılacak konakçı protein yukarıda sözü edilen özellikler dikkate alınarak belirlenir. Daha sonra bu proteini sentezleyen genin 3' ucuna ilgilenilen proteini ekleyebilmek için restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi eklenir. Aynı kesim bölgesi ilgilenilen proteini sentezleyen genin 5' ucuna da eklenir ve bu kesim bölgelerinin üst üste gelmesi sağlanır. Ekspresyondan sonra iki proteinin kolaylıkla birbirinden ayrılabilmesi için de konakçı genin 3' ucuna spesifik proteaz dizisi eklenmelidir. Yaygın olarak kullanılan proteazlar enterokinaz, Tev proteaz ve Faktör Xa'dır. Ashima ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir çalışmada, füzyon proteini oluşturmak için kullandıkları ileri ve geri primerleri;

İleri: 5'-AAACCGTCCGAAACTCTGGGTATCGAAGGACGTGGTGGATCCATGATGCAACAT-3'
Geri: 5'-ATGTTGCATCATGGATCCACCCAGTCCTTCGATACCCAGAGTTTCGGACCGGT-3'

şeklindedir. Burada GGATCC dizileri *Bam*HI restriksiyon enzimi kesim bölgesini; ATCGAAGGACGT dizileri ise Faktör Xa enzimi kesim bölgesini ifade eder. Bu diziler, konakçı proteini sentezleyen genin 3' ucuna eklendikten sonra, ilgilenilen gen 5' ucunda bulunan *Bam*HI kesim bölgesinden kesilerek konak protein genine eklenir ve sentezi sağlanır. *E. coli* konak hücresinde ekspresyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, füzyon protein saflaştırılır ve Faktör Xa enzimi ile kesilerek ilgilenilen protein saf halde elde edilir (Ashima vd., 2005).

1.13. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı farklı asidik kaynaklardan örnek temin edilerek, biyoliç işleminde en yoğun olarak kullanılan *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakterisini bulmaktır. Bu amaçla Giresun, Artvin ve Gümüşhane'de bulunana asidik su kaynaklarından örnek temin edilecektir. *A. ferrooxidans*'ın izole edilip tanımlanmasından sonraki amaç, sahip olduğu demir oksidaz enziminin *in vitro* koşullarda klonlanarak ekspres edilmesini sağlamaktır.

Demir oksidaz enziminin ekspresyonu sağlandıktan sonra biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilecektir. Ardından demir oksidaz enzimini daha kararlı hale getirmek amacı ile korunmuş amino asitler üzerinde mutasyonlar yapılacaktır. Bu amaç için bölge özgün mutasyon yöntemi kullanılacaktır. Oluşturulan mutant enzimlerin de biyokimyasal karakterizasyonu yapılacak ve yaban tip demir oksidaz ile karşılaştırılacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler

Sodyum klorür (Merck K39486504), Ethilenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck K90262021), Demir (II) sülfat (Merck 1-03965), Magnezyum sülfat (Merck 105886), Potasyum hidrojen fosfat (Merck A567300), Potasyum hidrojen phthalate (Merck 102400), Amonyum sülfat (Merck 01217), Coomassie brilliant blue-R 250 (Merck 1-12553), Amonyum asetat (Merck AO394816 224), KMnO₄ (Merck 105082), Tripton (Oxoid LP0042), Yeast extract (Pronadisa 1702), Bakteriyolojik agar (Conda 1800), X-Gal (GBT 248-7609), 2-propanol (Sigma 24137), α -phenanthrolin (Sigma P9375), Coomassie brilliant blue-G 250 (Sigma 27815), IPTG (Sigma 5502), Sodyum asetat (Sigma 2889), Asetik asit (Sigma 27225), Akrilamid (Sigma 8887), D-glukoz (Sigma 7528), TRIS base (Sigma T-1503), Ethidium bromide (Sigma E-7637), Agarose (Sigma A-5093), Glycerol (J.T.Backer 7044), Methanol (J.T.Backer 8405), RNase A (Applichem 2760), Ampisilin (Himedia RM645), Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Amresco 0227), Kanamisin (Amresco 0408), Lizozim (Fluka 62971), Bisakrilamid (Promega 608-274-4330), Bromo fenol blue (Gebu 080702), *EcoRI* (Thermo scientific ER0271), *NdeI* (Promega 8801), *NheI* (Promega R650E), *HindIII* (Promega R604A), *XhoI* (Promega R6161), Protein ladder (NEB 107703S), T4 DNA ligaz (NEB M0202S), DNA ladder (Fermentas SM0324).

Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), p-GEMT Easy Klonlama Kiti (Promega A1860), Plazmit İzolasyon Kiti (Roche 11 754 777 001), DNA'yı Jelden Çıkarma Kiti (Invitrogen K2100-12).

2.2. Hücre ve Plazmitler

Demir oksidaz geninin kaynağı olarak *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu kullanıldı. Bu bakteri, tez kapsamında Artvin'in Murgul ilçesinde bulunan bakır madeninden temin edildi. Genin klonlanması ve baz dizisinin belirlenmesi için yapılan bütün çalışmalarda konak hücre olarak *E. coli* JM101 suşu; pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmış yaban tip ve mutant enzimlerin aşırı ekspresyonlarında da *E.coli*

BL21 (DE3) suşu kullanıldı. Ekspresyon vektörü olarak pET-28a(+) vektörü, klonlama ve baz dizilimi analizleri için pGEM-T Easy vektörü kullanıldı.

2.3. Moleküler Çalışmalar

2.3.1. Bakır Madenlerinden Örneklerin Alınması ve İzolasyonu

Karadeniz bölgesinde bulunan farklı bakır madenlerinden, pH'sı 2,0 ile 3,0 arasında değişen su örnekleri ağzı kapaklı steril şişelere alındı. Alınan örnekler olabildiğince kısa sürede ve soğuk şartlar altında laboratuvara getirildi. Daha sonra içerdikleri asidofilik bakteriler, Iron salts (TK) besiyerinde (Tuovinen ve Kelly, 1973), 30 °C'de bir hafta süreyle inkübe edilerek zenginleştirildi (TK besiyeri: %4 K₂HPO₄, %4 MgSO₄.7H₂O, %4 (NH₄)₂SO₄, 0,6 M FeSO₄.7H₂O, H₂SO₄). Çoğaltılan bu kültürlerde turuncu (pas rengi) renk oluşumu gözlenenler, FeTSB besiyeri (Johnson vd., 1987) içeren petrilere ekilerek saf kültürleri yapıldı.

2.3.2. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu

İzolatların genomik DNA'ları, Sambrook ve arkadaşlarının (1989) prosedürüne göre saflaştırıldı. Bu metod şu şekilde uygulandı.

Asidofilik izolatlar, uygun sıcaklıkta "Iron salts (TK) besiyeri" nde (%4 K₂HPO₄, %4 MgSO₄.7H₂O, %4 (NH₄)₂SO₄, 3 ml/1L H₂SO₄ ve 167 g/L FeSO₄.7H₂O) bir hafta inkübe edildi. Elde edilen sıvı kültürler 13.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vorteksenerek çözüldü. Üzerine 1 µl (10 µg/ml) lizozim solusyonu ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µl %10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir, tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25: 24: 1) ilave edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları

atıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96’lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20 °C’de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl %70’lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37 °C’de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µl TE’de çözülerek – 20 °C’de muhafaza edildi.

2.3.3. 16S rRNA Geninin PCR ile Artırılması

16S rRNA genleri, her bir asidofilik izolattan elde edilen genomik DNA’dan UNI16S-L (5’-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3’) ileri ve UNI16S-R (5’-ATGGTACCGTGTG ACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı, steril ddH₂O ile 50 µl’ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl’lik tüplerde, “Biometra Personal Cycler”da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95 °C’de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94 °C’de 30 saniye (denatürasyon için), 55 °C’de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72 °C’de 1,5 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si % 1,0’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

2.3.4. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bankasındaki Dizilerle Karşılaştırılması

Yukarıda belirtilen primerler kullanılarak genomik DNA’dan arttırılan 16S rRNA fragmentleri, bir TA klonlama vektörüne (pGEM-T Easy) klonlandı ve doğruluğu restriksiyon enzim analizi ile teyit edilen klonların baz dizin analizi yine yukarıda belirtilen primerler kullanılmak suretiyle gerçekleştirildi. Elde edilen 16S rRNA dizileri, Gen

Bankasında (URL-1, 2011) var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

2.3.5. Demir Oksidaz Geninin (*iro*) Belirlenmesi

2.3.5.1. Primer Sentezi

16S rRNA dizi analizi sonucunda *Acidithiobacillus ferrooxidans* olduğu belirlenen suşlardan demir oksidaz geninin çoğaltılması için uygun primerler dizayn edildi. Bu primerler GenBank'ta bulunan *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 suşunun demir oksidaz geni baz alınarak oluşturuldu. Çoğaltılan genin daha sonraki çalışmalarda uygun bir ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için ileri primerine *NdeI* restriksiyon enzimi kesim bölgesi, geri primerine de *HindIII* enzimi kesim bölgesi ilave edildi. Sentezlenen primerler: İro_ F6: 5' – CCATATGAGTGAGAACTGAAG -3' ve IRR_2: 5'-CAAGCTTGGGAAGCAGGA GGAACTCCAGGC – 3' dizilerine sahiptir.

2.3.5.2. Demir Oksidaz Geninin (*iro*) PCR ile Çoğaltılması

Demir oksidaz geni, Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'dan uygun primerler kullanılarak, PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarında, 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü DNA zincirinin denatürasyonu için 94 °C'de 30 saniye, primerlerin DNA'ya bağlanması (annealing) için 55 °C'de 1 dakika ve yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extention) için 72 °C'de 1,5 dakika şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

2.3.5.3. Demir Oksidaz Geninin (*iro*) Klonlanması ve Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması

PCR reaksiyonları ile çoğaltılan *iro* geni, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar (1,2 µg pGEM-T Vektör (50 ng/ µl); 12 µl genomik DNA (4 ng/ µl); 100 U T4 DNA Ligaz; 200 µl 2X Ligasyon Tamponu) ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi.

Maniatis ve arkadaşlarının (1982) prosedürüne göre klonlama sonucu oluşan koloniler Ampisilin (50 mg/ml) içeren LB broth içerisinde 37 °C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan kültürler 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 12.000 rpm’de 3 dakika çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 200 µl Solüsyon I (50 mM Glukoz; 25 mM Tris-HCL; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1 ml solüsyon için 4 mg lizozim) ilave edildi ve vorteksenerek çözüldü. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 400 µl Solüsyon II (0,2 N NaOH; %1 SDS) ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika buzda bekletildikten sonra 7,5 M Amonyum asetat’tan 300 µl ilave edilerek oldukça yavaş bir şekilde alt üst edildi. 10 dakika buzda bekletilen örnekler 12.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 800 µl izopropanol ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl %70’lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37 °C’de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 40 µl TE’de çözümlenerek -20 °C’de muhafaza edildi.

İzole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığını belirlemek amacı ile plazmitler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizisi, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla (Macrogen, Hollanda) belirlendi.

2.3.6. *A. ferrooxidans* M1 Yaban Tip *iro* Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Baz dizilimi belirlenen *iro* geninin pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E.coli* BL21 (DE3) suşunda yüksek miktarlarda ekspres edilmesi planlandı. Gen ürününün kolay saflaştırılabilmesi için HisTag kuyruğu taşımasına karar verildi. pET-28a(+) ekspresyon vektörü incelendiğinde, gen ürününün amino veya karboksil ucunda HisTag kuyruğu olabilecek şekilde, vektöre klonlama yapabilmenin mümkün olduğu görülmektedir. Gen, *NdeI* bölgesine klonlanırsa gen ürününün N terminal ucunda HisTag kuyruğu bulunur. Bu nedenle, geni *NdeI-HindIII* bölgeleri arasına klonlayabilmek için, *NdeI* bölgesi içeren İro_ F6 ileri primeri ve *HindIII* bölgesi içeren IRR_2 geri primeri ile *A. ferrooxidans* M1 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.5.2'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünü *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pET-28a(+)’ya aktarıldı ve klon pETIro olarak adlandırıldı. pETIro, sahip olduğu T7 promotorunun çalışmasına ve *iro*'nun ekspresyonuna imkân sağlayan *E.coli* BL21(DE3) suşuna CaCl₂ transformasyonu ile aktarıldı, bu transformanta *E.coli* BL21/ pETIro adı verildi ve bu hücreler kanamisinli ortamda büyütüldü.

2.3.7. *Iro* Geninin Ekspresyonu

Enzim üretimi için *E.coli* BL21/ pETIro'nun gece kültüründen sıvı LB besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze kültür ekildi. Taze kültür O.D.'si 0,6-0,9 oluncaya kadar çoğaltılarak 1 mM IPTG ile uyarıldı ve 3,5-4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Çöken hücreler 50 mM Tris tamponunda (pH 8) çözüldü ve 5 dakika Sartorius Labsonic marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 1 döngü aralığında patlatılan hücreler 14.600 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant kısmı ile saflaştırma işlemine devam edildi.

2.3.8. *Iro* Enziminin Saflaştırılması

Enzimi saflaştırmak için HisLink Protein Purification Resin (Promega) kolon maddesi kullanıldı. Kolon maddesi Tris-HCl (pH:7,5), NaCl, β-merkaptotanol ve

imidazol içeren solusyon ile dengeye getirildikten sonra, enzim kolona yüklendi. Çıkan fraksiyonlarda aktivite taraması gerçekleştirildi.

2.3.9. Rekombinant Proteinlerin Oluşturulması

pET_{Iro} klonu *E. coli* BL21 hücresi içerisine aktarıldıktan sonra Iro proteininin ekspresyonu sağlanamadı. İndükleme süresinde ve sıcaklığında yapılan değişiklikler de soruna çözüm üretilmedi. Bunun nedeninin, proteinin ekspresyon oranının çok düşük olması veya inklüzyon cisimcikleri oluşumu olduğu düşünüldü. Bu sorunu gidermek için Iro proteininin, hücre içerisinde yüksek oranda ekspres olan ve inklüzyon cismi oluşturmayan bir proteinin arkasına füzyon yapılarak ekspresyonunun sağlanması yoluna gidildi. Bu amaçla daha önce laboratuvarımızda klonlanan ve karakterizasyonu yapılan *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisinin ribulokinaz enzimi kullanıldı. Oldukça yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan ribulokinaz enzimi, transferazlar içerisinde yer alan ve fosforlu grupların aktarımını sağlayan bir enzimdir. Metabolik olarak Pentoz Fosfat Yolu, Pentoz-Glukoronat dönüşümü, B6 vitamini metabolizması ve riboflavin metabolizmaları ara basamaklarında yer almaktadır.

2.3.9.1. Primer Dizaynı

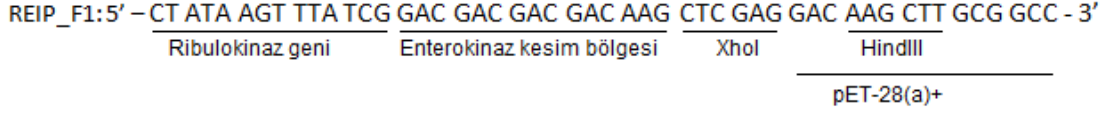
Ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörünü *iro* genini içerisine alacak hale getirebilmek için REIP_F1 ve REIP_R1 primerleri (Tablo 3, Şekil 6) dizayn edildi. Kalıp olarak ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörünün kullanıldığı PCR işlemi Bölüm 2.3.5.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Bu reaksiyon, ilk denatürasyon basamağı 95 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü DNA zincirinin denatürasyonu için 94 °C'de 1 dakika, primerlerin DNA'ya bağlanması (annealing) için 50 °C'de 1 dakika ve yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extention) için 72 °C'de 1,5 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

PCR işleminden sonra vektör üzerinde istenen değişikliklerin olup olmadığını belirlemek amacıyla DNA dizin analizi yapıldı.

Tablo 3. Ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörünü, *iro* genini içerisine alabilecek şekilde değiştirmek için kullanılan primerler

REIP_F1	5' – CT ATA AgT TTA TCg gAC gAC gAC gAC AAg CTC gAg gAC AAg CTT gCg gCC - 3'
REIP_R1	5' – ggC CgC AAg CTT gTC CTC gAg CTT gTC gTC gTC gTC CgA TAA ACT TAT AG – 3'

Iro geninin, Ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörü (pET/Rib) içerisine aktarılabilmesi için *Iro_F6* primerinin 5' ucunda bulunan *NdeI* kesim bölgesi, *XhoI* ile değiştirildi ve bu primer *Iro_F7* olarak isimlendirildi (*Iro_F7*: 5' – CTCGAGATG AGTGA GAACTGAAG -3').



Şekil 6: REIP_F1 primerinin içerdiği bölgeler.

2.3.9.2. *Iro* Geninin pET/Rib Vektörü İçerisine Klonlanması

Iro genini pET/Rib vektörü içerisinde bulunan *XhoI-HindIII* kesim bölgeleri arasına klonlayabilmek için, *XhoI* bölgesi içeren *Iro_F7* ileri primeri ile *HindIII* bölgesi içeren *IRR_2* geri primerleri kullanıldı. Kalıp DNA olarak, *A. ferrooxidans* M1 genomik DNA'sı kullanıldı. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.5.2'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünleri *XhoI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pET/Rib vektörüne klonlandı. Klonlama işlemi T4 DNA Ligaz (Promega) enzimi kullanılarak firmanın önerdiği koşullara göre gerçekleştirildi. Rekombinant enzimi taşıyan vektör *E.coli* BL21(DE3) suşuna CaCl₂ transformasyonu ile aktarıldı ve bu hücreler kanamisinli ortamda çoğaltıldı.

2.3.9.3. Rekombinant Proteinin Kesilmesi

Ribulokinaz/*Iro* rekombinant proteinini kesmek için enterokinaz enzimi kullanıldı. Kesim reaksiyonunda 1 mg/ml protein, 500 mM Tris-HCl (pH 7,5), % 1 Tween 80 ve 0,3 mg/ml enterokinaz enzimi kullanıldı. Reaksiyon hacmi steril ddH₂O ile 500 µl'ye

tamamlandı ve 25 °C’de 16 saat inkübe edildi. Kesim sonuçları % 15’lik SDS-PAGE’de yürütülerek görüntüledi.

2.3.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Füzyon proteini içeren (Ribulokinaz + Iro) pET-28a(+) vektörü (pET/Rib-iro), Bölüm 2.3.6.’da anlatıldığı şekilde *E.coli* BL21(DE3) suşuna aktarıldı ve enzim üretimi gerçekleştirildi. Üretilen proteinin füzyon olup olmadığının anlaşılması için, SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde füzyon proteini ile ribulokinaz proteini karşılaştırıldı. Ayrıca enterokinaz enzimi ile kesilen füzyon proteini de SDS-PAGE’de incelendi. Bunun için, proteinlerinden uygun miktarda (40 µg) alınarak bu ürüne eşit miktarda 2X muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl pH 6,8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6 β-merkaptoetanol) ilave edildikten sonra, numuneler 95 °C’de 5 dakika bekletildi ve Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %15’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi. 0.75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel coomassie brilliant blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1-2 saat boyandı. Yıkama-I (%50 Metanol, %10 Asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı. Bantlar belirginleşinceye kadar bekletildi ve jel görüntüsü bilgisayar ortamında dijital olarak kaydedildi.

2.3.11. Iro Proteininden Sinyal Peptidinin Çıkarılması

Iro proteini ile yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda gerek pET-28a(+) vektörüne tek başına klonlanan Iro proteininde gerekse füzyon halindeki Iro proteininde ekspresyona rastlanmadı.

Bazı hücre dışı proteinlerde ve membran proteinlerinde sinyal peptidi bulunmaktadır. Bu peptit, proteinin hücre dışına salınmasını veya membrana taşınmasını sağlar. Sinyal peptidine sahip olan proteinlerde bazı durumlarda ekspresyon bandı görülmemektedir. Proteinlerin doğal olarak sahip olduğu sinyal peptidi, konak hücre tarafından

tanınmayabilir ve bu nedenle peptidin peptidazlar tarafından kesilip uzaklaştırılması gerçekleşmez. Proteine bağlı kalan sinyal peptidi, proteinin ya çözünmeyen formda kalmasına neden olur ya da proteinin doğru bir şekilde katlanmasını engeller. İro da bir membran proteini olduğu için, sinyal peptidine sahip olabileceği ve ekspresyon bandının görülmesini bu peptidin engellediği düşünüldü. SignalP 4.1 (URL-2, 2013) programında yapılan taramada proteinin sinyal peptidine sahip olduğu belirlendi.

Sinyal peptidinin uzaklaştırılması için yeni bir primer dizayn edildi. Bu primer ile, peptidaz enziminin proteini kestiği aktif bölgeden itibaren genin çoğaltılması amaçlandı. Bu amaçla, İroF_AB ileri primeri (İroF_AB: 5'-AGATATCATATGGGGACCACGCC CAAGG-3') dizayn edildi. Bu primer, genin ekspresyon vektörüne klonlanabilmesi için yine *NdeI* kesim bölgesi içermektedir. Aynı zamanda PCR da çoğaltılan bölgenin ekspresyonunun sağlanabilmesi için, aktif bölgenin 5' ucuna primer vasıtası ile ATG kodonu eklendi.

Iro geninin sinyal peptidini uzaklaştırmak için, İroF_AB ileri ve IRR_2 geri primerleri kullanıldı. Kalıp DNA olarak *A. ferrooxidans* M1 genomik DNA'sı kullanıldı. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.5.2'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünleri *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pET-28a(+) vektörüne klonlandı. Klonlama işlemi T4 DNA Ligaz (Promega) enzimi kullanılarak firmanın ön gördüğü koşullar doğrultusunda gerçekleştirildi. Enzimi taşıyan vektör *E.coli* BL21(DE3) suşuna CaCl₂ transformasyonu ile aktarıldı ve bu hücreler kanamisinli ortamda büyütüldü.

E.coli BL21(DE3) suşuna aktarılan rekombinant plazmit Bölüm 2.3.7.'de anlatıldığı şekilde üretildi ve HisLink Protein Purification Resin (Promega) kolon maddesi kullanılarak saflaştırıldı.

