

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PROTEOMİK YAKLAŞIMLA ATIKSU KAYNAKLI
MİKROORGANİZMALARDA Cr(VI) DİRENÇ YOLLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Nur KOÇBERBER KILIÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2008**

Her hakkı saklıdır

Nur KOÇBERBER KILIÇ tarafından hazırlanan “Proteomik Yaklaşımla Atıksu Kaynaklı Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnç Yollarının Araştırılması” adlı tez çalışması 02.04.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Şevki YAZGAN

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Üye: Prof. Dr. Zümriye AKSU

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Üye: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Üye: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

PROTEOMİK YAKLAŞIMLA ATIKSU KAYNAKLI MİKROORGANİZMALARDA Cr(VI) DİRENÇ YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

Nur KOÇBERBER KILIÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Tez çalışması, Cr(VI) içeren atıksulardan izole edilen dört farklı mikroorganizmanın (*Ochrobactrum* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* ve *B. cereus*) Cr(VI) biyobirikim kapasitelerinin belirlendiği bir çalışmadır. Bu mikroorganizmaların ağır metallere karşı oluşturduğu direnç mekanizmaları 2D jel elektroforezi ve kütle spektrofotometrisi çalışmaları ile aydınlatılmıştır.

Mikroorganizmaların biyobirikim kapasiteleri 300 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyerlerinde belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin bu ortamda ağır metal biyobirikimi yapmadığı fakat 300 ppm Cr(VI) konsantrasyonunu tolere ederek gelişebildiği görülmüştür.

Krom(VI) ağır metale karşı oluşturulan mikrobiyel direnç mekanizmalarının belirlenmesi için izolatlar, nutrient broth besiyerinde geliştirilmiştir. Kirleticiye cevap olarak daha fazla sentezlenen proteinlerin bulunması için, Cr(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamlarda geliştirilen bakterilerden sitozol ve toplam zar proteinleri izole edilmiştir.

Ochrobactrum sp. bakterisinin kirleticiye maruz bırakıldığında daha fazla sentezlediği proteinler, stres proteinleri (Moleküler şaperonlar), protein biyosentezinde görevli proteinler (ribozomal proteinler), taşıyıcı proteinler, enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, flavoprotein), dış zar proteinleri gibi başlıklar altında toplanmıştır. *P. aeruginosa* bakterisinde ise kirletici olan ortamda daha fazla sentezlenen proteinler, stres proteinleri (Moleküler şaperonlar), protein biyosentezinde görevli proteinler (Ribozomal proteinler, inozin-5-monofosfat dehidrogenaz ve uzama faktör Tu), enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, flavoprotein, malat dehidrogenaz ve fruktoz-1,6-bisfosfataz), serbest radikal oluşumunu önleyen proteinler (Glutasyon-S-transferaz ve GSH sentetaz), dış zar proteinleri ve serin proteaz (MucD) gibi gruplara ayrılmıştır. *B. thuringiensis* ve *B. cereus*'un 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda daha fazla sentezlenen proteinleri, protein biyosentezinde görevli proteinler (Ribozomal proteinler, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz, uzama faktör Tu), enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, pirüvat dehidrogenaz, alanin dehidrogenaz, bütirat kinaz; transaldolaz), stres proteinleri (Peptidil prolil izomeraz) ve yüzey tabaka proteinleri gibi gruplara ayrılmıştır. Tanımlanan proteinlere göre bakterilerin Cr(VI) ağır metale karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları metali hücre dışına taşıma ve/veya hücre dışında tutma gibi sistemlerdir. Biyobirikim çalışmalarında ortama uygulanan Cr(VI) konsantrasyonunun inkübasyon süresi boyunca sabit kalması, belirlenen mikrobiyel direnç sistemlerinin *Ochrobactrum* sp., *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* bakterileri tarafından kullanıldığını kanıtlamaktadır.

Nisan 2008, 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: Atıksu, Mikroorganizma, Ağır metal, Biyobirikim, Direnç mekanizmaları

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE INVESTIGATION of Cr(VI) RESISTANCE MECHANISMS WITH a PROTEOMIC APPROACH IN MICROORGANISMS ISOLATED FROM WASTEWATER

Nur KOÇBERBER KILIÇ

Ankara University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

This thesis is a study of the Cr(VI) bioaccumulation capacities of four different microorganisms (*Ochrobactrum* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*) isolated from wastewaters containing Cr(VI). 2D gel electrophoresis and mass spectrophotometry were used to explain the mechanisms by which microorganisms develop resistance against heavy metals were explained by.

Bioaccumulation capacities of microorganisms were determined on nutrient broth media with 300 ppm Cr(VI). In this media, it was determined that the bacteria used in the study did not bioaccumulate the heavy metal, but grow by tolerating 300 ppm Cr(VI) concentration.