2.3.12. Mutasyon Çalışmaları

Enzimin biyokimyasal özelliklerini endüstriyel uygulamalara daha uygun hale getirebilmek için, aktif bölgede olduğu tahmin edilen 3 ayrı amino asitte; Q9F, S21Y ve V22D mutasyonlarının yapılması planlandı. Sözü edilen mutasyonlar ile enzimin kararlılığında bir artışın olması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda Tablo 4'de belirtilen primerler tasarlandı.

Tablo 4. Mutasyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan primerler

Primer	Nükleotit dizisi
Q9F_F1	5' – GGCGGAAGTATTCTATCAGCCACACCCC – 3'
Q9F_R1	5' – GGGGTGTGGCTGATAGAA TACTTCCGCC -3'
S21Y/V22D_F1	5' – GGATCAGTGCTATGACTGCGCCAATTTTATTGC – 3'
S21Y/V22D_R1	5' – GCAATAAAATTGGCGCAGTCATAGCACTGATCC -3'

Iro geni üzerinde mutasyonların meydana getirilmesi için iki farklı primer seti kullanıldı. Aktif bölgedeki 9. amino asit olan glutamini fenilalanine dönüştürmek için IroF_AB - Q9F_R1 ve IRR_2 - Q9F_F1 primerleri kullanıldı. 21. Sıradaki amino asit olan serinin tirozine dönüştürülmesi ile 22. sıradaki valinin aspartik asite dönüştürülmesi aynı primer seti ile planlandı. Bunun için IroF_AB - S21Y/V22D_R1 ve IRR_2 - S21Y/V22D_F1 primerleri kullanıldı.

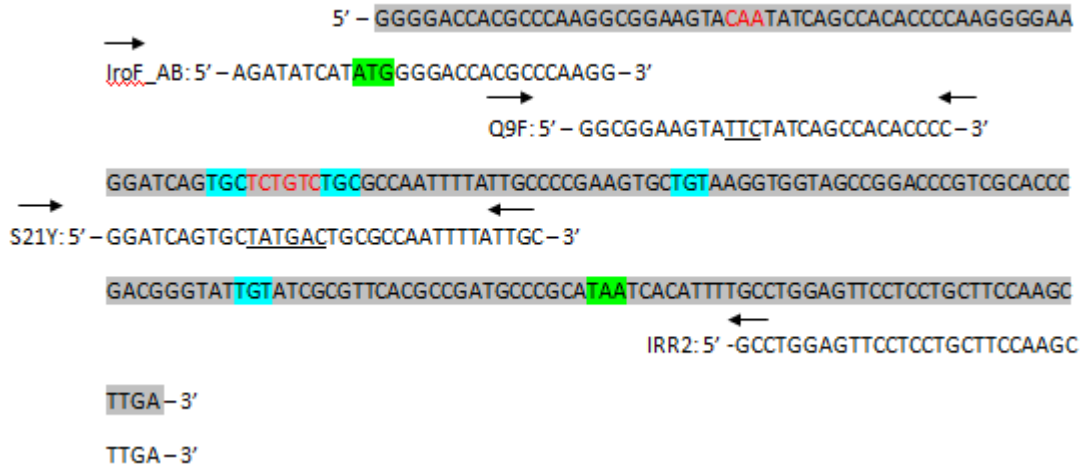
2.3.12.1. Q9F Mutasyonu

İlk aşamada IroF_AB ve Q9F_R1 primerleri kullanılarak, genin 5' ucundan yaklaşık 50 baz çiftlik kısmı çoğaltıldı. Diğer bir reaksiyonda ise IRR_2 ve Q9F_F1 primerleri kullanılarak genin yaklaşık 120 baz çiftlik 3' ucu çoğaltıldı. Daha sonra çoğaltılan bu iki fragment aynı PCR tüpüne alınarak, IroF_AB ve IRR_2 primerleri ile yeniden PCR gerçekleştirildi (Şekil 7). Bu şekilde baz dizileri değiştirilmiş iki fragmentin birbirine eklenmesi sağlandı. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.5.2'de anlatılan şartlar kullanıldı. Reaksiyon ürünleri pGEM-T Easy vektörüne klonlanarak plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitlerin dizi analizleri yapılarak ilgili mutasyonların olup olmadığı araştırıldı.

2.3.12.2. S21Y/V22D Mutasyonu

Bu işlemde ilk olarak IroF_AB ve S21Y/V22D_R1 primerleri ile, genin 5' ucundan yaklaşık 90 baz çiftlik kısmı çoğaltıldı. Diğer bir reaksiyonda IRR_2 ve S21Y/V22D_F1 primerleri kullanılarak genin yaklaşık 80 baz çiftlik 3' ucu çoğaltıldı. Çoğaltılan bu iki

fragment aynı PCR tüpüne uygun miktarda alınarak İroF_AB ve IRR_2 primerleri ile yeniden PCR'a tabii tutuldu. Bu şekilde baz dizileri değiştirilmiş iki fragmentin, mutant primerlerin üst üste geldiği bölgeden birbirine eklenmesi sağlandı. PCR şartları olarak Bölüm 2.3.5.2'de anlatılan şartlar kullanıldı. Reaksiyon ürünleri pGEM-T Easy vektörüne klonlanarak plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitlerin dizin analizleri yapılarak ilgili mutasyonların olup olmadığı araştırıldı.



Şekil 7. Mutasyon primerlerinin *iro* geni üzerindeki dağılımı. Yeşil bölgeler başlangıç ve stop kodonlarını; mavi bölgeler aktif bölgede görev yapan sisteinleri; kırmızı bölgeler ise mutasyon ile değiştirilen bazları göstermektedir.

2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

2.4.1. Protein Miktarı Tayini

Yapılan çalışmalarda protein miktarının belirlenebilmesi için Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metot kullanıldı. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanol içerisinde çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi ve saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 3 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya

çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler için BSA yerine 10 µl protein özütü kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm’de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.4.2. Enzim Aktivitesi Tayini

Iro enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için Lovenberg ve arkadaşları (1963) tarafından geliştirilen kolorimetrik metot modifiye edilerek kullanıldı. Bu metotta, enzimin substratı olarak Fe(II), aktiviteyi belirlemek için de α-phenanthrolin kullanıldı. Reaksiyon, 0,025 mg/ml FeSO₄, pH’sı 3,5 olan 100 mM potasyum hidrojen fitalat (KHP) tamponu, 5 mM amonyum peroksit sülfat (APS) ve 25 µg enzim olacak şekilde son hacim su ile 450 µl’ye tamamlandı. Oda sıcaklığında (25 °C) 5 dakika bekledikten sonra reaksiyona %0,3’lük α-phenanthrolin çözeltisinden 50 µl eklendi ve 380 ve 512 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı. α-phenanthrolin Fe(II) ile reaksiyona girer fakat Fe(III) ile tepkime vermez. Bu şekilde ortamda azalan Fe(II) miktarına bakılarak enzimin aktivitesinin belirlenmesi sağlandı. Fe(II) miktarı 512 nm’de, Fe(III) miktarı ise 380 nm’de ölçüldü. Reaksiyonda kullanılan şartlar (kullanılan enzim miktarı, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu vs.) enzimin biyokimyasal özellikleri belirlendikçe yeniden düzenlendi.

2.4.3. Yaban ve Muatnt Enzimlerin (Q9F ve S21Y/V22D) Karakterizasyonu

E.coli BL21 hücresi içerisine pET-28a(+) vektör sistemi ile aktarılan yaban tip Iro proteini ile Q9F ve S21Y/V22D mutasyonlarına sahip Iro proteinlerinin saflaştırılmasının ardından optimum sıcaklık, optimum pH ve zamana bağlı olarak kararlılık gibi özellikleri analiz edilerek, enzimlerin biyokimyasal karakterizasyonu belirlendi. Enzim karakterizasyonu ile ilgili tüm çalışmalar en az üç kez tekrar edildi.

2.4.3.1. Optimum Sıcaklık

Yaban ve mutant Iro enzimlerinin optimum sıcaklığının belirlenebilmesi için 0,025 mg/ml FeSO₄ varlığında, pH'sı 3,5 olan KHP tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar 0, 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 °C'lerde gerçekleştirildi.

2.4.3.2. Optimum pH

Acidithiobacillus ferrooxidans M1 suşunun yaban ve mutant Iro enzimlerinin aktivitesine pH'nın etkisi, 100 mM potasyum klorür tamponu (pH 2), 100 mM glisin tamponu (pH 3), 100 mM potasyum hidrojen fitalat tamponu (pH 3,5 ve 4), 100 mM asetat tamponu (pH 5 ve 5,5), 100 mM fosfat tamponu (pH 6- 6,5- 7) ve 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) kullanılarak belirlendi. Reaksiyonlar, oda sıcaklığında 25 °C'de 5 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

2.4.3.3. Enzim Kararlılığı

Enzimlerin zamana bağlı olarak kararlılığını belirlemek için 0, 5, 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda ölçümler gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 0,025 mg/ml FeSO₄ varlığında, pH'sı 3,5 olan KHP tamponu ile oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2.4.3.4. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Deterjan ve organik çözücülerin *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşunun yaban ve mutant Iro enzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzimler, 10 dk, % 1 (v/v) DMSO, β- merkptoetanol, etanol, izopropanol, 5 mM EDTA, DTT, SDS, Triton X-100, içerecek şekilde 100 mM potasyum hidrojen fitalat (pH 3,5) tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta 5 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü.

2.4.3.5. Enzim Kinetiği

Acidithiobacillus ferrooxidans M1 suşunun yaban ve mutant demir oksidazlarının kinetik verilerini hesaplamak için, 0,010-0,250 mg/ml arasında değişen substrat konsantrasyonlarında seri reaksiyonlar gerçekleştirildi. Enzim miktarı sabit tutulan reaksiyonlar potasyum hidrojen fitalat (pH 3,5) tamponu varlığında ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu belirlendi.

2.5. İstatistik Analizler

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 16.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlendi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Espiye bakır madeni (Giresun), Murgul bakır madeni (Artvin) ve Zigana köyü (Gümüşhane)'nde bulunan asidik su kaynaklarından alınan su örneklerinde asidofilik bakteriler arandı ve bunların tür tayini yapılmaya çalışıldı. Biyolojide yaygın olarak kullanılan *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın, her üç alandan alınan su örneklerinde de varlığı belirlendi. Bu bakteride demir oksidaz enzimi aktivitesi incelendi. Demir oksidaz geninin baz dizisi belirlendi ve enzim aktivitesinin artırılması amacı ile iki farklı mutasyon yapıldı. Yaban ve mutant enzimler pET-28a(+) vektörüne klonlanarak ekspres edildi ve aktiviteleri karşılaştırıldı.

3.1. İzolatların Kültürasyonu

Demir oksitleyici bakterilerin tanımlanması ve moleküler düzeyde incelenmesi amacı ile Giresun'un Espiye ilçesinde bulunan bakır madenlerinden su örnekleri temin edildi. pH'sı 2 ile 3 arasında değişen bu örnekler KR1, KR2, KR3, KR4, KR5, KR6, KR7, KR8, KR9 ve KR10 olarak isimlendirildi. Yine aynı amaçla Artvin'in Murgul ilçesinde bulunan bakır madeninden M1, M2 ve M3 olarak isimlendirilen üç farklı örnek; Gümüşhane'nin Zigana köyü yakınlarındaki asidik sulardan ise Z1, Z2 ve Z3 olarak isimlendirilen üç farklı örnek alındı. Bu örneklerin laboratuvar ortamında, Iron salts (TK) besiyerinde, 30 °C'de inkübasyonu sonucunda, 3 gün ila bir hafta içerisinde KR izolatlarının tamamında ve M1 ve Z2 izolatlarında çoğalma gözlemlendi (Şekil 8). Ayrıca KR2 izolatının 37 °C'de yapılan inkübasyonunda da çoğalma meydana geldi. İzolatların gelişimi sırasında ortamda bulunan Fe(II), Fe(III)'e dönüştüğü için sıvı besiyerinde turuncu renk (pas rengi) oluşumu gözlemlendi. Bu izolatlar saf kültürlerinin yapılabilmesi için FeTSB katı besiyerine ekildi. Aynı renk oluşumu katı besiyeri yüzeyinde de görüldü (Şekil 9).

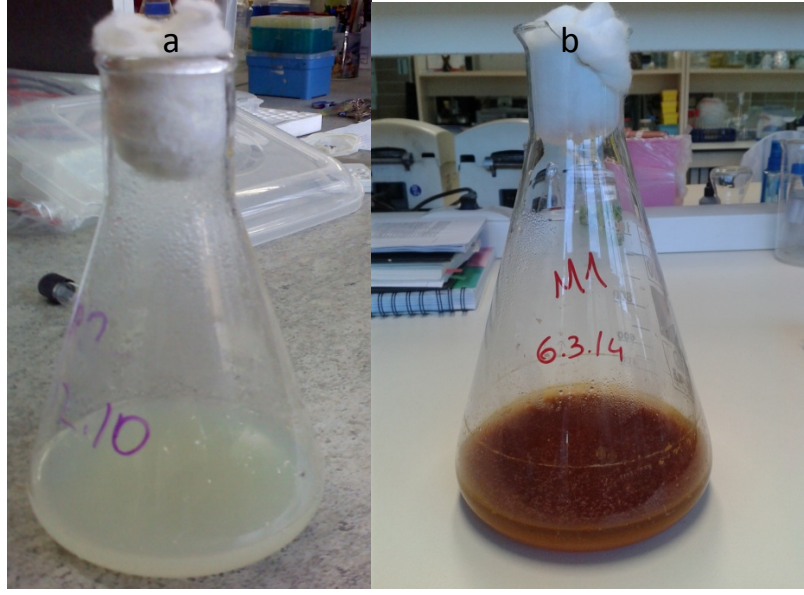
3.2. İzolatların Morfolojik Özellikleri

Her üç bölgeden izole edilen asidofilik bakteri izolatlarının saf kültürleri yapıldıktan sonra morfolojik özellikleri belirlendi. İncelenen 12 izolatın da basil morfolojisine sahip olduğu, Gram negatif boyanma özelliği gösterdiği ve spor oluşturmadığı görüldü.

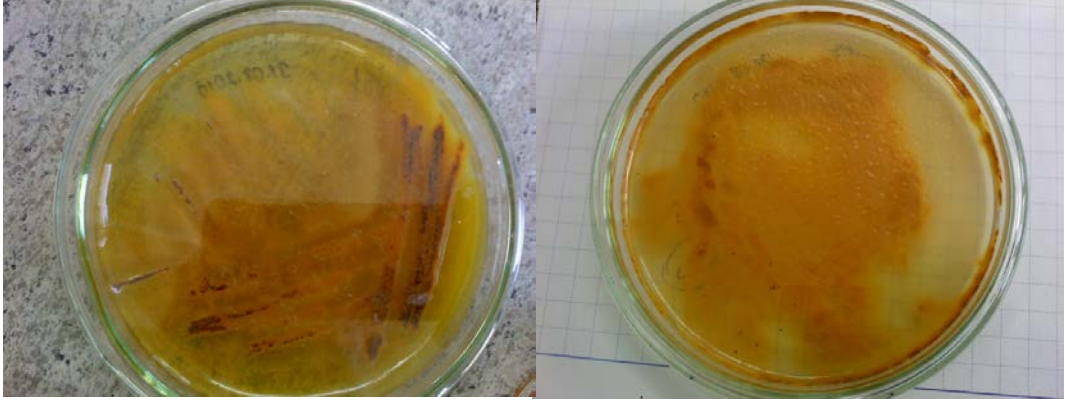
3.3. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri

Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılmasında gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımıdır. Bu amaçla, asidik ortamlardan elde edilerek Fe(II) içeren besiyerinde çoğaltılan izolatların genomik DNA'ları izole edildi. Bu izolatların 16S rRNA genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank'ta var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalar sonucunda, dört farklı izolatın (KR1, KR5, M1 ve Z2) çalışmanın amacı doğrultusunda aranan bakteri olan *Acidithiobacillus ferrooxidans* türüne ait suşlar olduğu belirlendi. Enzim düzeyindeki çalışmalara *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu ile devam edildi. Ayrıca alınan su örneklerinden genomik DNA'sı elde edilen 3 izolatın *Acidiphilium multivorum*, bir izolatın *Acidocella aluminiidurans*, bir izolatın *Acidithiobacillus ferrovirans*, bir izolatın *Acidocella facilis* ve iki izolatın da *Acidocella sp.* türlerine ait olduğu belirlendi (Tablo 5).

KR1 kodlu su örneğinin 30 °C'deki inkübasyonu sonucunda elde edilen genomik DNA'dan 16S rRNA gen analizi yapıldığında, tanımlanan bakteri türünün *Acidithiobacillus ferrooxidans* olduğu belirlendi. Bu su örneği, 37 °C'de inkübe edildiğinde yine gelişim gösterdi. Ancak bu sıcaklıktaki inkübasyon sonucunda elde edilen bakteri kültürünün genomik DNA'sının izole edilmesi ve 16S rRNA gen analizi yapılması sonucunda, izole edilen genomik DNA'nın *Leptospirillum ferrooxidans* türüne % 99 benzediği görüldü. Aynı su örneği 10 g/l pirit içeren besiyerinde, 55 °C'de inkübe edildiğinde ise ortamda gelişen bakteri türünün *Sulfolobus metallicus* türüne % 95 oranında benzediği görüldü. Buna dayanarak KR1 kodlu su örneğinin karışık bir kültür olduğu ve sıcaklık değiştiğinde baskın olan mikroorganizmanın da değiştiğine karar verildi.



Şekil 8. Iron salts (TK) besiyeri içerisinde bir haftalık inkübasyon sonucunda asidofilik bakterilerin gelişimi. Pas rengi oluşumu, ortamdaki Fe^{+2} 'nin asidofilik mikroorganizmalar tarafından Fe^{+3} 'e dönüştürüldüğünü göstermektedir (a: İnkübasyon öncesi besiyerinin rengi, b: İnkübasyon sonrası oluşan renk).



Şekil 9. FeTSB besiyeri içerisinde asidofilik mikroorganizmaların gelişimi.

Tablo 5. Asidik kaynaklardan alınan izolatların 16S rRNA gen dizilerine göre GenBank'ta bulunan bakterilere benzerlik oranları (Büyütme ortamı; TK besiyeri, 30 °C).

İzolat	GenBank'ta benzediği tür	Benzerlik (%)
KR1	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99
KR2	<i>Acidiphilium multivorum</i>	99
KR3	<i>Acidiphilium multivorum</i>	99
KR4	<i>Acidocella sp.</i>	99
KR5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	97
KR6	<i>Acidiphilium multivorum</i>	94
KR7	<i>Acidocella aluminiidurans</i>	99
KR8	<i>Acidithiobacillus ferrovirans</i>	99
KR9	<i>Acidocella facilis</i>	99
KR10	<i>Acidocella sp.</i>	99
Z2	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99
M1	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99

3.4. *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşuna Ait Demir Oksidaz Kodlayan *iro* Geninin PCR ile Çoğaltılması ve Klonlanması

Demir oksidaz proteinini kodlayan *iro* genini elde etmek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak Iro_ F6/ IRR_2 primerleri ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen DNA fragmenti pGEM-T Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Genin dizi analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla (Macrogen, Hollanda) gerçekleştirildi. Dizin analizi sonucunda elde edilen 321 bç'lik fragmentin *iro* genine ait olduğu teyit edildi. Elde edilen baz dizini Ek 1.'de verilmiştir.

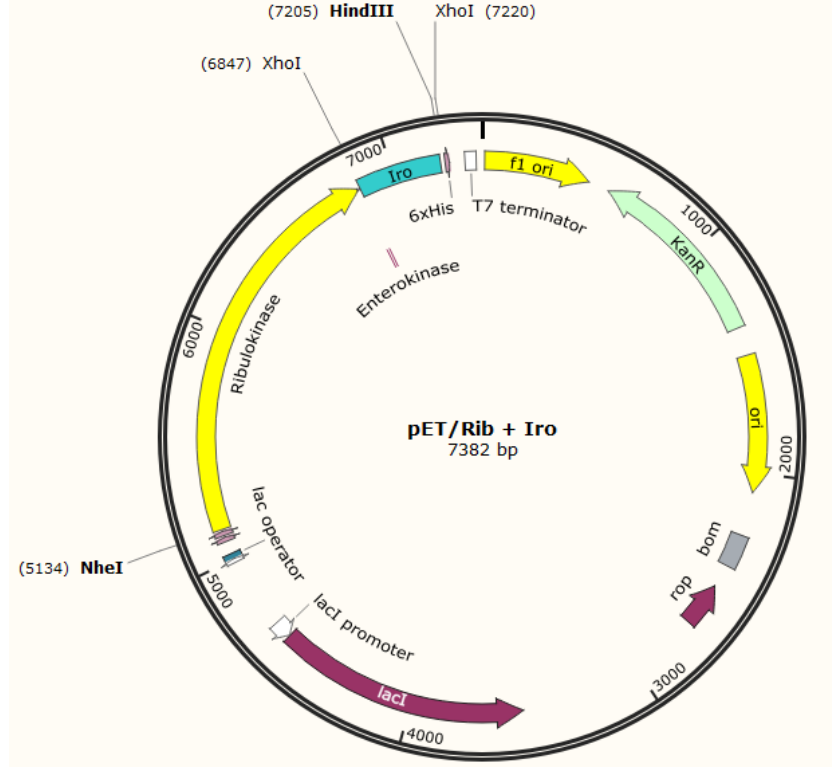
3.5. Demir Oksidaz Proteinini Kodlayan *iro* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması

E.coli BL21/pETiro sistemi kullanılarak üretilmesi amaçlanan enzim, uygun şartlarda IPTG indüklemesiyle üretilerek saflaştırıldı. Ancak SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda ekspresyon bandına rastlanmadı. İnkübasyon süresinin uzatılması, sıcaklığın azaltılması, IPTG konsantrasyonunda değişikliğe gidilmesi de ekspresyonu sağlayamadı. Bu nedenle, enzim ekspresyon seviyesinin düşük olduğu düşünülerek ekspresyonu artırmak için füzyon proteini oluşturma yoluna gidildi. Bu amaçla, *iro* geni

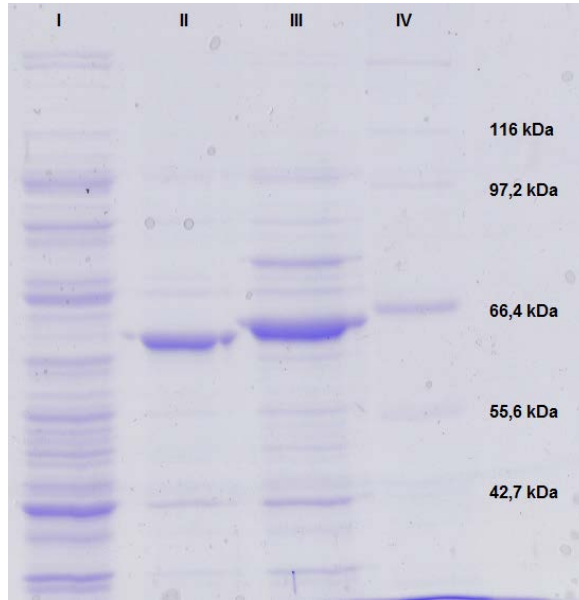
ekspresyonu oldukça yüksek olan ve laboratuvarımızda daha önce çalışılmış olan Ribulokinaz geni ile birleştirildi.

3.6. *Iro* Geninin Ribulokinaz Geni ile Birleştirilmesi Sonucunda Oluşan Füzyon Proteini

Iro geni ekspresyonunun artırılması için, *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisine ait ribulokinaz genini içeren pET-28a(+) vektörü içerisine aktararak füzyon geni oluşturuldu (Şekil 10). Elde edilen baz dizini Ek 2.'de gösterilmiştir. Füzyon geni taşıyan vektör *E.coli* BL21 hücresi içerisine aktararak ekspresyon sağlandı ve protein, HisLink Protein Purification Resin (Promega) kolon maddesi kullanılarak saflaştırıldı. SDS-PAGE'de yürütülen füzyon proteini orijinal ribulokinaz proteini ile karşılaştırıldı ve *iro* proteinin ribulokinaz proteini ile birlikte ekspres edildiği gözlemlendi (Şekil 11). Ribulokinaz enzimi saf halde 61,96 kDa iken füzyon proteinin ağırlığı yaklaşık olarak 65 kDa olarak görüldü. Ancak füzyon proteininde yine demir oksidasyon aktivitesi gözlenmedi. Proteinin füzyon halinde olmasının aktiviteyi inhibe ettiği düşünülerek, füzyon proteini enterokinaz enzimi ile kesildi. Kesim sonucunda yine demir oksidaz aktivitesine rastlanmadığından *Iro* proteininin ekspresyon sonrasında doğru bir şekilde katlanmadığına karar verildi. Bu doğrultuda *iro* geninin sahip olduğu sinyal peptidinin proteinin doğru katlanmasını ve dolayısı ile aktiviteyi engellediği düşünülerek sinyal peptidinin uzaklaştırılması yoluna gidildi. Sinyal peptidinin uzaklaştırılması için füzyon proteini ile çalışmaya devam edilmeyerek, *iro* geni *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu genomik DNA'sından yeniden çoğaltıldı.



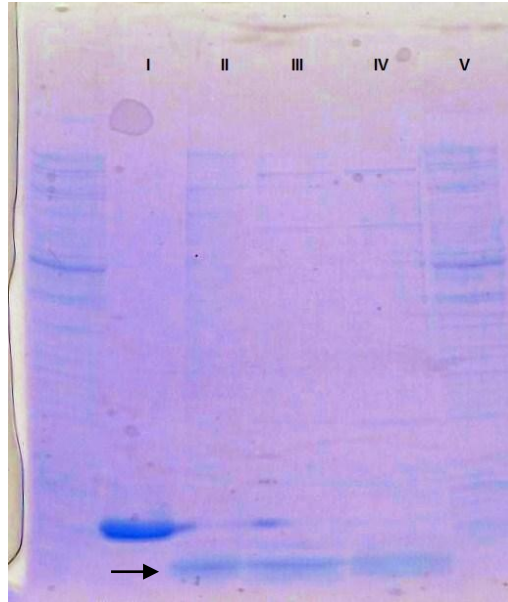
Şekil 10. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinaz geni ile *A. ferrooxidans* *iro* geninin pET-28a(+) vektörü içerisinde SnapGene Viewer programı kullanılarak gösterilmesi.



Şekil 11. *A. kestanbolensis* AC26 Sarı ribulokinazı ile ribulokinaz-*iro* füzyon proteininin SDS-PAGE'de karşılaştırılması. I: Sadece pET-28a(+) vektörü içeren 1 mM IPTG ile indüklenmiş hücre özütü, II: Safaştırılmış ribulokinaz proteini, III: Safaştırılmış füzyon proteini, IV: Protein markır.

3.7. Sinyal Peptidi Çıkarılan Demir Oksidaz Proteini

SignalP 4.1 (URL-2, 2013) programında yapılan taramada Iro proteininin sinyal peptidine sahip olduğu belirlendi. Programda yapılan analize göre Iro proteininin ilk 52 amino asidi sinyal peptidine tekabül etmektedir ve protein sentezlendikten sonra proteinazlar tarafından kesilerek atılmaktadır. *E. coli* BL21 hücresi içerisinde bu sinyal peptidini uzaklaştıracak bir sistem olmadığı için, bu kısmın PCR yolu ile genden uzaklaştırılmasına karar verildi. Bu amaçla, gende sinyal peptidini kodlayan ilk 156 bazı uzaklaştırmak için uygun primerler dizayn edildi ve bu primerlerle elde edilen *iro* geni tekrar pET-28a(+) vektörü içerisine aktarıldı. Sinyal peptidini içermeyen *iro* geninin bazı dizileri Ek 3.'de verilmiştir. *Iro* genini içeren rekombinant pET-28a(+) plazmidi (pIro-WT) *E. coli* BL21 hücresi içerisine aktarıldı ve genin ekspresyonu sağlandı. HisLink Protein Purification Resin (Promega) kolon maddesi ile saflaştırılan protein SDS-PAGE elektroforez sistemi ile görüntülendi (Şekil 12). Ekspresyon bandı görülen proteinin moleküler ağırlığı ExPASy programı (URL-3, 2013) kullanılarak hesaplandı. Buna göre Iro proteininin moleküler ağırlığının 5,33 kDa olduğu belirlendi.



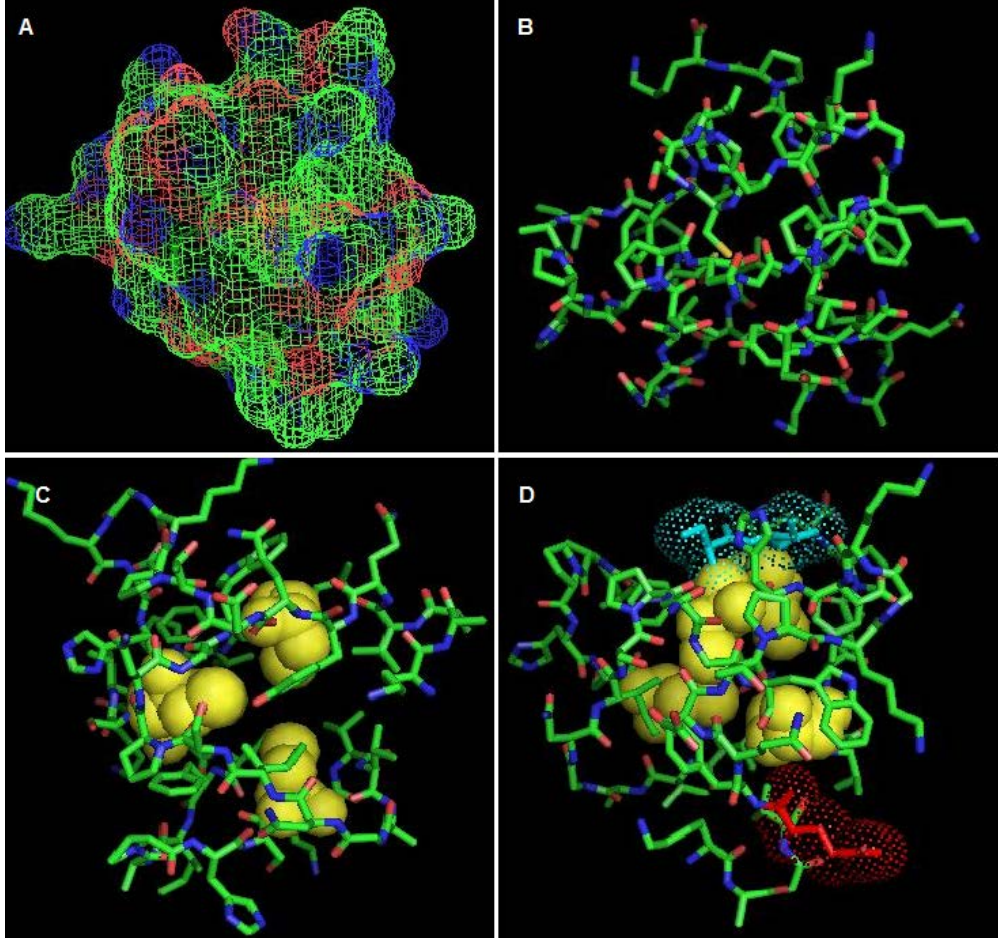
Şekil 12. *A. ferrooxidans* M1 suşu yaban Iro proteini, Q9F mutan ve S21Y/V22D mutanının SDS-PAGE analizi. I: Lizozim (Markır olarak kullanılmıştır), II: Yaban tip Iro proteini, III: Q9F mutan, IV: S21Y/V22D mutan, V: Sadece pET-28a(+) vektörü içeren indüklenmiş hücre özütü.

3.8. Mutant Demir Oksidazlar

Bu tez kapsamında, Iro proteininin aktif bölgesinde bulunan sistein amino asitlerinin arasında bulunan iki amino asitte ve proteinin dış yüzeyinde bulunan ve türler arasında yüksek oranda korunmuş olan bir diğer amino asit açısından da mutasyon gerçekleştirildi. Bu mutasyonların ilkinde Iro proteininin 9. amino asidi olan polar yapıdaki glutamin (Q), hidrofobik olan fenilalanin (F) ile değiştirildi. Diğerinde ise yan yana olan serin (S) ve valin (V) amino asitleri değiştirildi. Iro proteininin 21. pozisyonunda olan hidrofilik S, hidrofobik olan tirozin (Y) ile; 22. pozisyonundaki hidrofobik V ise kuvvetli tuz köprüleri oluşturan aspartik asit (D) ile değiştirildi. Mutasyonların sonuçlarını doğrulamak için, her mutant enzimin genini taşıyan plazmitin baz dizin analizi yapıldı ve orijinal sıra ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak mutasyonlar başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Mutant genlerin baz dizileri Ek 5. ve Ek 6.'da verilmiştir. Daha sonra bu mutant genler pET-28a(+) vektörü içerisine aktarıldı ve *E. coli* BL21 hücresi içerisine ekspresyon sağlandı. Q9F mutantını taşıyan plazmit pIro-Q9F, S21Y/V22D mutantını taşıyan plazmit de pIro-S21Y/V22D olarak isimlendirildi. Saflaştırılan mutant proteinler SDS-PAGE'de yürütülerek varlıkları teyit edildi (Şekil 12).

3.9. İro Proteininin Üç Boyutlu Yapısı

E. coli BL21 (DE 3) hücresi içerisine aktarılarak ekspresyonu sağlanan Iro proteininin amino asit dizileri ExpASy programı kullanılarak belirlendi ve GenBank'ta bulunan dizilerle karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda *A. ferrooxidans* M1 suşu Iro proteininin, *A. ferrooxidans* (ATCC 23270) suşu demir oksidaz proteinine % 94 oranında benzediği belirlendi. Proteinin üç boyutlu yapısı PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) programı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 13).



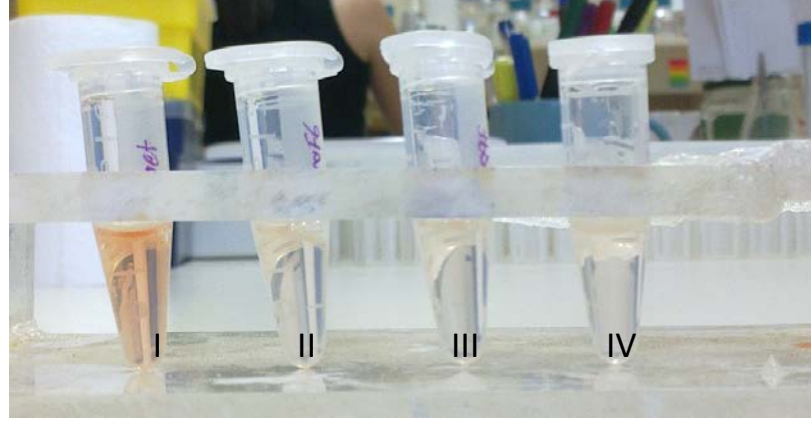
Şekil 13. *A. ferrooxidans* (ATCC 23270) demir oksidaz (EC = 1.16.3) proteininin üç boyutlu yapısı (UniProt no: B7J8G3). A: Proteinin kaba yapısı, B: Proteinin açık yapısı, C: Proteinin aktif bölgesinde bulunan sisteinler sarı renkli küreler halinde gösterilmiştir, D: Protein üzerinde mutasyonla değiştirilen amino asitler noktali alanlar halinde gösterilmiştir (Kırmızı noktali alan Q9F mutasyonu ile fenilalanine dönüştürülen glutamini, mavi noktali alan S21Y/V22D mutasyonu ile tirozine dönüştürülen serin ile aspartik asite dönüştürülen valini göstermektedir).

3.10. Enzimlerin Karakterizasyonu

3.10.1. Demir Oksidaz Aktivitesi

Yaban ve mutant *Iro* proteinlerinde demir oksidaz aktivitesini belirleyebilmek için kolorimetrik metot kullanıldı. α -fenantrolin varlığında Fe(II) turuncu renk vermektedir. Enzim varlığında Fe(II), Fe(III)'e yükseltgeneceği için miktarı azalacak ve reaksiyon tüplerinde rengin açılması beklenecektir. Yapılan çalışmalarda, enzim varlığında oluşan rengin, enzim içermeyen tüplere göre daha açık olduğu görüldü. Negatif kontrol olarak

sadece pET-28a(+) vektörü içeren indüklenmiş hücre özütünün HisLink Protein Purification Resin ile saflaştırılmış hali kullanıldı (Şekil 14). Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 512 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerde de negatif kontrolde oldukça yüksek absorbans değeri elde edilirken, enzim içeren tüplerde absorbansın azaldığı görüldü (Tablo 6).



Şekil 14. Yaban ve mutant Iro proteinlerinde demir oksidaz aktivitesi. I: Sadece pET-28a(+) vektörü içeren indüklenmiş *E.coli* BL21 (DE 3) hücre özütü, II: Yaban tip Iro proteini (*AfeIro-WT*), III: Q9F mutanı (*AfeIro-Q9F*), IV: S21Y/V22D mutanı (*AfeIro-S21Y/V22D*).

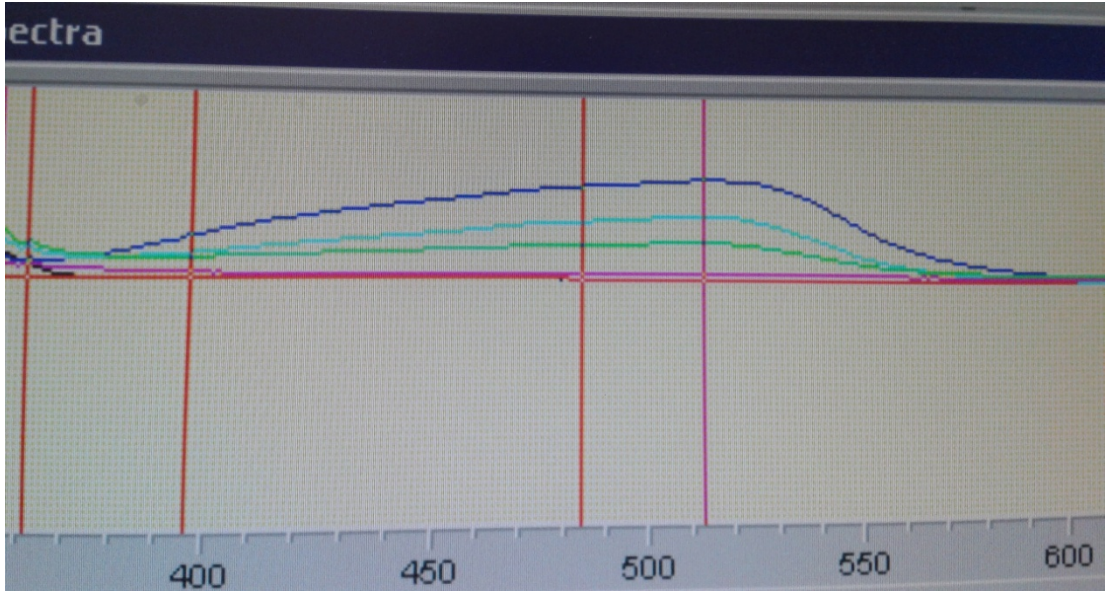
3.10.2. Aktivite Deneyinde Kullanılan Kimyasalların Reaksiyona Etkileri

Demir oksidaz aktivitesini belirlemek için kullanılan kolorimetrik metotta, renk değişiminin enzim kaynaklı olduğundan emin olmak için bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Bu reaksiyonların her birinde kullanılan maddelerden biri eksiltildi. Ölçümler spektrofotometrik olarak 512 nm'de yapıldı. Aktivite deneyinde enzimin substratı olarak Fe(II), aktiviteyi belirlemek için α -fenantrolin, tampon olarak pH'sı 3,5 olan 100 mM potasyum hidrojen fitalat (KHP) tamponu, reaksiyonu katalizlemek için 5 mM amonyum peroksit sülfat (APS), 25 μ g enzim ve su kullanılmaktadır. Bu deneyler sonucunda, ortamda KHP tamponu veya α -fenantrolin bulunmadığı zaman, Fe(II) miktarının ölçülemediği, APS bulunmadığı zaman ise reaksiyonun gerçekleşmediği görüldü. Enzim içermeyen tüplerde, APS varlığından dolayı oksidasyon olduğu görüldü. Ancak ortama enzim eklendiğinde Fe(II) miktarının önemli ölçüde azaldığı spektrofotometrik olarak gözlemlendi (Şekil 15).

Tablo 6. *A. ferrooxidans* M1 yaban tip ve mutant demir oksidazların spektrofotometrede 512 nm dalga boyundaki değerleri

Enzim	Spektrofotometrik ölçümler (512 nm)		
	I.ölçüm	II.ölçüm	III.ölçüm
Negatif kontrol [<i>E. coli</i> BL21/ pET-28a(+)]	0,230	0,194	0,229
<i>A. ferrooxidans</i> WT (AfeIro-WT)	0,0803	0,0425	0,0562
<i>A. ferrooxidans</i> Q9F (AfeIro-Q9F)	0,0817	0,0491	0,0564
<i>A. ferrooxidans</i> S21Y/V22D (AfeIro-S21Y/V22D)	0,0788	0,0423	0,0509

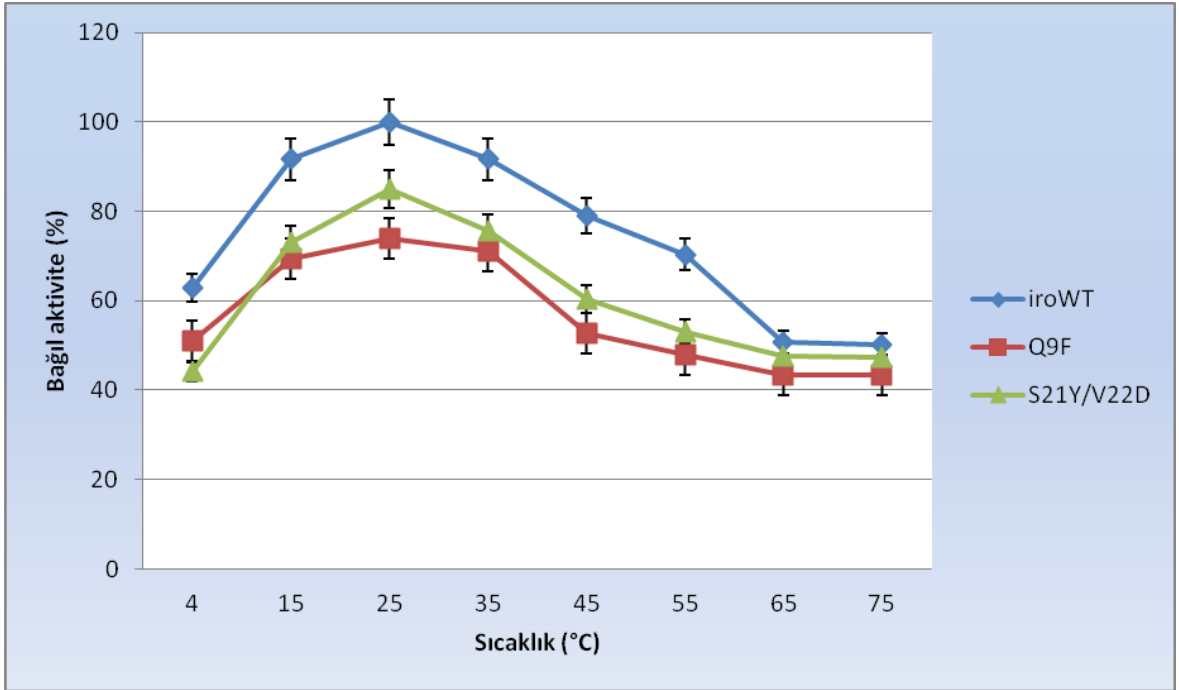
Enzim içermeyen reaksiyonların 512 nm dalga boyundaki ölçümlerinde ortalama olarak 0,200 absorbans değeri elde edildi. APS içermeyen reaksiyonlarda ise bu değer 0,300'e kadar çıkmaktadır. Bu doğrultuda reaksiyondaki Fe(II)'nin gerçek miktarı APS'siz ortamda ölçüldü. Ancak enzim aktivitesinde katalizör olarak APS'ye ihtiyaç duyulduğundan, APS içeren fakat enzim içermeyen reaksiyonun absorbans değeri, enzim aktivitesinin görülmediği nokta olarak kabul edildi.



Şekil 15. Aktivite deneyinde kullanılan kimyasalların reaksiyona etkileri. Koyu mavi: APS'siz, Açık mavi: Enzimsiz, Yeşil: Normal reaksiyon, Pembe: α -phenanthroline'siz, Kırmızı: KHP'siz, Siyah: Fe(II)'siz reaksiyon.