To determine microbial resistance mechanisms developed against Cr(VI), the isolates were cultivated in nutrient broth media. The cytosolic and the total membrane proteins of the bacteria cultivated in media with 300 ppm Cr(VI) and without Cr(VI) were isolated to determine which proteins were upregulated in response to the pollutant. For *Ochrobactrum* sp., the following proteins were upregulated: stress proteins (molecular chaperons), proteins responsible for protein biosynthesis (ribosomal proteins), transporters, and proteins responsible for energy production (ATP synthase, flavoprotein), and outer membrane proteins. The corresponding proteins for *P. aeruginosa* were stress proteins (molecular chaperones), proteins responsible for protein biosynthesis (ribosomal proteins, inosine-5-monophosphate dehydrogenase and elongation factor Tu), proteins responsible for energy production (ATP synthase, flavoprotein, malat dehydrogenase, fructose-1,6-bisphosphatase), proteins preventing formation of free radicals (Glutathione-S-transferase and GSH synthetase), outer membrane proteins and serine protease (MucD). Finally, for *B. thuringiensis* and *B. cereus* the following proteins were observed to be upregulated: proteins responsible for protein biosynthesis (ribosomal proteins, hypoxantine-guanine phosphoribosil transferase, elongation factor Tu), proteins responsible for energy production (ATP synthase, pyruvat dehydrogenase, alanine dehydrogenase, butyrate kinase, transaldolase), stress proteins (peptdyl prolyl isomerase), and and s-layer proteins. Based on these proteins, we propose that the prevailing Cr(VI)-resistance mechanisms involved transporting the metal to the outside of the cell and/or binding the metal outside of the cell. In bioaccumulation studies, the stability of Cr(VI) concentration during the incubation period proved that the microbial resistance mechanisms identified was used by *Ochrobactrum* sp. *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* and *B. cereus*.

April 2008, 90 pages

Key Words: Wastewater, Microorganism, Heavy metal, Bioaccumulation, Resistance mechanisms

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, çalıőmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen ve aynı zamanda kendimi geliőtirmem için beni sürekli teővik eden, destekleyen ve yönlendiren tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e, tez çalıőmalarım sırasında laboratuvar olanakları ile bilimsel fikirlerini benden hiç esirgemeyen Aalborg Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Daniel OTZEN'e ve Doç. Dr. Allan STENSBALLE'ye, tezimin hazırlanması sırasında her türlü olanağı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne, çalıőmalarım sırasında beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e, deneylerim sırasında yardım ve desteğini gördüğüm bütün laboratuvar arkadaşlarıma, her konuda desteklerini aldığım ve tezimin hazırlandığı sürede gösterdikleri sabır, ilgi ve hoşgörüden dolayı başta eőim olmak üzere tüm aileme sonsuz őükran ve teőekkürlerimi sunarım.

NUR KOÇBERBER KILIÇ

Ankara, Nisan 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Endüstriyel Atıksular ve Özellikleri.....	3
2.2 Ağır Metaller ve Özellikleri.....	4
2.2.1 Krom özellikleri.....	4
2.3 Krom(VI) İçeren Atıksuların Arıtımı.....	5
2.3.1 Kimyasal yöntemlerle arıtım.....	5
2.3.2 Biyolojik yöntemlerle arıtım.....	7
2.3.3 Krom(VI) gideriminde mikroorganizmalarla yapılan biyosorpsiyon ve biyobirikim çalışmaları.....	7
2.4 Mikroorganizmalarda Ağır Metallere Direnç.....	14
2.4.1 Metalin hücre içine alınmaması.....	15
2.4.2 Metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması.....	15
2.4.3 Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi.....	16
2.4.4 Metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması.....	19
2.4.5 Metalin hücre dışında tutulması.....	22
2.5 Mikroorganizmalarda Cr(VI) direnci.....	23
2.5.1 Krom(VI)'nın hücre dışına atılması.....	23
2.5.2 Krom(VI)'nin aerobik indirgenmesi.....	25
2.5.3 Krom(VI)'nin anaerobik indirgenmesi.....	25
2.6 Proteom Çalışmaları.....	26
2.6.1 Mikroorganizmalarda ağır metal direnç sistemleri ile ilgili yapılan proteom çalışmaları.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1 Materyal.....	29
3.1.1 Atıksu.....	29
3.1.2 Krom(VI) çözeltisi.....	29
3.2 Yöntem.....	29
3.2.1 Saf kültürlerin eldesi.....	29
3.2.2 Saf kültürlerin tanımlanmaları.....	30
3.2.3 Saf kültürlerle yapılan Cr(VI) biyobirikim çalışmaları.....	30
3.2.4 Krom(VI)'ya dirençli mikroorganizmaların proteom çalışmaları.....	31
3.2.5 Mikroorganizmalardan plazmid izolasyonu.....	35
3.3 Analitik Yöntemler.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1 Saf Kültürler ve Tanımlanmaları.....	37
4.2 Saf Kültürlerle yapılan Cr(VI) biyobirikim çalışmaları.....	38
4.3 Mikrobiyel Cr(VI) giderim mekanizmalarının proteomik yaklaşımla açıklanması.....	42
4.3.1 <i>Ochrobactrum</i> sp. ile 2D jel elektroforezi çalışmaları.....	43
4.3.2 <i>P. aeruginosa</i> ile 2D jel elektroforezi çalışmaları.....	49
4.3.3 <i>B. thuringiensis</i> ile 2D jel elektroforezi çalışmaları.....	57