3.10.3. Optimum Sıcaklık

AfeIro-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının optimum sıcaklığını belirlemek için 0, 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75 °C’lerde enzim aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi. Sıcaklık-aktivite grafiği oluşturulması sonucu her üç enzimin de optimum sıcaklığı 25 °C olarak belirlendi (Şekil 16). Bu sıcaklıkta en iyi aktiviteyi *AfeIro*-WT verirken, en düşük aktivite ise *AfeIro*-Q9F’de gözlemlendi.

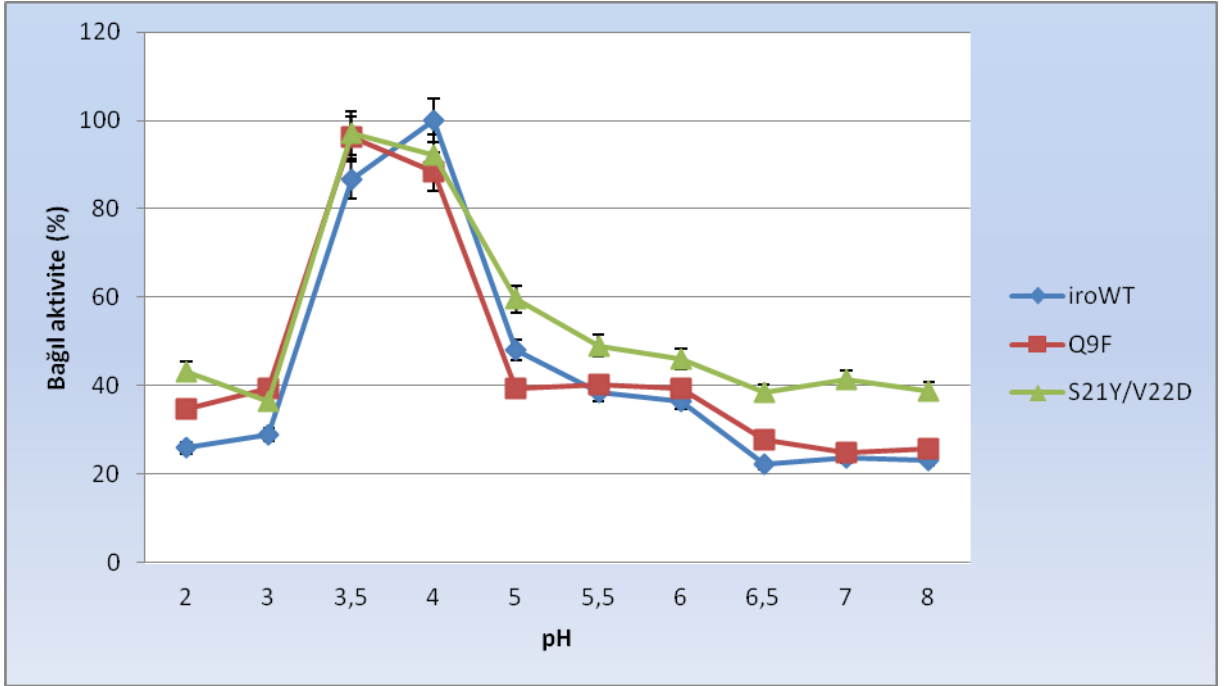


Şekil 16. *AfeIro*-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının optimum sıcaklıkları

3.10.4. Optimum pH

AfeIro-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacı ile 100 mM potasyum klorür tamponu (pH 2), 100 mM glisin tamponu (pH 3), 100 mM potasyum hidrojen fitalat tamponu (pH 3,5 ve 4), 100 mM asetat tamponu (pH 5 ve 5,5), 100 mM fosfat tamponu (pH 6- 6,5- 7) ve 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) kullanıldı. Sonuç olarak enzimin 100 mM potasyum hidrojen fitalat tamponunun (pH 3,5 ve 4) kullanıldığı reaksiyonlarda aktivite verdiği, diğer

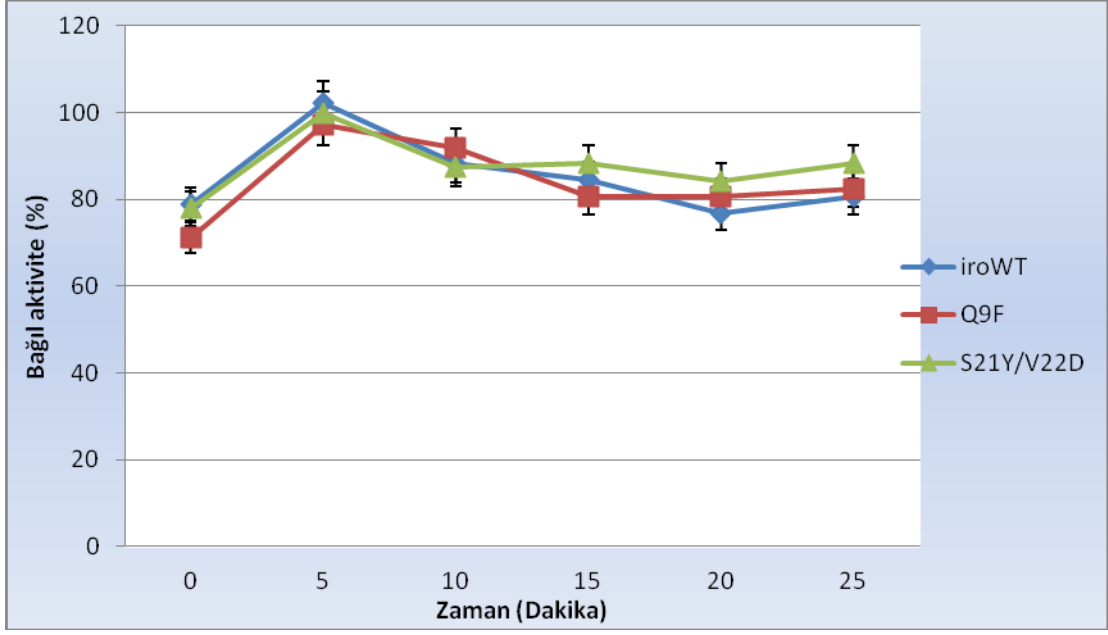
tamponlarda ise aktivite olmadığı gözlemlendi (Şekil 17). Potasyum hidrojen fitalat tamponunun pH aralığı oldukça dar olduğu için daha düşük ve yüksek pH'larda kullanılamamıştır. Bu aralıklar dahilinde *AfeIro*-WT aktivitesi pH 4'de daha fazla iken *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D aktivitesinin pH 3,5'da daha yüksek olduğu tespit edildi. pH 3,5'da yapılan ölçümlerde en düşük aktiviteyi *AfeIro*-WT gösterirken, en iyi aktivite *AfeIro*-S21Y/V22D'de görüldü. pH 4'deki ölçümlerde ise en yüksek aktivite *AfeIro*-WT'de, en düşük aktivite ise *AfeIro*-Q9F'de gözlemlendi.



Şekil 17. *AfeIro*-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının optimum pH'ları

3.10.5. Enzim Kararlılığı

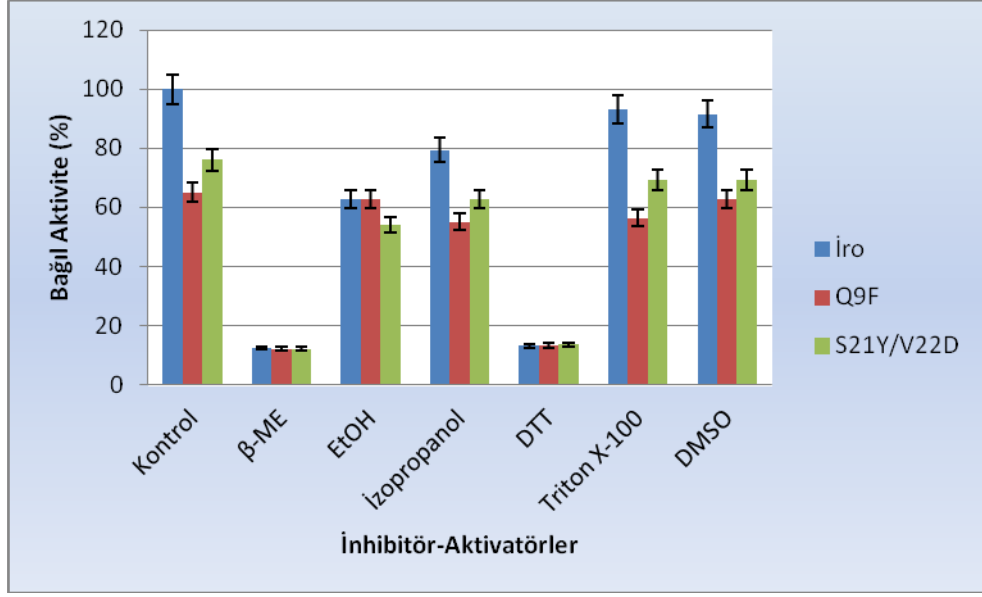
AfeIro-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidaz enzimlerinin zamana bağlı olarak kararlılığını belirlemek için 0, 5, 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda ölçümler gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında yapılan ölçümler sonucunda her üç enzim de maksimum aktiviteyi 5. dakikada gösterdi. Yaban tip demir oksidaz enzimi ve Q9F mutantında 10. dakikada aktivitenin azalmaya başladığı ve 15. dakikadan sonra önemli derecede düştüğü belirlendi. S21Y/V22D mutantında ise 10. dakikada enzim aktivitesi azalmakla beraber ilerleyen sürelerdeki ölçümlerde daha fazla bir düşüş gözlemlenmedi (Şekil 18).



Şekil 18. *AfeIro*-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının kararlılığı

3.10.6. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *A. ferrooxidans* M1 suşu yaban tip ve mutant demir oksidaz aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Enzimler bu kimyasallarla muamele edildikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı ve % kalan aktiviteleri hesaplandı (Şekil 19). EDTA ve SDS varlığında reaksiyon gerçekleşmediği için bu iki kimyasal inhibitör-aktivite grafiğine alınmadı.



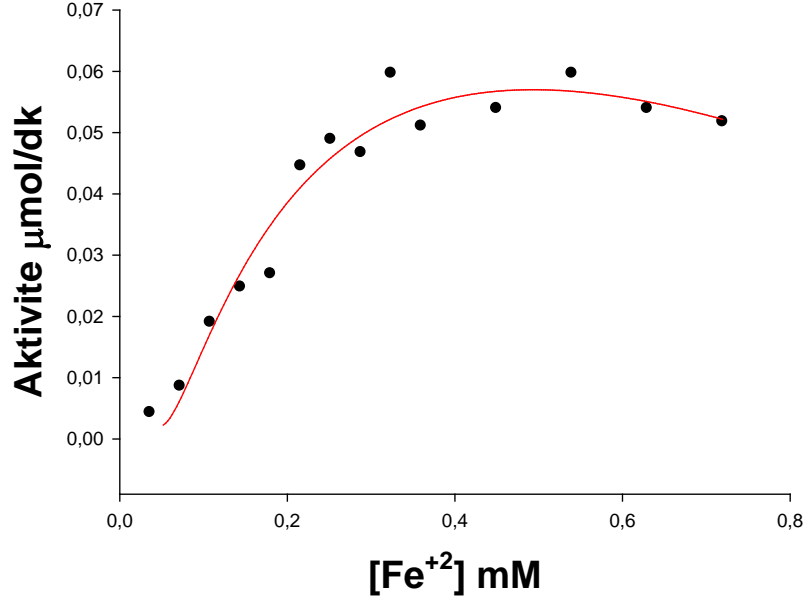
Şekil 19. İnhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri

3.10.7. Kinetik İncelemeler

AfeIro-WT, *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D demir oksidazlarının kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Fe(II)] kullanıldı. Substrat konsantrasyonu-aktivite grafiği çizilerek enzimlerin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi.

3.10.7.1. *AfeIro*-WT Demir Oksidazı

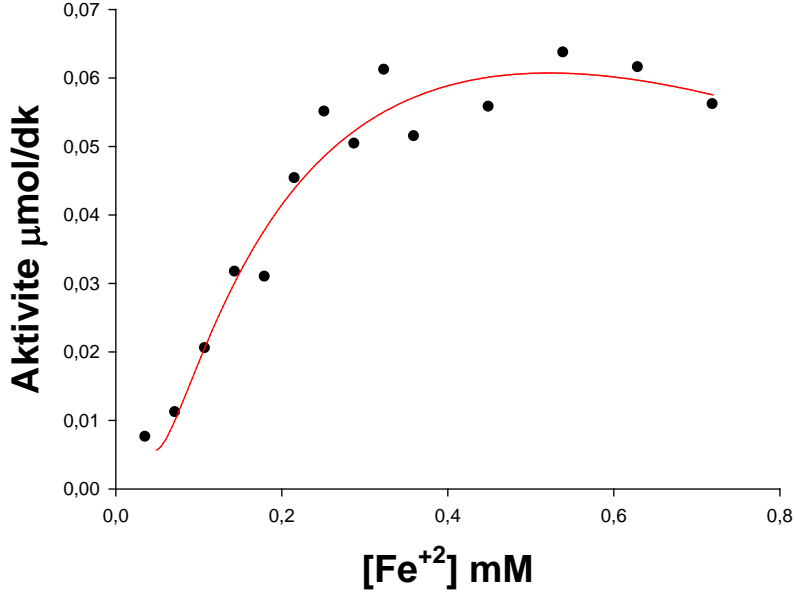
OriginPro 8.1 programı kullanılarak hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *E.coli* BL21/pIro-WT sistemi içerisinde çoğaltılarak saflaştırılan yaban tip Iro proteininin Fe(II) için K_m değeri $0,27 \pm 0,09$ mM ve V_{max} değeri ise $0,083 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplandı (Şekil 20). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 0,29 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 1,07 olarak hesaplandı.



Şekil 20. *AfeIro*-WT demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi

3.10.7.2. *AfeIro*-Q9F Demir Oksidazı

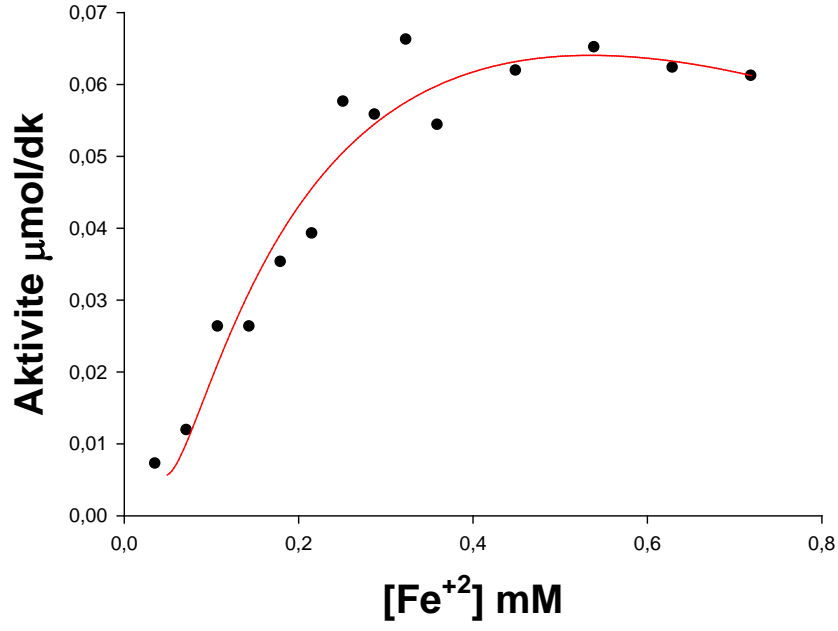
AfeIro-Q9F demir oksidazı için, OriginPro 8.1 programı kullanılarak hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *E.coli* BL21/pIro-Q9F'den elde edilen Q9F mutasyonuna sahip Iro proteininin Fe(II) için K_m değeri $0,25 \pm 0,07$ mM ve V_{max} değeri ise $0,087 \pm 0,01$ μmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 21). Enzimin k_{cat} değeri 0,30 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 1,21 olarak hesaplandı.



Şekil 21. *AfeIro-Q9F* demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi

3.10.7.3. *AfeIro-S21Y/V22D* Demir Oksidazı

OriginPro 8.1 programı kullanılarak hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *E.coli* BL21/pIro-S21Y/V22D'den elde edilen S21Y/V22D mutasyonuna sahip Iro proteininin Fe(II) için K_m değeri $0,27 \pm 0,07$ mM ve V_{max} değeri ise $0,094 \pm 0,01$ μmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 22). Bu veriler doğrultusunda enzimin k_{cat} değeri 0,33 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 1,22 olarak hesaplandı.



Şekil 22. *AfeIro-S21Y/V22D* demir oksidazının Michaelis-Menten eğrisi

3.11. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizlerle Doğrulanması

AfeIro-WT, *AfeIro-Q9F* ve *AfeIro-S21Y/V22D* enzimlerinin optimum sıcaklık, optimum pH, enzim kararlılığı ve kinetik analizlerinde elde edilen veriler, SPSS paket programı içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçların doğruluğu, istatistiksel analizlerle teyit edildi.

4. TARTIŞMA

Asidofilik mikroorganizmalar, yer kabuğunda bulunan değerli metallerin depolanmasında ve ayrıştırılmasında önemli bir role sahip olduklarından, endüstriyel açıdan önem taşımaktadırlar. Günümüzde bakteriler vasıtası ile düşük tenörlü cevherlerden metal kazanımı oldukça yaygındır. Bu işlem Biyo-madencilik olarak adlandırılmaktadır ve dünyanın birçok yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyo-madencilikte en yoğun olarak kullanılan mikroorganizmalardan birisi *Acidithiobacillus ferrooxidans*'tır. Bu bakteri yer kabuğu üzerinde çok geniş bir yayılışa sahiptir ve pH'sı 2 ile 3 arasında değişen asidik sulardan kolaylıkla izole edilebilmektedir.

Bu çalışmada, terk edilmiş bir maden olan Espiye Bakır Madeni (Giresun), hala işler durumda olan Murgul Bakır Madeni (Artvin) ve Gümüşhane'nin Zigana Köyünde bulunan asidik su kaynaklarından su örnekleri alındı. Bu su örneklerinde asidofilik bakterilerin varlığı incelendi. Bilinmeyen bir bakterinin sınıflandırılmasında ilk ve temel adım 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin belirlenmesidir (Lilburn ve Garrity, 2004). Tez kapsamında farklı kaynaklardan izole edilen 12 farklı izolatın tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla 16S rRNA genleri incelendi. PCR yardımıyla arttırılan 16S rRNA genleri uygun bir vektöre klonlandıktan sonra baz dizilerinin ortaya çıkarılması için baz dizinin analizi yapıldı. Dizin analizi sonucunda elde edilen gen dizilerinin GenBank'ta var olan bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılması sonucunda, 4 izolatın *Acidithiobacillus ferrooxidans*, 3 izolatın *Acidiphilium multivorum*, bir izolatın *Acidocella aluminiidurans*, bir izolatın *Acidithiobacillus ferrovirans*, bir izolatın *Acidocella facilis* ve iki izolatın da *Acidocella sp.* türlerine ait olduğu belirlendi. *Acidithiobacillus ferrooxidans* türünün her üç alandan alınan su örneklerinde de bulunması, bu bakterinin asidik ortamlarda oldukça yaygın olarak bulunduğu bilgisini teyit etmektedir.

Espiye bakır madeninden temin edilen KR1 kodlu su örneği Iron Salts (TK) besiyeri içerisinde 30 °C'de inkübe edildiğinde, elde edilen bakteri türü *Acidithiobacillus ferrooxidans* olarak tanımlandı. Aynı su örneği, aynı besiyeri içerisinde 37 °C'de inkübe edildiğinde ise elde edilen bakteri türü *Leptospirillum ferrooxidans* olarak belirlendi. Bu veriler doğrultusunda, kültürün karışık olduğuna, ortam sıcaklığına bağlı olarak baskın duruma geçen mikroorganizmanın değiştiğine karar verildi. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

20-35 °C arasındaki sıcaklıklarda baskın olan organizma olarak bilinmektedir. Ancak sıcaklık 37 °C'ye çıkarıldığında sıcaklık toleransı daha yüksek olan *Leptospirillum ferrooxidans* baskın duruma geçer. *Leptospirillum* 35 °C'nin altındaki sıcaklıklarda da rahatlıkla gelişebilmektedir fakat gelişim süresi uzun olduğundan bu sıcaklıklarda baskın organizma olamamaktadır (Norris, 1989).

Gelişim ortamında bulunan enerji kaynağına bağlı olarak da baskın organizma değişebilmektedir. Bu bilgiyi doğrulamak için KR1 kodlu örnek Iron Salts (TK) besiyeri yerine, 10 g/l pirit (FeS₂) içeren besiyerinde 55 °C'de inkübe edildi (Norris,1989). Bir haftalık inkübasyon sonunda besiyerinde gelişim gösteren bakterinin genomik DNA'sı izole edilerek 16S rRNA geni dizin analizine tabi tutuldu. Elde edilen dizilerin GenBank'ta var olan dizilerle karşılaştırılması sonucunda izolatın *Sulfolobus metallicus* türüne % 95 benzediği görüldü. Enerji kaynağı olarak Fe/S kullanan bu bakterinin diğer türlere üstünlük sağladığı belirlendi. Aynı sıcaklıkta Iron Salts (TK) besiyeri ile yapılan inkübasyonda herhangi bir gelişim gözlenmedi.

A. ferrooxidans karbon kaynağı olarak CO₂ kullanır ve Fe(II)'yi oksitler. pH'nın 3'ün altında olduğu mezofilik ortamlarda en yoğun olarak bulunan bakteridir. Bu bakterinin demir oksidasyon mekanizmasını aydınlatmak için çok sayıda araştırma yapılmış ve çeşitli redoks proteinlerinin bu mekanizmada görevli olduğu belirlenmiştir. Oksidasyon mekanizmasının ilk basamağında demir oksidaz'ın (Iro) bulunduğu düşünülmektedir. Demir oksidaz, Fe(II)'den elektron alarak yükseltgenme reaksiyonunu başlatır. Daha sonra bu elektron diğer redoks proteinleri vasıtası ile oksijene kadar iletilir. *A. ferrooxidans* demir oksidaz proteini farklı araştırmacılar tarafından *E. coli* hücresi içerisine klonlanarak ekspresyonu sağlanmış (Fukumori vd., 1988; Kusano vd., 1992; Bruscella vd., 2005), moleküler modellemesi yapılmış (Zeng vd., 2007; 2008) ve proteinin yapısında bulunan bazı amino asitlerin protein kararlılığındaki rollerinin belirlenebilmesi için mutasyonlar gerçekleştirilmiştir (Zeng vd., 2010).

Bu çalışmada Murgul bakır madeninden izole edilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşuna ait Iro enzimini kodlayan ve 322 baz çiftinden oluşan *iro* geni PCR ile çoğaltıldı, baz sırası belirlenerek GenBank'ta bulunan dizilerle karşılaştırıldı ve *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC23270) suşu demir oksidaz proteinini kodlayan *iro* genine % 94 oranında benzediği görüldü. Bu gen, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E.coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde ekspresyonu amaçlandı. Ancak indükleme sonrasında proteine rastlanmadı. Ekspresyon vektörüne doğru bir şekilde

aktarılan proteinin görüntülenememe nedeni; protein boyutunun küçük olması ve ekspresyon seviyesinin az olması ya da proteinin inklüzyon cisimleri oluşturması olabilir (Kane ve Hartley, 1988). Bu sorunu gidermenin yollarından biri füzyon proteini oluşturmaktır (Ashima vd., 2005).

Füzyon proteini oluşturarak ilgilenen proteinin aşırı ekspresyonunu sağlamak için, ilgilenen protein ekspresyon seviyesi yüksek olan ve inklüzyon cisimi oluşturmayan bir protein ile birleştirilerek aynı promotor altında sentezlenir. Daha sonra proteinin özelliğine bağlı olarak, ya spesifik peptidazlarla kesilerek ayrılır ya da füzyon halinde ilerleyen çalışmalara devam edilir. Ekspresyonu sağlanamayan Iro enzimini ekspres edebilmek için füzyon proteini oluşturulması amaçlandı ve *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26 Sarı bakterisine ait ribulokinaz geni bu amaç için kullanıldı. pET-28a(+) vektörü içerisinde oluşturulan füzyon proteini *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde ekspres edildi. Füzyon proteininin ekspresyonu başarılı bir şekilde sağlandı ancak proteinde demir oksidaz aktivitesine yine rastlanmadı. Füzyon proteininde enzim aktivitesine rastlanmadığından dolayı sinyal peptidinin uzaklaştırılması yoluna gidildi. Sinyal peptidini uzaklaştırma işlemi füzyon proteininde yapılmayıp, *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu orijinal *iro* geni üzerinde gerçekleştirildi.

Bir proteinde ekspresyonun sağlanamamasının diğer bir nedeni, proteinin sinyal peptidi taşımasıdır. Sinyal peptidi, aktivitesini hücre dışında veya membranda gösteren proteinlerin N-terminalinde bulunan, ortalama 15-40 amino asitlik bir polipeptit dizisidir. Öncü protein ilgili bölgeye taşındıktan sonra sinyal peptidi, hücrenin sahip olduğu spesifik membran bağımlı sinyal peptidazlar tarafından kesilerek uzaklaştırılır ve bu aşamadan sonra protein katlanarak üç boyutlu yapısını kazanır (Blover ve Dobberstein, 1975). Sinyal peptidi taşıyan proteinler farklı bir konak hücrede ekspres edildiğinde, bu hücre sinyal peptidini uzaklaştıracak peptidazlara sahip olmayabilir. Bu durumda sinyal peptidi uzaklaştırılmayacağından protein doğru bir şekilde katlanamaz. Iro enzimini de bir membran proteini olduğundan sinyal peptidine sahip olduğu düşünüldü ve SignalP programında yapılan taramada, proteinin ilk 52 amino asidinin sinyal peptidine tekabül ettiği belirlendi. Zeng ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, Iro enzimini *E.coli* BL21 hücresi içerisinde ekspres edebilmek için genin sinyal peptidine takabül eden ilk 156 nükleotitini dışarıda bırakacak şekilde primer dizayn etmiş ve geni bu şekilde klonlamışlardır. Buna dayanarak *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro proteinini sinyal peptidi olmadan ekspres etmek için, genin ilk 156 bazı çıkarılacak şekilde

ekspresyon primeri dizayn edildi. Bu primerler kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen 166 baz çiftlik fragmentin dizin analizi yapıldı ve *iro* geninin aktif bölgesini kodlayan kısmına tekabül ettiği belirlendi. Genin 166 baz çiftlik bu aktif bölgesi klonlanarak pET-28a(+) ekspresyon vektörü içerisine aktarıldı ve *E.coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde ekspresyonu gerçekleştirildi. Oluşan proteinin varlığı SDS-PAGE’de teyit edildikten sonra demir oksidaz aktivitesi varlığı da belirlendi. Buna dayanarak Iro enziminin sinyal peptidi uzaklaştırılmadığı müddetçe, hücre içerisinde üç boyutlu yapısını kazanamadığı ve aktivite göstermediği anlaşıldı.

Demir oksidaz proteini demir sülfür kümesi [4Fe-4S] ile bağlantı kurarak Fe(II)’den elektron alınmasını sağlar. Protein ile [4Fe-4S] kümesi arasındaki bağlantı sistein amino asitleri tarafından sağlanmaktadır (Philpott vd., 1993; Bouton vd., 1997; Brzoska vd., 2006). Bu proteinde [4Fe-4S] kümesi ile bağlantı sağlayacak korunmuş dört adet sistein amino asidi bulunmaktadır (Bruscella vd., 2005). Bu amino asitlerin mutasyonla değiştirilmesi sonucunda proteinin [4Fe-4S] kümesine bağlanmadığı bilinmektedir (Zeng vd., 2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro proteininin de bu dört sistein amino aside sahip olduğu görüldü. Bu amino asitler protein üzerinde *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC23270) suşunda olduğu gibi Cys20, Cys23, Cys32 ve Cys45 şeklinde yerleşmiştir (Zeng vd., 2010). Bu amino asitler dışında, farklı türlerden elde edilen Iro proteinlerinde korunmuş olan diğer bazı amino asitlere de rastlandı. Zeng ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada bu amino asitlerden, Tyr10, Phe26, Trp44 ve Phe48’i mutasyonla değiştirerek protein stabilitesine olan etkilerini inceledi. Yaptıkları çalışma sonucunda Tyr10, Phe26 ve Phe48’de meydana gelen değişikliklerin protein aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü, Trp44’ün ise aktivite üzerine etkili olmadığı görüldü (Zeng vd., 2010). Zira, *A. ferrooxidans* M1 suşunda 44. pozisyonundaki amino asit triptofan değil, tirozindir.

Iro enziminde, 9 ve 11. pozisyonlardaki glutamin, 21. pozisyonundaki serin, 22. pozisyonundaki valin, 37 ve 43. pozisyonlardaki glisin ve 47. pozisyonundaki alanin de kısmen korunmuştur (Şekil 23). Bu çalışmada Gln9, Ser21 ve Val22 amino asitlerini mutasyonla değiştirerek, protein stabilitesinde önemli olup olmadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

```

Iro  -----GSMPKAAVQYQDTPK-----GKDHCSVCAQFI----- 27
Hip  FIGAAHAAGNCPGTTPKAEVQYQPHPK-----GKDQCSVCANFI----- 39
T. t  --AAPAN-AVTADDPTAJALKYINQDATKSERVAAARFGLPPEEQHCANCQFMQANVG--E 55
C. v  --SAPAN-AVAADDATAJALKYINQDATKSERVAAARFGLPPEEQHCANCQFMQADAAGAT 57
C. p  ---VPAN-AVTESDPAAVALKYHRDAASSERVAAARFGLPPEEQHCENCQFMNPDSA--A 54
E. h  --GLPDGVEDLPKAEDDHAHDYVINDAADTDHARFQ----EGQLCENCQFVVDYVN--- 49
R. g  -----QDKIDPKMVQYQDSPK-----DGNCSTCVNFE----- 28
R. t  -----G--TNASMRKAFNYQEVSKT-----AGKNCANCAQFIPGAS--A 35
          . * .                . * *

```

```

Iro  -APHACKV--VAG--NISPNGWCVAFVPKSA---- 53
Hip  -APKCKV--VAG--PVAPDGYCIAFTMPA---- 65
T. t  GDWKGQQL--FPG--KLINVNGWCASWTLKAG---- 83
C. v  DEWKGQQL--FPG--KLINVNGWCASWTLKAG---- 85
C. p  ADWKGQQL--FPG--KLINLSGWCASWTLRAG---- 82
E. h  -GWGYCQHPDFTD--VLVRGEGWCSVYAPA----- 76
R. g  -APSSCKI--VAG--KISPNGWCIAYAPMEDKKG-- 57
R. t  SAAGACKV--IPGDSQIQPTGYCDAYIVKK----- 63
          *      :   *:*  :

```

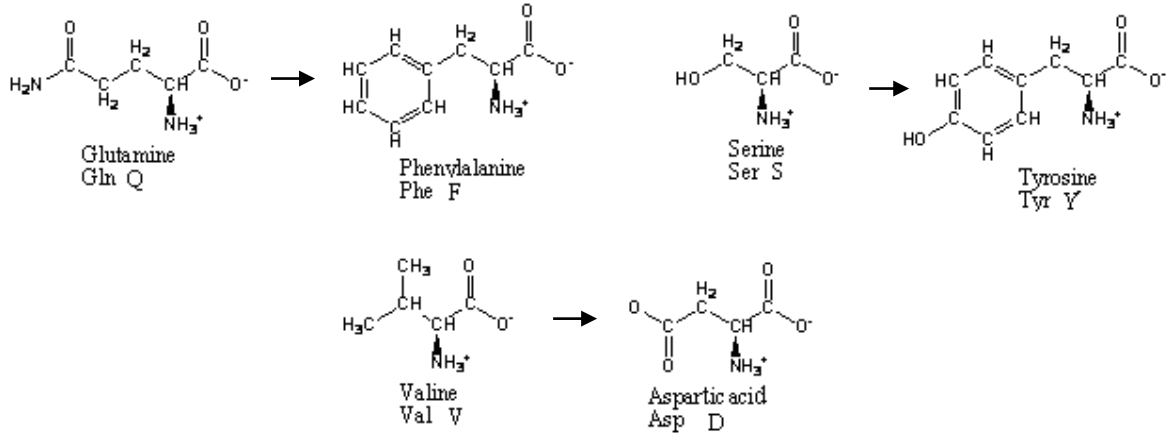
Şekil 23. Iro proteininde kısmen korunmuş olan amino asitler

Glutamin (Q) polar bir amino asittir ve genellikle protein yüzeyinde yerleşim gösterir. Sahip olduğu polar yan zincir, diğer polar veya yüklü atomlarla iyi bir etkileşim sağlamasına yardımcı olur. Genellikle proteinin bağlanma bölgesinde ya da aktif bölgesinde görev alır. Sahip olduğu bu özelliklerin yanı sıra, hemen yanında bulunan tirozin amino asidinin mutasyonla değiştirilmesi sonucu, protein aktivitesinin önemli ölçüde düşmesi de (Zeng vd., 2010) bu bölgenin protein stabilitesinde önemli bir alan olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle tez kapsamında değiştirilmesi düşünülen ilk amino asit 9. pozisyondaki glutamin oldu. Nötral olan glutamin amino asidi yerine hidrofobik olan fenilalanin (F) substitüsyonu düşünüldü. Aromatik bir yan zincire sahip olan fenilalanin, hidrofobik yapısından dolayı genellikle proteinlerin iç kısmında bulunur. Moleküler ağırlığı ve izoelektrik noktası yönünden glutamine benzerlik gösteren fenilalaninin ($M_{wQ} = 146,1$; $M_{wF} = 165,2$; $pI_Q = 5,65$; $pI_F = 5,48$) hidrofobik özelliğinin proteine olumlu bir etkisinin olup olmadığı incelendi.

Iro enzimi üzerinde yapılan bir diğer mutasyon Ser21 ve Val22'yi aynı anda değiştiren çifte mutasyondur. Serin ve valin, proteinde [4Fe-4S] kümesine bağlanmayı sağlayan sisteinlerden ikisinin arasındadır ve yan yana yerleşmişlerdir. Serin, sahip olduğu hidroksil grubundan dolayı hidrofilik olarak tanımlanır ve kuvvetli hidrojen bağları yapar (Betts ve Russell, 2003). Protein yüzeyinde bulunabileceği gibi iç kısmında da sıklıkla rastlanır. Küçük bir amino asit olması nedeni ile polipeptit zincirinin döngü yaptığı

yerlerde yaygın olarak görülür (Betts ve Russell, 2003). Valin ise, hidrofobik bir amino asittir ve proteinin iç kısmında yerleşim gösterir. Yan zincirinin fazla reaktif olmamasından dolayı protein fonksiyonunda önemli bir rolü yoktur, yine de substratın tanınmasında rol alabilmektedir.

Bu çalışmada serin amino asidi, tirozin ile değiştirildi. Tirozin aromatik ve kısmen hidrofobiktir. Aktif bir hidroksil grubuna sahip olduğundan dolayı aromatik yan zincirlerle bağ yapma eğilimi çok yüksektir. Bu nedenle proteinin yapı ve fonksiyonunda oldukça önemlidir. Kuvvetli bağ yapan serin yerine yine kuvvetli bağ yapma özelliği olan tirozini koyarak, bu amino asidin protein için elzem olup olmadığı, aynı fonksiyona sahip başka bir amino asidin serinin yerine konulmasıyla protein yapısının bozulup bozulmayacağı incelendi. Valin amino asidi yerine ise aspartik asit konularak, valinin substrat tanınmasında fonksiyonel olup olmadığı incelendi. Aspartik asit ayrıca, protein içerisine gömülü olduğu durumlarda tuz köprüleri oluşturarak proteinin kararlılığını artırır. Iro enziminin kararlılığını arttıracığı düşünülerek de bu amino asit tercih edildi (Şekil 24) (Betts ve Russell, 2003).



Şekil 24. *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu yaban tip Iro enziminde değiştirilen amino asitlerin açık formülleri

Yapılan bu çalışmada ilk olarak *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu yaban tip Iro enziminin karakterizasyonu amaçlandı. Iro enziminin moleküler modellemesi daha önce yapılmış olmasına rağmen (Zeng vd., 2007; 2008) biyokimyasal özellikleri hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle protein aktivitesinin optimum pH'sı ve sıcaklığı, kararlılığı ve çeşitli inhibitörlerin protein üzerine etkileri incelendi. Bunun

yanında proteinin kinetik parametreleri de belirlendi. Aynı işlemler mutant proteinler için de tekrar edildi.

Proteinin aktivitesinin belirlenmesinde kolorimetrik metot kullanıldı. Bu metotta demir oksidazın substratı olarak $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılmaktadır. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ün yapısında bulunan Fe(II), demir oksidaz varlığında oksitlenecek ve Fe(III)'e dönüşecektir. Substrat miktarındaki değişimi spektrofotometrik olarak ölçebilmek için α -fenantrolin kullanıldı. α -fenantrolin, Fe(II) ile reaksiyona girerek turuncu renk oluşumunu sağlar. Demir oksidaz aktivitesi ile ortamdaki Fe(II) miktarı azalacağı için, enzim içeren tüplerde rengin açılması beklenir. Oksidasyonun gerçekleşmesi için ortama katalizör olarak amonyum peroksit sülfat (APS) eklenmiştir. APS olmadığı durumda reaksiyon gerçekleşmemektedir. Ayrıca reaksiyonun gerçekleşebilmesi için en uygun tamponun potasyum hidrojen fitalat olduğu, farklı bir tampon kullanıldığında aktivitenin çok az miktarda kaldığı belirlendi. Spektrofotometrik ölçümler, Fe(II) miktarının en iyi ölçüldüğü 512 nm'de gerçekleştirildi. α -fenantrolin kullanılmadığı durumlarda Fe(II) miktarı ölçülememiştir. Ayrıca enzim içeren ve içermeyen reaksiyonların spektrofotometrik olarak karşılaştırılması sonucunda, demir oksidazın Fe(II) miktarını azalttığı teyit edildi. Enzim içermeyen reaksiyonlarda APS varlığından dolayı bir miktar oksidasyon gerçekleşmektedir. Bu nedenle yapılan ölçümlerde enzim etkisini kaybetse dahi aktivite hiçbir zaman sıfıra inmemiştir (Şekil 15, Şekil 16).

Demir oksidaz endüstride genellikle 25-40 °C arası sıcaklıklarda kullanılır. *AfeIro*-WT proteinin optimum sıcaklığı da 25 °C olarak belirlendi. 15-45 °C arasındaki sıcaklıklarda yine aktivite göstermekte ancak sıcaklık 45 °C'nin üzerine çıktığında aktivitede önemli ölçüde düşüş gözlenmektedir. 65 °C ve yukarısında enzim aktivitesi tamamen kaybolmuştur. *AfeIro*-Q9F ve *AfeIro*-S21Y/V22D'de bağlı aktivite *AfeIro*-WT'a göre % 15-20 oranında azalmakla beraber, optimum sıcaklık aralıkları aynı seyretmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin optimum sıcaklığının 40 °C üzerinde olması tercih edilir. Iro proteini üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarının, enzimin optimum sıcaklığı üzerine herhangi bir olumlu etki yapmadığı görülmüştür.

Acidithiobacillus ferrooxidans bakterisi optimal gelişmeyi pH 1,8-2,0 aralığında göstermektedir (Vian, 1986). Endüstriyel kullanım sırasında bakterinin metabolik atıklarından dolayı pH yükselir. Ortam pH'sını optimumda tutabilmek için periyodik olarak reaktörlere asit eklenmektedir. Yaptığımız çalışmada *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde üretilen Iro proteininin optimum pH'sı 4,0 olarak belirlenmiştir. Bu özelliğin

endüstriyel açıdan faydalı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Iro proteini hücreden ekstrakte edilip saflaştırılarak kullanıldığı takdirde, herhangi bir metabolik atık olmayacağından, ortam pH'sı değişmeyecektir. Fe(II)'nin Fe(III)'e oksidasyonu sırasında ortamın elektrik potansiyelinde (pE) değişim olur (pE = 13,03), fakat bu potansiyel suyunkine oldukça yakın olduğu için (pE = 13,6) pH'da değişikliğe neden olmaz (Stumm ve Morgan, 1996). Bu nedenle ortam asiditesinin sürekli kontrolüne gerek kalmayacaktır.

AfeIro-Q9F ve *AfeIro-S21Y/V22D* mutantlarının her ikisinde de optimum pH'nın 3,5 olduğu görülmüştür. Bu değer *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakterisi optimal gelişim pH'sından daha iyi olmakla birlikte, saflaştırılmış *AfeIro-WT* enziminden daha düşüktür. SPSS analizleri sonucunda, yaban tip ve mutant enzimler arasındaki bu pH farkının önemli olmadığı belirlendi. Bununla beraber artan pH'larda (pH 5,0-8,0) *AfeIro-S21Y/V22D* mutanı, yaban tipe göre daha kararlı görünmektedir. pH 8,0'e çıktığında dahi *AfeIro-S21Y/V22D*'de, enzim aktivitesi % 15 oranında devam etmektedir. *AfeIro-WT* ve *AfeIro-Q9F*'de ise pH 6,5'den sonra aktivite görülmemektedir. pH analizleri sonucu elde edilen veriler SPSS programı ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da *AfeIro-S21Y/V22D* mutantının pH 6,5 ve yukarıdaki reaksiyonlardan elde edilen değerleri ayrı bir grup oluşturmaktadır. Bu veriler S21Y/V22D mutasyonunun, proteinin pH toleransını arttırdığını göstermektedir.

Enzim kararlılığı ile ilgili yapılan çalışmalarda yaban tip Iro proteininin en iyi aktiviteyi 5. dakikada verdiği, 10 dakikadan sonra aktivitede düşüş gözleendiği ve bu düşüşün 20. dakikaya kadar devam ettiği gözleendi. 20. dakikadan sonra ise oldukça azalmakla beraber, sabit devam ettiği görüldü. Oda sıcaklığında yapılan bu analizlerde, saf haldeki enzimin uzun süreli çalışmalarda kararlılığını koruyamadığı belirlendi. *AfeIro-Q9F* mutantında da yaban tip Iro enzimine (*AfeIro-WT*) benzer şekilde, oda sıcaklığında zamana bağlı olarak aktivitede azalma görülmektedir. *AfeIro-S21Y/V22D* mutantında ise yine en iyi aktivite 5. dakikada görülmüş, 10, dakikada aktivite düşmüştür fakat 10. dakikadan sonra önemli bir azalma olmamıştır. 25. dakikada dahi *AfeIro-S21Y/V22D* aktivitesi devam etmiş ve yaban tipe göre fazla olduğu görülmüştür. Yaban tip iro proteininde 25. dakika sonunda aktivite % 80'e düşerken, S21Y/V22D mutantında % 88'e düşmüştür. Ancak yapılan istatistiksel analizlerde (SPSS), *AfeIro-S21Y/V22D*'de görülen farkın önemsiz olduğu belirlendi. Q9F mutantında ise 25. dakika sonunda aktivitenin yaban tipe olduğu gibi % 80'e düştüğü görüldü.

Acidithiobacillus ferrooxidans bakterisi Iro proteininin kinetik parametreleri günümüze kadar incelenmemiştir. Yaptığımız çalışmada *A. ferrooxidans* M1 suşu Iro enziminin kinetik özellikleri ilk defa belirlendi, ayrıca mutant proteinlerin de kinetik parametreleri incelenerek bir fark oluşturup oluşturmadıkları belirlendi. Bir enzimin kinetik özellikleri incelendiğinde katalitik etkinliğinin yüksek olması yani, düşük K_m değerine ve yüksek V_{max} ve k_{cat} değerlerine sahip olması arzu edilir. Iro enziminin bu özellikleri daha önceden incelenmediğinden yaptığımız çalışma bir ilktir. Yaban tip Iro enzimi mutant enzimlerle karşılaştırıldığında, kinetik parametrelerinde önemli bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Tablo 7). Standart sapmalar da dikkate alındığında her üç proteinin de K_m ve V_{max} değerleri hemen hemen aynıdır. k_{cat} ve katalitik aktivite değerleri de birbirine oldukça yakın olmakla beraber mutant proteinlerin katalitik aktivitesinde yaklaşık 0,2 birimlik bir artış vardır. Spektrofotometrede 512 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde her üç proteinin de bağıl aktivitesinin birbirine çok yakın olması, hatta yaban tip Iro enziminin aktivitesinin az da olsa fazla olması, katalitik aktivitedeki 0,2 birimlik artışın önemsiz olduğunu göstermektedir. SPSS programı ile yapılan istatistiksel analizlerde de bu farkın önemsiz olduğu görüldü.