4.3.4 <i>B. cereus</i> ile 2D jel elektroforezi çalışmaları.....	60
4.3.5 Krom(VI) ağır metale dirençli bakterilerin plazmidlerinin belirlenmesi	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
5.1 <i>Ochrobactrum</i> sp. için Cr(VI) giderim mekanizması.....	65
5.2 <i>P. aeruginosa</i> için Cr(VI) giderim mekanizması	69
5.3 <i>B. thuringiensis</i> için Cr(VI) giderim mekanizması.....	74
5.4 <i>B. cereus</i> için Cr(VI) giderim mekanizması	77
5.5 Bakterilerden izole edilen plazmidlerin Cr(VI) direnç sistemleri ile ilişkisi.....	79
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.2 Mikroorganizmalarda Cr(VI) direncinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.3 ChrA proteinin şematik gösterimi	24
Şekil 4.1 <i>Ochrobactrum</i> sp. (izolat 1)	37
Şekil 4.2 <i>P. aeruginosa</i> (izolat 2)	37
Şekil 4.3 <i>B. thuringiensis</i> (izolat 3)	38
Şekil 4.4 <i>B. cereus</i> (izolat 4).....	38
Şekil 4.5 <i>Ochrobactrum</i> sp. bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi.....	39
Şekil 4.6 <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi.....	40
Şekil 4.7 <i>B. thuringiensis</i> bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi	41
Şekil 4.8 <i>B. cereus</i> bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi	42
Şekil 4.9 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>Ochrobactrum</i> sp.'den izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri.....	44
Şekil 4.10 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>Ochrobactrum</i> sp.'den izole edilen toplam zar proteinlerinin 2D profilleri	47
Şekil 4.11 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>P. aeruginosa</i> 'dan izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri.....	50
Şekil 4.12 <i>P. aeruginosa</i> Cr(VI) stresine maruz kaldığında farklı olarak sentezlenen sitozol proteinleri.....	51
Şekil 4.13 <i>P. aeruginosa</i> Cr(VI) stresine maruz kaldığında farklı olarak sentezlenen sitozol proteinleri ve kütle spektrofotometri ile tanımlanan proteinler.....	52
Şekil 4.14 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>P. aeruginosa</i> 'dan izole edilen toplam zar proteinlerinin 2D profilleri	55
Şekil 4.15 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>B. thuringiensis</i> 'den izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri.....	58
Şekil 4.16 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş <i>B. cereus</i> 'dan izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri	61
Şekil 4.17 Krom(VI) içermeyen ve 50 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilen bakterilerden izole edilen plazmidler	63
Şekil 4.18 <i>E.coli</i> 'den tekrar izole edilen <i>Ochrobactrum</i> sp.'ye ait plazmid	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 <i>Ochrobactrum</i> sp.'nin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerinin tanımlanmaları.....	46
Çizelge 4.2 <i>Ochrobactrum</i> sp.'nin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen toplam zar proteinlerin tanımlanmaları.....	48
Çizelge 4.3 <i>P. aeruginosa</i> 'nın 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerinin tanımlanmaları	54
Çizelge 4.4 <i>P. aeruginosa</i> 'nın 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen toplam zar proteinlerinin tanımlanmaları	56
Çizelge 4.5 <i>B. thuringiensis</i> 'in 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerin tanımlanmaları.....	59
Çizelge 4.6 <i>B. cereus</i> 'un 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerin tanımlanmaları.....	62

1. GİRİŞ

Endüstriyel atıksuların en önemli kirleticilerinden olan ağır metal iyonları bazı mikroorganizmalar tarafından bu iyonlarca kirletilmiş sulardan kolaylıkla uzaklaştırılmaktadır. Bu canlılar tarafından gerçekleştirilen ağır metal giderimi, ağır metallere karşı canlı hücrenin oluşturduğu çeşitli direnç mekanizmaları ile mümkün olmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış mikrobiyel direnç mekanizmaları metalin hücre içine alınmaması, metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması, metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi, metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması ve metalin hücre dışında tutulması gibi sistemleri kapsamaktadır. Bu direnç sistemleri tamamen proteinlerle kontrol edilmektedir. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek için bazı proteinlerin sentezini artırma veya farklı proteinler sentezleme yoluna gidebilmektedir.

Proteinlerin başrolü aldığı mikrobiyel direnç sistemlerini izlemek, ancak proteomik çalışmalarla mümkün olmaktadır. Bununla ilgili yapılan ilk çalışmalarda, Ni(II)'ye direnç gösterdiği bulunan *Streptomyces acidiscabies* bakterisinin Ni(II) bulunan ve bulunmayan ortamlardaki proteom analizleri yapılarak hücre içi proteinlerinin metal direnç sistemleri ile ilişkisi belirlenmiş, Ni(II) içeren ortamlarda glikoliz ile ilgili bazı enzimlerin sentezinin