Endüstriyel alanda birçok enzimin K_m değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu bildirilmiştir (Fullbrook, 1996). $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ substrat olarak kullanıldığında *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu yaban tip Iro enzimi (IroWT) ve S21Y/V22D mutantının K_m değeri 0,27 mM, Q9F mutantının K_m değeri de 0,25 mM olarak bulunmuştur. Bu değerlerin endüstriyel açıdan iyi olduğu düşünülmektedir.

Tablo 7. Yaban tip ve mutant enzimlerin sahip oldukları özellikler açısından karşılaştırılmaları

Demir oksidaz	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dk/mg}$)	k_{cat} (1/sn)	Katalitik etkinlik k_{cat}/K_m
IroWT	25	4,0	0,27 \pm 0,09	0,083 \pm 0,01	0,29	1,07
Q9F	25	3,5	0,25 \pm 0,07	0,087 \pm 0,01	0,30	1,21
S21Y/V22D	25	3,5	0,27 \pm 0,07	0,094 \pm 0,01	0,33	1,22

Acidithiobacillus ferrooxidans M1 suşu Iro enzimi üzerine çeşitli inhibitörlerin etkileri incelendiğinde en büyük inhibisyonu β -merkaptoetanol ve DTT'nin yaptığı görüldü. β -merkaptoetanol, SH-grubu (tiyol grubu) inhibitörüdür, disülfid bağlarını

sülhidril formlarına indirgeyerek kırar (Shapira ve Arnon, 1969). DTT ise benzer şekilde SH-grubu ve disülfit grubu (-S-S-) inhibitörü olarak bilinir (Cleland, 1964) ve aynı zamanda antioksidan olarak görev yapar. β -merkaptoetanol enzim aktivitesini % 12'ye düşürürken DTT'de aktiviteyi % 13'e düşürmüştür. Bu veriler doğrultusunda, bu enzimin aktivite için serbest SH gruplarına veya S-S köprülerine ihtiyaç duyduğu yorumu yapılabilir. Polar çözücü olan DMSO ile anyonik bir deterjan olan Triton X-100'ün *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro enzimi aktivitesi üzerinde çok fazla bir etkisi olmayıp, DMSO aktiviteyi % 91'e, Triton X-100 ise % 93'e düşürmüştür. Bunlar dışında, organik çözücüler olan izopropanolün aktiviteyi % 79'a, etanolün de % 62'ye kadar düşürdüğü gözlemlendi. İyonik bir deterjan olan SDS'in Iro enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş fakat sonuç alınamamıştır. Bunun nedeninin SDS'in iyonik yapısından dolayı, yine iyonik olan substrat ile ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) bağlar oluşturarak ortamda bulunan Fe(II) miktarının ölçülmesini inhibe etmesi olduğu düşünülmektedir. Yine metal şelatlayıcı olan EDTA'nın da benzer etki göstermesinden dolayı bu maddenin enzim üzerine etkisi incelenememiştir. Kullanılan inhibitörlerin *AfeIro-Q9F* ve *AfeIro-S21Y/V22D* mutantları üzerine etkileri de incelenmiş, sonuçta inhibitörlerin mutantlara etkilerinin yaban tiple aynı olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro proteininin *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde ekspres edilerek saflaştırıldığında aktivitesini kaybetmediği, Fe(II)'yi yükseltgeme özelliğini muhafaza ettiği görüldü. Bu enzimin hücre dışında ekspres edildiğinde, orijinal hücreye göre daha yüksek pH'larda aktivite gösterebildiği görüldü. Enzim üzerinde yapılan mutasyon çalışmalarında, mutant enzimlerin karakterlerinde önemli bir değişim olmadığı belirlendi. Bununla beraber, S21Y/V22D mutant enziminin kararlılığı yaban tipe göre artış göstermiştir. Bunun nedeninin yan zincirinin önemli bir reaktif özelliği bulunmayan valin amino asidinin yerine, kuvvetli tuz köprüleri yaparak protein kararlılığını arttıran aspartik asitin konulması olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada Espiye Bakır madeni (Giresun), Murgul Bakır madeni (Artvin) ve Gümüşhane'nin Zigana köyünde bulunan asidik su kaynaklarından alınan su örneklerinde asidofilik bakterilerin varlığı incelenmiştir. 16 farklı noktadan alınan su örneklerinin 12'sinde asidofilik bakterilerin varlığı belirlenmiştir. 12 farklı izolatin tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla 16S rRNA genleri incelenmiş, PCR yardımıyla arttırılan 16S rRNA genleri uygun bir vektöre klonlandıktan sonra baz dizilerinin ortaya çıkarılması için baz dizin analizi yapılmıştır. Dizin analizi sonucunda elde edilen 4 izolatin *Acidithiobacillus ferrooxidans*, 3 izolatin *Acidiphilium multivorum*, bir izolatin *Acidocella aluminiidurans*, bir izolatin *Acidithiobacillus ferrovirans*, bir izolatin *Acidocella facilis* ve iki izolatin da *Acidocella sp.* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Espiye Bakır madeninden alınan KR1 kodlu su örneği üç farklı şekilde inkübe edilmiş ve her inkübasyon sonunda farklı bir bakteriye rastlanmıştır. Bu örnek, Iron Salts (TK) besiyerinde 30 °C'de inkübe edildiğinde *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aynı besiyerinde 37 °C'de inkübe edildiğinde *Leptospirillum ferrooxidans* ve 10 g/l pirit içeren besiyerinde, 55 °C'de inkübe edildiğinde ise *Sulfolobus metallicus* türünü vermiştir. Bu sonuçlar karışık kültürde enerji kaynağının ve sıcaklığın baskın mikroorganizmayı değiştirdiğini göstermiştir.

Murgul Bakır Madeninden elde edilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşunun Iro enzimini karakterize etmek amacıyla bu proteini kodlayan *iro* geni PCR yardımı ile çoğaltılarak tüm baz dizisi belirlendi, genin sinyal peptidini kodlayan kısmı uzaklaştırılarak pET-28a(+) vektörüne klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) hücresi içerisinde ekspres edildi. Protein, HisLink Protein Purification Resin kolon maddesi ile saflaştırıldı ve biyokimyasal çalışmalar yapılarak karakterizasyonu tamamlandı. Elde edilen verilere göre *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro proteininin optimum sıcaklığı 25 °C ve optimum pH'sının 4,0 olduğu belirlendi. Enzimin K_m değeri $0,27 \pm 0,09$ mM, V_{max} değeri $0,083 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, k_{cat} değeri 0,29 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri ise 1,07 olarak hesaplandı.

Acidithiobacillus ferrooxidans M1 suşu Iro enzimi üzerinde bölge özgün mutasyon (Site Directed Mutagenesis) yöntemi ile iki farklı mutasyon gerçekleştirildi. Q9F ve S21Y/V22D olarak isimlendirilen bu mutasyonların, proteinin biyokimyasal özellikleri

üzerinde ekstrem bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Mutant enzimlerin optimum sıcaklığı yine 25 °C iken optimum pH'larının 3,5'e düştüğü görüldü. S21Y/V22D mutantında pH kararlılığının arttığı spektrofotometrik analizlerle ve istatistiksel değerlendirmelerle belirlendi. Enzimin kararlılığını belirlemek için oda sıcaklığında yapılan deneylerde, 25. dakikanın sonunda yaban tip Iro enzimi ve Q9F mutantının aktivitesi % 80'e düşerken, S21Y/V22D mutantında aktivitenin % 88'e düştüğü görüldü. Bunun nedeninin, proteinin aktif bölgesinde bulunan valin amino asiti yerine kuvvetli tuz köprüleri yapma özelliğine sahip aspartik asitin konulması olduğu düşünöldü. Ancak istatistiksel analizler sonucunda, S21Y/V22D mutantının ısı kararlılığında görölen bu farkın önemli olmadığı belirlendi. S21Y/V22D mutantının V_{max} değeri de yaban tipe göre az miktarda artmış olmakla beraber bu artışın aktivitede önemli etkiye yol açacak kadar büyük olmadığı göröldü. S21Y/V22D mutantının K_m değeri $0,27 \pm 0,07$ mM, V_{max} değeri $0,094 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, k_{cat} değeri 0,33 (1/sn), katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri ise 1,22 olarak hesaplandı. Q9F mutantında ise elde edilen değerler şu şekildedir: K_m değeri $0,25 \pm 0,07$ mM, V_{max} değeri $0,087 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, k_{cat} değeri 0,30 (1/sn) ve katalitik etkinliğini gösteren k_{cat}/K_m değeri 1,21.

6. ÖNERİLER

Asidofilik bakteriler biyo-madencilikte yaygın olarak kullanılmaktadır ancak bu bakterilerin kültivasyonu oldukça zordur. Düşük pH'larda ($\text{pH} \leq 3$) gelişim gösteren bu bakterilerin metabolik aktiviteleri sonucu pH yükseldiğinden, ortam pH'sının sürekli kontrol altında tutulması ve ortama asit eklenmesi gerekmektedir. *E. coli* hücresi içerisinde aşırı miktarda çoğaltılan *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro proteininin pH toleransı daha yüksektir (pH 4,0) ancak uzun süre kararlılığını koruyamamaktadır. Yapılan mutasyonlarla enzimin kararlılığı bir miktar arttırılmış olmakla beraber endüstriyel kullanım için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle enzimin aktif bölgesinde yapılacak farklı mutasyonlarla enzimin kararlılığı daha da artırılabilir.

Biyo-madencilikte kullanılan bakterilerin yüksek ısıya tolerans göstermesi, oksidasyon tepkimelerinin yüksek ısıda daha hızlı gerçekleşmesi nedeni ile arzu edilen bir özelliktir. *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşu Iro enziminin ısıya direncini mutasyonla artırarak endüstriyel açıdan aranan bir enzim olması sağlanabilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren *Leptospirillum* ve *Sulfolobus* gibi asidofilik türlerin demir oksidasyonunda görevli enzimleri de karakterize edilerek endüstride kullanımları sağlanabilir.

Asidofilik bakterilerin gelişim süreci 3 gün ile bir hafta arasında değişim göstermektedir. Bu bakterilerden elde edilen enzimlerin *E. coli* hücresi içerisinde bir gecede aşırı ekspresyonu sağlanmaktadır. Bu şekilde reaktörlerde direkt bakteriyi kullanmak yerine, *E. coli* hücresi içerisinde ekspres edilmiş enzimlerinin kullanımının zaman kazanma açısından iyi bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 suşunda demir oksidasyon mekanizmasında görev alan diğer enzimlerin de klonlanarak karakterize edilmesi, daha iyi demir oksidasyonu sağlama açısından önemli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Li, D. ve Cowan, J. A., 1995. Role of Aromatic Residues in Stabilization of the [Fe₄S₄] Cluster in High-Potential HiPIPs (HiPIPs): Physical Characterization and Stability Studies of Tyr-19 Mutants of *Chromatium vinosum* HiPIP, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 9440–9444.
- Amaro, C., Biosca, E. G., Fouz, B. ve Garay, E., 1992. Electrophoretic Analysis of Heterogeneous Lipopolysaccharides From Various Strains of *Vibrio Vulnificus* Biotypes 1 and 2 by Silver Staining and Immunoblotting, Curr Microbiol, 2, 99–104.
- Amouric, A., Brochier-Armanet, C., Johnson, D. B., Bonnefoy, V. ve Hallberg K. B., 2011. Phylogenetic and Genetic Variation Among Fe(II)-Oxidizing Acidithiobacilli Supports the View that These Comprise Multiple Species with Different Ferrous Iron Oxidation Pathways, Microbiology, 157, 111-122.
- Andersen, S. B., 2000. Random Amplified Polymorphic DNA.
- Ashima, M., Chakrabarti, K. S., Shahul Hameed, M. S., Srinivas, K. V., Kumar, G. S. ve Sarma, S. P., 2005. High Level Expression of Peptides and Proteins Using Cytochrome *b5* as a Fusion Host, Protein Expression and Purification, 41, 84–97.
- Atlas, R. M. ve Bartha, R., 1997. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th ed. Addison Wesley Longman. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., 694p.
- Baker, B. J. ve Banfield, J. F., 2003. Microbial Communities in Acid Mine Drainage. FEMS Microbiol Ecol., 44, 139-52.
- Banci, L., Bertini, I., Dikiy, A., Kastrau, D. H., Luchinat, C. ve Sompornpisut, P., 1995. The Three-Dimensional Solution Structure of the Reduced High-Potential Iron-Sulfur Protein from *Chromatium vinosum* through NMR, Biochemistry, 34, 206–219.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L. ve Aragno, M., 1996. Isolation of *Thermus* Strains From Hot Composts (60 to 80°C), Appl Environ Microbiol, 62, 1723–1727.
- Benning, M. M., Meyer, T. E., Rayment, I. ve Holden, H. M., 1994. Molecular Structure of the Oxidized High-Potential Iron-Sulfur Protein Isolated from *Ectothiorhodospira vacuolata*. Biochemistry, 33, 2476–2483.
- Betts, M. J., ve Russell, R. B., 2003. Amino Acids Properties and Consequences of Substitutions. *in* Barnes, M. R. ve Gray, I. C. eds. Bioinformatics for geneticists. Wiley, Chichester, UK, 289–316.

- Bian, S. ve Cowan, J. A., 1999. Protein-Bound Iron–Sulfur Centers. Form, Function, and Assembly, Coord Chem Rev, 190- 192, 1049–1066.
- Blobel, G. ve Dobberstein, B., 1975. Transfer of Proteins Across Membranes. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma, J Cell Biol., 67, 835-851.
- Bosecker, K., 1997. Bioleaching: Metal Solubilization by Microorganisms, FEMS Microbiol. Rev., 20, 591-604.
- Bouton, C., Hirling, H. ve Drapier, J. C., 1997. Redox Modulation of Iron Regulatory Proteins by Peroxynitrite, J Biol Chem, 272, 19969–19975.
- Brandl, H., 2001. Microbial Leaching of Metals. In: Rehm H-J (ed) Biotechnology, 10. Special processes. Wiley-VCH, Weinheim, 191–224.
- Breiter, D. R., Meyer, T. E., Rayment, I. ve Holden, H. M., 1991. The Molecular Structure of the High Potential Iron–Sulfur Protein Isolated from *Ectothiorhodospira halophila* Determined at 2.5-Å resolution, J. Biol. Chem, 266, 18660–18667.
- Bridge, T. A. M. ve Johnson, D. B., 1998. Reduction of Soluble Iron and Reductive Dissolution of Ferric Iron-Containing Minerals by Moderately Thermophilic Iron-Oxidizing Bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2181–2190.
- Bridge, T. A. M. ve Johnson, D. B., 2000. Reductive Dissolution of Ferric Iron Minerals by *Acidiphilium* SJH, Geomicrobiol. J., 17, 193–206.
- Brierley, C. L., 1978. Bacterial Leaching, Crit. Rev. Microbiol., 6, 207–62.
- Brierley, C. L., 1982. Microbiological Mining, Sci. Am., 247, 2, 42–51.
- Bruscella, P., Cassagnaud, L., Ratouchniak, J., Brasseur, G., Lojou, E., Amils, R. ve Bonnefoy, V., 2005. The HiPIP from the Acidophilic Acidithiobacillus ferrooxidans is Correctly Processed and Translocated in *Escherichia coli*, in Spite of the Periplasm pH Difference Between these Two Micro-organisms, Microbiology, 151, 1421–1431.
- Bryant, R. D., McGroarty, K. M., Costerton, J. W. ve Laishley, E. J., 1988. *Thiobacillus albertis* sp. nov. in Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 25, Int J. Syst Bacteriol, 38, 220-222.
- Bryner, L. C., Beck, J. V., Davis, D. B. ve Wilson, D. G., 1954. Microorganisms in Leaching Sulfide Minerals, Ind. Eng. Chem., 46, 2587-2592.
- Brzóška, K., Męczyńska, S. ve Kruszewski, M., 2006. Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond, Acta Biochimica Polonica, 53, 685-691.

- Bucher, M. H., Evdokimov, A. G. ve Waugh, D. S., 2002. Differential Effects of Short Affinity Tags on the Crystallization of *Pyrococcus furiosus* Maltodextrin-Binding Protein. Biol Cryst, 58, 392–397.
- Cavazza, C., Guigliarelli, B., Bertrand, P. ve Bruschi, M., 1995. Biochemical and EPR Characterization of a High Potential Iron-Sulfur Protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol Lett, 130, 193–200.
- Chaudhuri, S. K., Lack, J. G. ve Coates, J. D., 2001. Biogenic Magnetite Formation Through Anaerobic Biooxidation of Fe(II), Appl. Environ. Microbiol., 67, 2844–2848.
- Cleland, W. W., 1964. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups, Biochemistry, 3, 480–482.
- Colmer, A. R. ve Hinkel, M. E., 1947. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report, Science, 106, 253–56.
- Condon, C., Squires, C. ve Squires, C. L., 1995. Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*, Microbiol. Rev., 59, 623–645.
- Coram, N. J. ve Rawlings, D. E., 2002. Molecular Relationship Between Two Groups of *Leptospirillum* and the Finding that the World and the *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African Commercial Biooxidation Tanks that Operate at 40±C, Appl. Environ. Microbiol., 68, 838–845.
- Cotoras, D. ve Videma, P., 2011. Bacterial Atrain for a Metal Biosorption Process, US Patent No: 7951578.
- Dave, S. R., Gupta, K. H. ve Tipre, D. R., 2008. Characterization of Arsenic Resistant and Arsenopyrite Oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* from Hutti Gold Leachate and Effluents, Bioresour Technol, 99, 7514–7520.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. ve Harrison, R.G., 1999. New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*, Biotech. Bioeng., 65, 382–388.
- De Wulf-Durand, P., Bryant, L. J. ve Sly, L. I., 1997. PCR-Mediated Detection of Acidophilic, Bioleaching-Associated Bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2944–2948.
- Dew, D. W., Lawson, E. N. ve Broadhurst, J. L., 1997. The BIOX® Process for Biooxidation of Gold-Bearing Ores or Concentrates, Ref. 72, 45–80.
- Di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. ve Inouye, H., 1988. Vectors that Facilitate the Expression and Purification of Foreign Peptides in *Escherichia coli* by Fusion to Maltose-Binding Protein, Gene, 67, 21–30.

- Donati, E., Pogliani, C. ve Boiardi, J. L., 1997. Anaerobic Leaching of Covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*, Appl Microbiol Biotechnol, 47, 636-9.
- Dowling, T. E., Mortiz, C. ve Palmer, J. D., 1990. Nucleic acids II. Restriction site analysis, Molecular Systematics, 250–317.
- Duim, B., Vandamme, P. A. R., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J. R. ve Wagenarr, J. A., 2001. Differentiation of *Campylobacter* Species by AFLP Fingerprinting, Microbiology, 147, 2729-2737.
- Edwards, K. J., Gihring, T. M. ve Banfield J. F., 1999. Seasonal Variations in Microbial Populations and Environmental Conditions in an Extreme Acid Mine Drainage Environment, Appl. Environ. Microbiol., 65, 3627–3632.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M. ve Banfield, J. F., 2000. An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage, Science, 279, 1796–99.
- Ehrlich, H. L., 1963. Microorganisms in Acid Mine Drainage From a Copper Mine, J. Bacteriol, 86, 350-352.
- Ehrlich, H. L., 1997. Microbes and Metals, Appl Microbiol Biotechnol, 48, 687-692.
- Ehrlich, H. L., 1999. Microbes as Geologic Agents: Their Role in Mineral Formation, Geomicrobiology Journal, 16, 135-53.
- Ewart, D. K. ve Huges, M. N., 1991. The Extraction of Metals From Ores Using Bacteria, Advances in Inorganic Chemistry, 36, 103-135.
- Fortune, W, Mellon, B. ve Ind M . G., 1938, Eng.Chem.Anal. Ed.,10-60.
- Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A. ve Yamanaka, T., 1988. Fe(II)- Oxidizing Enzyme Purified from *Thiobacillus ferrooxidans*, FEMS Microbiol Lett, 50, 169–172.
- Fullbrook, P. D., 1996. Practical Kinetics, In: Godfrey, T., West, S., editors. Industrial Enzymology. 2nd ed. Stockton Press/Macmillian Press Ltd. 483-540.
- Golovacheva, R.S. ve Karavaiko, G. I., 1979. Sulfofobacillus, a New Genus of Spore-forming Thermophilic Bacteria, Microbiology (Mikrobiologiya), 48, 658–65.
- Goodfellow, M. ve O'Donnell, A.G., 1993. Root of Bacterial Systematics. Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Gray, M. W., Sankoff, D. ve Cedergren, R. J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nuc. Acids Res., 12, 5837-5852.

- Gurtler, V. ve Stanisich, V. A., 1996. New Approaches to Typing and Identification of Bacteria Using the 16S-23S rDNA spacer, Microbiology, 142, 3-16.
- Hallberg, K. B. ve Lindström, E. B., 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a Moderately Thermophilic Acidophile, Microbiology, 140, 3451–3456 (Validation list No 54. Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 619-620).
- Hallberg, K. B. ve Johnson, D. B., 2001. Biodiversity of Acidophilic Prokaryotes, Adv. Appl. Microbiol., 49, 37–84.
- Hallberg, K. B. ve Johnson, D. B., 2003. Novel Acidophiles Isolated from Moderately Acidic Mine Drainage Waters, Hydrometallurgy, 71, 139-148.
- Hallberg, K. B., Amouric, A., Brochier, C., Bonnefoy, V. ve Johnson, D. B., 2009. Physiological and Phylogenetic Heterogeneity Among Iron-Oxidizing *Acidithiobacillus* spp., and Characteristics of the Novel Species *Acidithiobacillus ferrivorans*, Advanced Materials Research, 71-73, 167-170.
- Hallberg, K. B., González-Toril, E. ve Johnson, D. B., 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans* sp. nov.; Facultatively Anaerobic, Psychrotolerant, Iron- and Sulfur-Oxidizing Acidophiles Isolated from Metal Mine-Impacted Environments, Extremophiles, 14, 9-19.
- Hansford, G. S. ve Miller, D.M., 1993. Biooxidation of a Gold-bearing Pyrite Arsenopyrite Concentrate, FEMS Microbiology Reviews, 11, 1-3, 175-182.
- Harrison, A. P., 1982. Genomic and Physiological Diversity Amongst Strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and a Genomic Comparison with *Thiobacillus thiooxidans*, Arch. Microbiol., 131, 68–76.
- Hedrich, S. ve Johnson, D. B., 2013. *Acidithiobacillus ferridurans*, sp. nov.; an Acidophilic Iron, Sulfur and Hydrogen-metabolizing Chemolithotrophic *Gammaproteobacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 4018-4025.
- Helbronner, A. ve Rudolfs W., 1922. The Attack of Minerals by Bacteria. Oxidation of Blende, Compt. rend., 174, 1378-1380.
- Hippe, H., 2000. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., Including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972) nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992), Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 501–503.
- Hochuli, E., Döbeli, H. ve Schacher, A., 1987. New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptide Containing Neighbouring Histidine Residues, J Chromatogr., 411, 177–184.
- Horan, J., 1999. *Thiobacillus ferrooxidans*. www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/thiobaci.htm. Accesed 8/16/06, Updated 12/3/99.

- Hugenholtz, P., Pitulle C., Hershberger, K. L. ve Pace N. R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring, J. Bacteriol., 180, 366-376.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. ve Herdman, M., 2000. Conserved Structural and Regulatory Domains Within Divergent 16S rRNA–23S rRNA Spacer Sequences of Cyanobacteria, Microbiology, 146, 1275- 1286.
- Iwagami, S. G., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Borsari, M., Felli, I. C., Piccioli, L. ve Eltis, D., 1995. The Role of a Conserved Tyrosine Residue in High-Potential Iron-Sulfur Proteins, Protein Sci., 4, 2562–2572.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. ve Kersters, K., 1996. Evaluation of the DNA Fingerprinting Method AFLP as A New Tool in Bacterial Taxonomy, Microbiology, 142, 1881-1893.
- Jensen, M. A., Webster, J. A. ve Strauss, N., 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms, Appl. Env. Microbiol., 59, 945-952.
- Johnson, D. B., Macvicar, J. H. M. ve Rolfe, S., 1987. A New Solid Medium for the Isolation and Enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and Acidophilic Heterotrophic Bacteria, Journal of Microbiological Methods, 7, 9-18.
- Johnson D. B. ve McGinness, S., 1991. An Efficient and Universal Solid Medium for Growing Mesophilic and Moderately Thermophilic, Iron-Oxidizing, Acidophilic Bacteria, J. Microbiol. Method, 13, 113–122.
- Johnson, D. B., 1995. Selective Solid Media for Isolating and Enumerating Acidophilic Bacteria, J. Microbiol. Methods, 23, 205–218.
- Johnson, D. B., 1998. Biodiversity and Ecology of Acidophilic Microorganisms, FEMS Microbiol. Ecol., 27, 307–317.
- Johnson, D. B., 2001. Genus II *Leptospirillum* Hippe 2000 (ex Markosyan 1972, 26). Bergey's Manual of Comparative Bacteriology, ed.GGarrity, 1, 443–47.
- Johnson, D. B. ve Hallberg, K. B., 2003. The Microbiology of Acidic Mine Waters, Research in Microbiology, 154, 466–473.
- Johnson, D. B., Okibe, N. ve Hallberg, K. B., 2005. Differentiation and Identification of Iron-Oxidizing Acidophilic Bacteria Using Cultivation Techniques and Amplified Ribosomal DNA Restriction Enzyme Analysis (ARDREA), Journal of Microbiological Methods, 60, 299-313.
- Kane, J. F. ve Hartley, D. L., 1988. Formation of Recombinant Protein Inclusions in *E. coli*. Trends Biotechnol., 6, 95.

- Kelly, D. P. ve Wood, A. P., 2000. Re-classification of Some Species of *Thiobacillus* to the Newly Designated Genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 511–16.
- Kerfeld, C. A., Salmeen, A. E. ve Yeates, T. O., 1998. Crystal Structure and Possible Dimerization of the High-Potential Iron-Sulfur Protein from *Chromatium purpuratum*, Biochemistry, 37, 13911-13917.
- Kupka, D., Rzhepishevskaya, O. I., Dopson, M., Lindstrom, E. B., Karnachuk, O. V. ve Tuovinen, O. H., 2007. Bacterial Oxidation of Ferrous Iron at Low Temperatures, Biotechnol Bioeng, 97, 1470–1478.
- Kusano, T., Takeshima, T., Sugarawa, K., Inoue, C., Shiratori, T., Yano, T., Fukumori, Y. ve Yamanaka, T., 1992. Molecular Cloning of the Gene Encoding *Thiobacillus ferrooxidans* Fe(II) oxidase. High homology of the gene product with HiPIP, J Biol Chem, 267, 11242–11247.
- Lack, J. G., Chaudhuri, S. K., Chakraborty, R., Achenbach, L. A. ve Coates J. D., 2002. Anaerobic Biooxidation of Fe(II) by *Dechlorosoma suillum*, Microb. Ecol, 43, 424-431.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Leduc, L. G. ve Ferroni, G. D., 1994. The Chemolithotrophic Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, FEMS Microbiol Lett, 14, 103–120.
- Lilburn, T. G. ve Garrity, G. M., 2004. Exploring Prokaryotic Taxonomy, Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 547–13.
- Lin, J. J., Kuo, J. ve Ma, J., 1996. A PCR-Based DNA Fingerprinting Technique: AFLP for Molecular Typing of Bacteria , Nucleic Acids Research, 24, 3649-3650.
- Lindstrom, E. B., Gunneriusson, E. ve Tuovinen, O. H., 1992. Bacterial Oxidation of Refractory Ores for Gold Recovery, Crit. Rev. Biotechnol., 12, 133–155.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, J. Am. Chem., 56, 658.
- López-Archilla, A. I., Marín, I. ve Amils, R., 1993. Bioleaching and Interrelated Acidophilic Microorganisms from Rio Tinto, Spain, Geomicrobiology Journal, 11, 223-233.
- Louws, F. J., Schneider, M. ve de Bruijn, F. J., 1996. Assessing Genetic Diversity of Microbes Using Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, 5-30.
- Lovenberg, W., Buchanan, B. B. ve Rabinowitz, J. C., 1963. Studies on the Chemical Nature of Clostridial Ferredoxin, J. Biol. Chem., 238, 3899-3913.

- Luo, H., Shen, L., Yin, H., Li, Q., Chen, Q., Luo, Y., Liao, L., Qiu, G. ve Liu, X., 2009. Comparative Genomic Analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strains Using the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 Whole Genome Oligonucleotide Microarray, Can J Microbiol, 55, 587–598.
- Lupski, J. R. ve Weinstock, G. M., 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. Bacteriol. 174, 4525- 4529.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, Newyork.
- Markosyan, G. E., 1972. A New Iron-Oxidizing Bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. sp., Biol J Armenia, 25, 26-29.
- McGinness, S., 1991. A Study of Growth and Control of Acidophilic Bacteria in the Environment, University of Wales, Bangor, UK, PhD Thesis.
- Murr, L.E., 1980. Theory and Practice of Copper Sulphide Leaching in Dumps and In-Situ, Minerals, Sci. Engng, 12, 121-189.
- Naimi A., Beck G. ve Branlant C., 1997. Primary and Secondary Structures of rRNA Spacer Regions in *Enterococci*, Microbiology, 143, 823- 834.
- Nguimbi, E., Li, Y., Gao, B., Li, Z., Wang, B., Wu, Z., Yan, B., Qu, Y. ve Gao, P., 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic *Myxobacteria* ve Differentiation of Closely Related Strain, System. Appl. Microbiol., 26, 262-268.
- Ni, Y. Q., He, K. Y., Bao, J. T., Yang, Y., Wan, D. S. ve Li, H. Y., 2008. Genomic and Phenotypic Heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. Strains Isolated from Diverse Habitats in China, FEMS Microbiol Ecol, 64, 248–259.
- Nogi, T., Fathir, I., Kobayashi, M., Nozawa, T. ve Miki, K., 2000. Crystal Structures of Photosynthetic Reaction Center and High-Potential Iron-Sulfur Protein from *Thermochromatium tepidum*: Thermostability and Electron Transfer, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 13561–13566.
- Norris V., 1989. A Calcium Flux at the Termination of Replication Triggers Cell Division in *Escherichia coli*, Hypothesis. Cell Calcium., 10, 511–517.
- Norris, P. R., Clark, D. A., Owen, J. P. ve Waterhouse, S., 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and Other Moderately Thermophilic Mineral-Sulphide-Oxidizing Bacteria, Microbiology, 142, 775–83.
- Norris, P. R., 1997. Thermophiles and Bioleaching, 72, 247–258.
- Norris, P. R., Burton, N. P. ve Foulis, N. A. M., 2000. Acidophiles in Bioreactor Mineral Processing, Extremophiles, 4, 71-76.

- Palleroni, N. J., 1993. Structure of Bacterial Genome, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd, London.
- Philpott, C. C., Haile, D., Rouault, T. A. ve Klausner, R. D., 1993. Modification of a Free Fe-S Cluster Cysteine Residue in the active Iron-Responsive Element Binding Protein Prevents RNA Binding, J Biol Chem, 268, 17655-17658.
- Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero, J. ve Espejo, R. T., 1996. Bacterial Populations in Samples of Bioleached Copper Ore as Revealed by Analysis of DNA Obtained Before and After Cultivation, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1323-1328.
- Pronk, J.T. ve Johnson, D.B., 1992. Oxidation and Reduction of Iron by Acidophilic Bacteria, Geomicrobiology Journal, 10, 153-171.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S. ve Bonnefoy, V., 2009. Extending the Models for Iron and Sulfur Oxidation in the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, BMC Genomics, 10, 394.
- Rademaker, J. L. W., Hoste B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. ve Bruijn, F.L., 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR Genomic Fingerprinting with DNA-DNA Homology Studies: *Xanthomonas* as a Model System, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 665-677.
- Rawlings, D. E., 1997. Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes, Berlin: Springer-Verlag
- Rawlings, D. E., Tributsch, H. ve Hansford, G. S., 1999. Reasons Why '*Leptospirillum*'-like Species Rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the Dominant Iron-Oxidizing Bacteria in Many Commercial Processes for the Biooxidation of Pyrite and Related Ores, Microbiology, 145, 5-13.
- Rawlings, D. E., 2002. Heavy Metal Mining Using Microbes, Annu. Rev. Microbiol., 56, 65-91.
- Rawlings, D. E. ve Johnson, D. B., 2007. *Biomining*. Springer-Verlag, Heidelberg, 314.
- Rawlings, D. E. ve Silver, S., 1995. Mining With Microbes, Bio/Technology, 13, 773-778.
- Rossi, G., 1990. Biohydrometallurgy. McGraw-Hill Book Company. 609 p. ISBN 3-89028-781-6.
- Rudolfs, W., 1922. Oxidation of Iron Pyrites by S-Oxidizing Organisms and Their Use for Making Mineral Phosphates Available, Soil Sci, 14, 135-146.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Volume 2*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

- Sand, W., Rhode, K., Sobotke, B. ve Zenneck, C., 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for Leaching, Appl Environ Microbiol., 58, 85-92.
- Sandell, E. ve Colodmetti, B., 1944. Determination of Traces of Metals, Interscience, 271-273.
- Schippers, A. ve Sand, W., 1999. Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur, Appl Environ Microbiol., 65, 319-321.
- Schnell, H. A., 1997. Biorecovery of Copper, See Ref. 72, 21–43. Rawlings. D. E., ed. 1997. *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Schrenk, M. O., Edwards, K. J., Goodman, R. M., Hamers, R. J. ve Banfield, J. F., 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage, Science, 279, 1519–1522.
- Segerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J. K. ve Stetter, K. O., 1986. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively Aerobic, Extremely Acidophilic Thermophilic Sulfurmetabolizing Archaeobacteria, Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 559–564.
- Shapira, E. ve Arnon, R., 1969. Cleavage of One Specific Disulfide Bond in Papain, J. Biol. Chem., 244, 1026-1032.
- Silverman, M. P. ve Ehrlich, H. L., Microbial Formation and Degradation of Minerals. Adv. Appl. Microbiol., 1964, 6, 153-206.
- Smith, D. B. ve Johnson, K., 1988. Single-step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* as Fusions with Glutathione S-transferase, Gene, 67, 31–40.
- Smith, J. V., 2005. Geochemical Influences on Life's Origins and Evolution, Elements, 1, 151-156.
- Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., McGrath, W. J., Listwan, P. ve Kobe, B., 2003. Crystal Structures of Fusion Proteins with Large-αYnity Tags, Protein Sci, 12, 1313–1322.
- Stackebrandt, E. ve Goebel, B. M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, Int. J. Sys. Bacteriol., 44, 846-849.
- Stumm, W. ve Morgan, J. J., 1996. Aquatic Chemistry, 3e, Wiley.
- Suzuki, I., Takeuchi, T. L., Yuthasastrakosol, T. D. ve Oh, J. K., 1990. Ferrous Iron and sulfur Oxidation and Ferric Iron Reduction Activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are Affected by Growth on Ferrous Iron, Sulfur, or a Sulfide Ore, Appl Environ Microbiol., 56, 1620–1626.

- Temple, K. L. ve Colmer, A. R., 1951. The Autotrophic Oxidation of Iron by a New Bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*, J. Bacteriol., 62, 605-611.
- Terpe, K., 2003. Overview of Tag Protein Fusions: from Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems, Appl Microbiol Biotechnol., 60, 523–533.
- Torma, A. E. ve Banhegyi, I. G., 1984. Biotechnology in Hydrometallurgical Processes, Trends Biotechnol., 2, 13-15.
- Tuovinen, O. H., Niemela, S. I. ve Gyllenberg, H.G., 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to Some Metals, Antonie van Leeuwenhoek, 37, 489-496.
- Tuovinen, O. H. ve Kelly, D. P., 1973. Studies on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Use of Membrane Filters and Ferrous Iron Agar to Determine Viable Numbers, and Comparison with ¹⁴C¹⁴O₂-fixation and Iron Oxidation as Measures of Growth, Arch. Micro Biol., 88, 285-298.
- URL-1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. 13.05.2011
- URL-2, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. 20.03.2013
- URL-3, http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool. 06.04.2013
- Van Aswegen, P. C., Godfrey, M. W., Miller, D. M. ve Haines, A. K., 1991. Developments and Innovations in Bacterial Oxidation of Refractory Ores, Miner. Metallurg. Process., 8, 188–192.
- Van Berkum, P., Navarro R. B. ve Vargas A. A. T., 1994. Classification of the Uptake Hydrogenase-Positive (Hup⁺) Bean Rhizobia as *Rhizobium tropici*, Appl. Environ. Microbiol., 60, 554-561.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. ve Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- Versalovic, J., Scheneider, M., de Bruijn, F. J. ve Lupski, J.R., 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence Based PCR (rep-PCR), Meth. Cell. Mol. Biol., 5, 25-40.
- Versalovic, J. ve Lupski, J. R., 1996. Distinguishing Bacterial and Fungal Pathogens by Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR), LabMedica International, 13, 12-15.
- Vian, M., Creo, C., Dalmastri, C., Gionni, A., Palazzolo, P. ve Levi, G., 1986. *Thiobacillus ferrooxidans* Selection in Continuous Culture, Fundamental and Applied Biohydrometallurgy, 395–406.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van L. T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Muiper, M. ve Zabeau, M., 1995. AFLP: A New Concept for DNA Fingerprinting, Nucleic Acids Res., 21, 4407-4414.
- Waksman, S. A. ve Joffe, J. S., 1922. The Chemistry of the Oxidation of Sulfur by Microorganisms to Sulfuric Acid and Transformation of Insoluble Phosphates into Soluble Forms, Jour. Biol. Chem., 50, 35-45.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. ve Tingey, S. V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers, Nuc. Acids Res., 18, 6531-6535.
- Winogradsky, S., 1887. Ueber Schwefelbakterien, Botanische Zeitung, 31, 489-507.
- Wolfe, A. D. ve Liston, A., 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, editors. Molecular Systematics of Plants II, New York, 43-86.
- Yamanaka, T., Yano, T., Kai, M., Tamegai, H., Sato, A. ve Fukumori, Y., 1991. The Electron Transfer System in an Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterium, in: Y Mukohata (Ed.), New Era of Bioenergetics, Academic Press, Tokyo, 223-246.
- Yarzabal, A., Appia-Ayme, C., Ratouchniak, J. ve Bonnefoy, V., 2004. Regulation of the Expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* Operon Encoding Two Cytochromes C, a Cytochrome Oxidase and Rusticyanin, Microbiology, 150, 2113-2123.
- Zeng, J., Geng, M., Liu, Y., Zhao, W., Xia, L., Liu, J. ve Qiu, G., 2007. Expression, Purification and Molecular Modeling of the Iro Protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans* Fe-1, Protein Expr. Purif., 52, 146-152.
- Zeng, J., Huidan, J., Yuandong, L., Jianshe, L. ve Guanzhou, Q., 2008. Expression, Purification and Characterization of a High-Potential Iron-Sulfur Protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Biotechnol Lett, 30, 905-910.
- Zeng, J., Qing, L., Xiaojian, Z., Hongyu, M., Yiping, W., Qian, C. ve Yuandong, L., 2010. Functional Roles of the Aromatic Residues in the Stabilization of the [Fe₄S₄] Cluster in the Iro Protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, J. Microbiol. Biotechnol., 20, 2, 294-300.
- Zimmerley, S. R., Wilson, D. G. ve Prater, J. D., 1958. Cyclic Leaching Process Employing Iron Oxidizing Bacteria, U.S. Patent 2,829,964.

8. EKLER

Ek 1. Asidofilik bakteri izolatlarının 16S rRNA Genlerinin Baz Sıraları

KR1 İzolatu

ACGACACTCAGTACGCTAGGCACCAAACATCTAGTATTCATCGTTTAGGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTATTGGGCCAGG
TGGCCGCTTCGCCACTGATGTTCTCCAGATATCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAA
TTCCACCCACCCCTCTCCATACTCTAGTGCGCCGGTTTTCTACCGCCATTCCCAGGTTGAG
CCCCGGGATTTACAGACAGACCTAACGTACCGCCTACGCACCCTTTACGCCAGTGATTCC
GATTAACGCTTGCACCCCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCT
TCTTGATTACAGTCAACAGCAGATTGTATTAGAACCACCTTTTCGTCTCCACGAAAGG
ACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATCCACGCGGCATTGCTTCGTTCAGGGTTGCCCCAT
TGCGAAAAATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGT
GGCTGGTTCGTCTCTCAGACCAGCTACCGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCAA
CTAGCTAATCGGACGTAGGCTCCTCTCTTAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCGCTTTCCCC
CTCAGGGCTCATGCGGTATTAGCCCAAGTTTCCCTGGGTTGTCCCCACTAAAAGACAGAT
TCCTACGCATTACTCACCCGTCCGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTTTCGAC
TTGCATGTGTTAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAATTCG
AATTTCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGNGA

KR2 İzolatu

TCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGTGCTTACCGCGTTAGCTACGACACTGAAGT
GCTAAGCACCCCAACATCCAGCACACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTAATGGACCAGGTTGCCGCTTCGC
CACCGGTGTTCTTTCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGGAAATTCACAACCCCTC
TTCCATACTCAAGACAACACGTCTCAGACGCGAGTCCCAGGTTGAGCCCAGGAATTTACG
CCTGACTGTGCCGTCCGCCTACGCGCCCTTTACGCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGAGCTTATTCTGCGGGTACCGTC
ATCATCGTCCCCGCCAAAAGGACTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCATCCACGCGGCATTG
CTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG
GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGCAGGCTT
GGTAGGCCTTTACCCACCAACTACCTAATCAGACGCAGGCTCCTCCTCAGGCGACTTTTCG
CCTTTGCCCTCAGGGATCATGCGGTATTAGCCGTAGTTTCCCACGGTTGTCCCCACCCA
AGGATAGATTCTACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTGACAGGTTGCCCTGCCCGTGCGA
CTTGATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAATAA
TCGAATTTCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGNANNC

Ek 1.'in devamı**KR3 İzolatu**

TTTCAACCTTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGTGCTTACCGCGTTAGCTACGACACTGA
 AGTGCTAAGCACCCCAACATCCAGCACACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
 ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTAATGGACCAGGTTGCCGCCTT
 CGCCACCGGTGTTCTTTCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGGAAATTCCACAACC
 CTCTTCCATACTCAAGACAACACGTCTCAGACGCAGTCCCCAGGTTGAGCCCAGGAATTTT
 ACGCCTGACTGTGCCGTCCGCCTACGCGCCCTTTACGCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAG
 CCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGAGCTTATTCTGCGGGTACC
 GTCATCATCGTCCCCGCCAAAAGGACTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCATCCACGCGGCA
 TTGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC
 TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGCAGG
 CTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTACCTAATCAGACGCAGGCTCCTCCTCAGGCGACTT
 TCGCCTTTGCCCTCAGGGATCATGCGGTATTAGCCGTAGTTTCCCACGGTTGTCCCCAC
 CCAAGGATAGATTCTACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTGACAGGTTGCCCTGCCCGTG
 CGACTTGCATGTGTTAAGCATGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAA
 TAATCGAATTCCC GCGGCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGATA

KR 4 İzolatu

ATGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGCGCGGTGAGCAATGG
 CAGCGGCCGACGGGTGAGTAACACGTAGGAATCTATCCCAGGGTGGGGGACAACAGCGGGA
 AACTGCTGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTTGGGAGGAGC
 CTGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
 GTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTTGGCAGGGACGATGATGACGGTACCTGCAGAATAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGA
 CTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGCATGTACAGTCAGAAGTGAAATTCCTGGGCTCAACC
 TGGGGACTGCTTTTGATACGTGCAAGCTAGAGTGAGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCCAGTG
 TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGTCCT
 TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCA
 CGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGAAGTTAGTTTCTCAGTGTGCTAGCTAACGC
 GATAAGCACACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGA
 TTTGACATGGGGGAGGACCGGTACAGAGATGTACTTTTCCCGCAAGGGACCTTCCGCACAG
 GTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGAGTTCGTGCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGC
 GCAACCCTTGCTTTTAGTTGCCATCATTTAAGTTGGGCACTCTAAA

Ek 1.'in devamı**KR5 İzolatu**

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGC
 TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAC
 TGAGACGGCTTTTTGAGATCAGCTCGGTGTCACCACCTGGCTTCCCCTGTACCGCCATT
 GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 TCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCGGCCGAACCGCTGGCAACTAAGGACA
 AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT
 GCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCCGAAGGGCACTTCCGCATCTCTGCAGAATTCCGGACAT
 GTCAAGCCCAGGTAAGGTTCTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
 GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTTCCCAGGCGGAATAC
 TTATCGCGTTAGCTACGACACTCAGTACGCTAGGCACCAAACATCTAGTATTTCATCGTTTA
 GGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTC
 AGTATTGGGCCAGGTGGCCGCCTTCGCCACTGATGTTCTCCAGATATCTACGCATTTTAC
 CGCTACACCTGGAATTCACCACCCTCTCCATACTCTAGTGCGCCGGTTTCTACCGCCAT
 TCCCAGGTTGAGCCCAGGGATTTACGACAGACCTAACGTACCGCCTACGCACCCTTTACG
 CCCAGTGATTCCGATTAACGC

KR6 İzolatu

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGC
 TGATCCACGATTACTAGCGATTCCACCTTCATGTACTCGAGTTGCAGAGTACAATCTGAAC
 TGAGATGGCTTTTAGAGATCAGCACGGTATCACTACCTAGCTTCCCCTGTACACCACCTTCC
 GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 TCCGGCTTGTACCGGCAGTTCCTCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAAGGCAA
 GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATG
 CAGCACCTGTGCGGAAGGTCCCTTGCGGGAAAAGTACATCTCTGTACCGGTCTCCCCATG
 TCAAATCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTG
 CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGTGCT
 TATCGCGTTAGCTACGACACTGAAGTGCTAAGCACCCCAACATCCAGCACACATCGTTTAC
 AGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA
 GTAATGGACCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTTCCAATATCTACGAATTTACC
 TCTACACTGGAAATTCACAACCCTCTTCCATACTCAAGACAACACGTCTCAGACGCAGTC
 CCCAGGTTGAGCCCAGGAATTTACGCCTGACCGTGCCGTCCGCCTACGCGCCCTTTACGC
 CCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAG
 CCGGAGCTTATTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCCAAAAGGACTTTACAATCCGA
 AGACCTTCTTCATCCACGCGGCATTGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTC

Ek 1.'in devamı**KR7 İzolatu**

ATGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGCACGGGCAGGGCAAC
 CTGTTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATCCTTGGGTGGGGGACAACCGT
 GGGAAACTACGGCTAATACCGCATGATCCCTGAGGGGCAAAGGCGAAAGTCGCCTGAGGAG
 GAGCCTGCGTCTGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCTGCGATCAGTAGC
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAA
 GAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACTTTTGGCAGGGACGATGATGACGGTACCTGCAGAATA
 AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGA
 ATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCATGTACAGTCAGAAGTGAAATTCTGGGCTC
 AACCTGGGGACTGCTTTTGATACGTGCAAGCTAGAGTGAGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCC
 AGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGG
 TCCTTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAG
 TCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGAACCTAGTTTCTCAGTGTCTGTAGCTA
 ACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCA
 GGATTTGACATGGGGAGGACCGGTACAGAGATGTACTTTTCCCGCAAGGGACCTTCCGCAC
 AGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTTGCCTTTAGTTGGCATCATTTAGTTGGGCACTCTAA

KR8 İzolatu

ATGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGCGCGGTCAGCAATGG
 CAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGAATCTATCCCAGGGTGGGGGACAACAGCGGGA
 AACTGCTGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTTGGGAGGAGC
 CTGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGAAGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAG
 GCCTTCGGGTGTAAAGTCTTTCTGTGGGGACGAAAAGGTGGTTCCTAATACGAGCTGCT
 GTTGACGTGAACCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
 GGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTACGTTAGGTC
 TGTCTGTAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGGTAGAAACCGGCGAACTAGAGTATG
 GGAGAGGGTGGGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATC
 AGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAGATGTTTGGTACCT
 AGCGTACTGAGTGTCTGTAGCTAACGCGATAAGTATTCGCTGGGAAGTACGGCCGCAAGG
 TTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAACCATGGTGGTTAATTC
 GATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGAATGCGGG
 AGTGCCCTTCGGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGGA
 GAAGGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTA

Ek 1.'in devamı**KR9 İzolatu**

ATGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGCGCGGTCAGCAATGG
 CAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGAATCTATCCCAGGGTGGGGGACAACAGCGGGA
 AACTGCTGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTTGGGAGGAGC
 CTGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
 GTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTTGGCAGGGACGATGATGACGGTACCTGCAGAATAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGA
 CTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCATGTACAGTCAGAAGTGAAATTCCTGGGCTCAACC
 TGGGGACTGCTTTTGGTACGTGCAAGCTAGAGTGAGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCCAGTG
 TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGTCCT
 TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGAACCTTAGTTTCTCAGTGTCTGATAGCTAACGC
 GATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGAT
 TTGACATGGGGGAGGACCGGTACAGAGATGTACTTTTCCCGCAAGGGACCTTCCGCACAGG
 TGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCCTGTCTCTGAAA

KR10 İzolatu

ATGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGCGCGGTCAGCAATGG
 CAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGAATCTATCCCAGGGTGGGGGACAACAGCGGGA
 AACTGCTGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTTGGGAGGAGC
 CTGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
 GTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTTGGCAGGGACGATGATGACGGTACCTGCAGAATAAGCC
 CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGA
 CTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCATGTACAGTCAGAAGTGAAATTCCTGGGCTCAACC
 TGGGGACTGCTTTTGGTACGTGCAAGCTAGAGTGAGGAAGAGGGTTGTGGAATTTCCAGTG
 TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGTCCT
 TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGGAACCTTAGTTTCTCAGTGTCTGATAGCTAACGC
 GATAAGCACACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGA
 TTTGACATGGGGGAGGACCGGTACAGAGATGTACTTTTCCCGCAAGGGACCTTCCGCACAG
 GTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCCTGTCTCTGAAA

Ek 1.'in devamı**Z2 İzolatu**

ATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCT
 TCGGATGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTGTCTTTTAGTGGGG
 ACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGCATGAGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGGGATCTT
 CGGACCTCGCGCTAAGGGAGGAGCCTACGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTA
 CCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTTCGCAATGGGGGCAACCCTGACGA
 AGCAATGCCGCGTGGATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTCTTTTCGTGGAGGACGAAA
 AGGCGGGTTCTAATACAATCTGCTGTTGACGTGAATCCAAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCACTGGGCGTAAAG
 GGTGCGTAGGCGGTACGTTAGTCTGTTCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGG
 TGGAAACCGGCGGACTAGAGTATGGGAGAGGGGTNGGGTGGGAATTCAGGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGCCCAATACTGAC
 GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAA
 ACGATGAATACTAGATGTTTGGTGCCACGCGTACTGAGTGTCGTAGCTAACGCGATAAGTA
 TT

M1 İzolatu

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGC
 TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGCAGTCGAGTTGCAGACTGCAATCCGAAC
 TACGACGCGCTTTCTGGGGTCTGCTCCACCTCGCGGCTTGGCTTCCCTCTGTACGCGCCAT
 TGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACATAAAGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
 CTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCGGCCGAACCGCTGGCAACTAAGGAC
 AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCA
 TGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCCGAAGGGCACTCCCGCATCTCTGCAGAATTCGGGACA
 TGTCAAGCCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
 TGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTTCCCAGGCGGAATA
 CTTATCGCGTTAGCTACGACACTCAGTACGCTAGGTACCAACATCTAGTATTCATCGTTT
 AGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGTGCCCTCAGCGT
 CAGTATTGGGCCAGGTGGCCGCTTCGCCACTGATGTTCTCCAGATCTCTACGCATTTCA
 CCGCTACACCTGGAATTCCACCACCCTCTCCATACTCTAGTGCGCCGGTTTTCTANCGGCC
 ATTCCCAGGTTGAGCCCGGGATTTTCACGACAGACCTAACGTACNGCCTACGCACCCTTT
 ACGACCAGTGATTTCCGATTAACGCTTGCACCCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA
 GTTAGCCGGTGCTTCTTCTTGGGTTACGTCACAGCAGATCGTATTAGGACCCGCCTTTT
 CGTCCCCACGAAAGGACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATCCACGCGGCATTGCTTC

Ek 1.'in devamı**KR1 İzolatı (37 °C'de büyütülmüş)**

ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCATCGTTCTG
 ATATGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTG
 GGACCGGTTTTCTCGGGTTTGCTCCGCCTCTCGGCATTGCCTCCGTCTGTACCGGCCATTG
 TTGCACGTGTGTGGCCCTAGGCATAAAGGCCATGATGACTTGACGTCACTCTCCTTCCT
 CCAACTTGTGCTGCTGGCAGTCCCCTTAGAGTGCCCGGCTTTACCCGATGGCAACAAAGGGCG
 AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTGAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCAT
 GCAGCACCTGTGTGATTGCCGATTTGACGGGTCGCTCCCCTTTCGGTTTCGCTACTGACCA
 CATGTCAAGCCTAGGTAAGGTTCCCTCGCGTTGCGTCAATTAACACATGCACCACCGCT
 TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCAGGGCGGGG
 TACTTACTGCGTTTGCTGCGGCACGGAGGGTTTAACCCCTCCACACTTAGTACCCATCGTT
 TAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTCTCTCAGTG
 TCAGGACTGTTCCAGGAAGCCGCCTTCGCCACCGGCCTTCCTTCTGATATCTACGCATTTT
 ACCGCTACACCAGAAATTCCGCTTCCCTCTCCCAGCCTCCAGCCTGCCAGTCTCTTTGGCA
 TTCCCATAGTTAAGCTACGGCCTTTCACCAAAGACTTGACAAACCACCTGCAGACTCTTTA
 CGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTTGCCACCTCTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGT
 TAGCCGTGGCTTATTCTCACGGTACCGTCATCGGGGGATATTTATTTGATATCCCTTTTTT
 CGTCCCAGTAAAAATGGGTTTACGAACCCGAAAGGCCTTCTTTCCACACGCGGGGGTTG
 CT

KR1 İzolatı (55 °C'de 10g/l pirit içerisinde büyütülmüş)

AAATCCGGTTGATCCTGCCGGACCCGACCGCTATCGGGGTGGGGCTAAGCCATGGGAGTCG
 TACGCTCCCGGGCAAGGGAGCGTGGCGGACGGCTGAGTAACACGTGGCTAACCTACCCTGA
 GGAGGGAGATAACCCCGGGAAACTGGGGATAATCTCCCATAGGCGAGGAGTCTTGAACGG
 TTCCTCGCTGAAAGGCTCATGGGCTATTCCCCGCTCATGAGCGCCTCAGGATGGGGCTGCG
 GCCCATCAGGTAGTTGGGGGGTAAGGGCCCCCAAGCCTATAACGGGTAGGGGCCGTGAG
 AGCGGGAGCCCCAGTTGGGCACTGAGACAAGGGCCAGGCCCTACGGGGCGCACCCAGGCG
 CGAAACGTCCCCAATGCGCGGAAGCGTGAGGGCGCCACCCGAGTGCTCCCGTAAGGGAGC
 TTTTCCCCGCTCTACAAAGGCGGGGGAATAAGCGGGGGGCAAGTCTGGTGTGACCCGCCGC
 GGTAATACCAGCCCCGCGAGTGGTCGGGACTCTTACTGGGCCTAAAGCGCCCGTAGCCGGC
 CCGACAAGTCACTCCTTAAAGACCCCGGCTCAACCGGGGAATGGGGGTGATACTGTGCGG
 CTAGGGGGCGGGAGAGGCCAGCGGTACTCCCGGAGTAGGGGCGAAATCCTCAGATCTCGGG
 AGGACCACCAGTGGCGAAAGCGGCTGGCTAGAACGCGCCCGACGGTGAGGGGGCGAAAGCCG
 GGGCAGCAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCCGGCTGTAACAATGCAGGCTAGGTGT
 CACATGGGCTTAGAGCCCATGTGGTGCCGCAGGGAAGCCGTTAAGCCTGCCGCTGGGGAG
 TACGGTCGCAAGACTGAACTTAAAGGAATTTGGCGGGGGAGCACCACAAGGGGTGGAACCT
 GCGGCTCAATTGGAGTCAACGCCTGGAATCTTACCAGGGGAGACCCGAGGATGACGGCCAG
 GCTAACGACCTTGCCTGACTCGCGGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGCCAGCTCGTGTGTG
 AAATGTCCTGTTA

Ek 2. *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Suşuna Ait Demir Oksidaz Kodlayan *iro* Geninin Baz Sırası

ATGAGTGAGAACTGAAGGAAACCGGAAATGCCAAGGCTGGGAACATAAGCCGTCGTGACA
 TGTTGAAAGGTATCGCCATTACGGCCGGCGTCGTGGCTGCGGGGACGGTGGTCGGAGTAAA
 TCCCATCGGTGCCGCCCATGCAGCGGGTAATTGCCCGGGGACCACGCCCAAGGCGGAAGTA
 CAATATCAGCCACACCCCAAGGGGAAGGATCAGTGCTCTGTCTGCGCCAATTTTATTGCC
 CGAAGTGCTGTAAGGTGGTAGCCGGACCCGTCGCACCCGACGGGTATTGTATCGCGTTCAC
 GCCGATGCCCGCATAA

Protein Sırası

MSEKLLKETGNAKAGNISRRDMLKGI AITAGVVAAGTVVGVNPIGAAHAAGNCPGTTPKAEV
 QYQPHPKGKDQCSVCANFIAPKCKV VAGPVAPDGYCIAFTPMPA

Ek 3. *Iro* Geninin Ribulokinaz Geni ile Birleştirilmesi Sonucunda Oluşan Füzyon Geninin Baz Sırası

ATGGGGAAAAAGTATGTCATTGGTATCGACTATGGGACGGAATCGGGACGCGCCGTCTCG
 TTGATCTGGAAGGGAACGAAATTGCGGACCACGTCACCCCGTATCATCACGGAGTCATTGA
 TGAAGTGTGCCGGAATCGAACGTACAACCTAGAACCAGACTGGGCACTGCAGCACCCGGGC
 GATTATATCGAAGTGTGGCGACCGCTGTTCCAGCTGTATTGCAAAAGTCAGGGGTTAACC
 CGGCGGATGTGATCGGGGTCGGAATTGATTTTACAGCTTGTACGATGTTGCCGATCTCTGG
 CTCCGGCGAGCCGCTTTGCTTGAAGCCC GAATTCAAGCATCGCCACACAGCTGGGTGAAA
 TTGTGGAAGCATCATGCTGCCCAGGATGAAGCGAACTTGCTCAATGAAATGGCGGCGAAAA
 GGGGGGAAGCGTTTTTTACCGCGCTACGGTGGAAAAATTTTCATCGGAATGGATGATTGCGAA
 AATTTGGCAGATTCTGAATGAAGATCCGGATATTTATGACCAAACCGATCTCTTTTTAGAG
 GCAACCGACTGGGTGATCTTCAAAATGACCGGTCAACTTGTGCGCAACAGCTGCACGGCCG
 GTTATAAGTCGATTTGGCATAAACAAGACGGCTATCCGAGTAAGGAGTTTTTTCAGAGCGCT
 TGATCCGCGACTGGAACACTTAACAGAATCGAAACTTCGCGGTTTCGATCGTTCCGCTCGGC
 ACAAGGGCAGGAGTACTGACGAAGGAAATGGCGGCCATGATGGGCCTTCTTCCGGGAACAG
 CCGTTGCAGTCGGAATGTCGATGCTCATGCGGCCGTACCGGGTGTGGGGTCTTGAACC
 GGGCAAAATGGTGTGATGGCGATGGGAACATCGATATGCCATATGTTACTTGGTACGGAAGAA
 AAGTATGTGGAAGGAATGTGCGGGGTTGTGCGAGGATGGCATCATTCGGGGATATTTCCGGCT
 ATGAAGCCGGGCAGTCAGCGGTGGGCGACATTTTCGCTTGGTATGTTGAACAAAGTGTTC
 GGCCTATGTGAAAGAAGCAGCGGAAAAAGAGGGAGTTAGTGTCCATGAGTGGCTTGAAAAG
 CGAGCCGCTGCCTATCGGCCGGGGGAAACAGGACTGCTCGCTTTAGACTGGTGGAAACGGAA
 ACCGTTTCAGTATTGGTCGACACGGATTTAACCGGGTTGATCATCGGTTATACGTTGCTGAC
 GAAACCGGAAGAAATTTACCGTGCATTGCTTGAAGCAACGGCCTTCCGGTACACGGAAAATT
 ATCGACGCCTTTGTTGGAAGCGGTATCAATGTGGATGAGCTGTATGCATGTGGCGGATTGC
 CACAAAAAATAAGTTACTCATGCAAATTTATGCCGATGTGACCAACCGTGAGATTAATAAT
 TGCAGCGTCGAAGCAAACCTCCAGCGGTAGGAGCTGCTATGTTTCGCGGCGGTTCGCGGCCGGC
 AAAGAAAACGGTGGGTATGAATCAATTATTGAAGCGGCACGAAACATGGGGAAAGTACGGG
 AAGAAACATTCAGCCAATTCGGGAGAATGTCGCCATTTATGAACAGTTGTATCAAGAATA
 TACGAAGCTGCATGACTATTTTGGTCGTGGGGAAAACGATGTGATGAAGCGGCTTAAACAT
 TGGAAAGAGACCGCACGGGCGGTGAAAAAATCTATAAGTTTATCGGACGACGACACAAGC
TCGAGATGAGTGAGAACTGAAGGAAACCGGAAATGCCAAGGCTGGGAACATAAGCCGTCTG
 TGACATGTTGAAAGGTATCGCCATTACGGCCGGCGTCGTGGCTGCGGGACGGTGGTTCGGA
 GTAAATCCCATCGGTGCCGCCCATGCAGCGGGTAATTGCCCGGGGACCACGCCCAAGGCGG
 AAGTACAATATCAGCCACACCCCAAGGGGAAGGATCAGTGCTCTGTCTGCGCCAATTTTAT
 TGCCCCGAAGTGTGTAAGGTGGTAGCCGGACCCGTCGCACCCGACGGGTATTGTATCGCG
 TTCACGCCGATGCCCGCATAA

Ek 3.'ün devamı**Protein sırası**

MGKKYVIGIDYGTESGRAVLVDLEGNEIADHVTPYHHGVIDEVLPESNVQLEPDWALQH
 PGDYIEVLATAVPAVLQKSGVNPADVIGVIGIDFTACTMLPISGSGEPLCLKPEFKHRPHSWK
 LWKHAAQDEANLLNEMAAKRGEAFLPRYGGKISSEWMIAKIWQILNEDPDIYDQTDLFLE
 ATDWVIFKMTGQLVRNSCTAGYKSIWHKQDGYPSKEFFRALDPRLEHLTESKLRGSIVPLG
 TRAGVLTKEMAAMMGLLPGTAVAVGNVDAHAAPGVGVVEPGKMVMAMGTSICHMLLGTEE
 KYVEGMCVVEDGIIPGYFGYEAGQSAVGDIFAWYVEQSVPAYVKEAAEKEGVSVHEWLEK
 RAAAYRPGETGLLALDWWNGNRSVLVDTDLTGLIIGYTLLTKPEEIYRALLEATAFGTRKI
 IDAFVGSIGINVDELYACGGLPQKNKLLMQIYADVTNREIKIAASKQTPAVGAAMFAAVAAG
 KENGGYESII EAARNMGKVREETFKPIPENVAIYEQLYQEYTKLHDYFGRGENDVMKRLKH
 WKETARAVKKSISLSDDDDKLEMSEKLKETGNAKAGNISRRDMLKGIAITAGVVAAGTVVG
 VNPIGAHAAGNCPGTTPKAEVQYQPHPKGKDQCSVCANFIAPKCCKVVAGPVAPDGYCIA
 FTPMPA

Ek 4. Sinyal Peptidi Çıkarılan Demir Oksidaz Proteinini Kodlayan *iro* Geninin Baz Sırası

ATGGGGACCACGCCCAAGGCGGAAGTACAATATCAGCCACACCCCAAGGGGAAGGATCAGT
GCTCTGTCTGCGCCAATTTTATTGCCCGAAGTGCTGTAAGGTGGTAGCCGGACCCGTCGC
ACCCGACGGGTATTGTATCGCGTTCACGCCGATGCCCGCATAA

Protein sırası

MGTTTPKAEVQYQPHPKGKDQCSVCANFIAPKCCKVVAGPVAPDGYCIAFTPMPA

Ek 5. Demir Oksidaz Proteinini Kodlayan *iro* Geni Q9F Mutantının Baz Sırası

ATGGGGACCACGCCCAAGGCGGAAGTATTCTATCAGCCACACCCCAAGGGGAAGGATCAGT
GCTCTGTCTGCGCCAATTTTATTGCCCGAAGTGCTGTAAGGTGGTAGCCGGACCCGTCGC
ACCCGACGGGTATTGTATCGCGTTCACGCCGATGCCCGCATAA

Protein sırası

MGTTTPKAEVFYQPHPKGKDQCSVCANFIAPKCCKVVAGPVAPDGYCIAFTPMPA

Ek 6. Demir Oksidaz Proteinini Kodlayan *iro* Geni S21Y/V22D Mutantının Baz Sırası

ATGGGGACCACGCCCAAGGCGGAAGTACAATATCAGCCACACCCCAAGGGGAAGGATCAGT
GCTTATGACTGCGCCAATTTTATTGCCCGAAGTGCTGTAAGGTGGTAGCCGGACCCGTCGC
ACCCGACGGGTATTGTATCGCGTTCACGCCGATGCCCGCATAA

Protein sırası

MGTTTPKAEVQYQPHPKGKDQCYDCANFIAPKCCKVVAGPVAPDGYCIAFTPMPA

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Gümüşhane'de, Gazi Paşa İlk Öğretim Okulunda, Orta ve Lise öğrenimini Gümüşhane Ali Fuat Kadirbeyođlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 1999-2000 öğretim yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2003 yılında bu bölümden biyolog unvanı ile mezun oldu. 2004 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2007 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2005-2013 yılları arasında K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı.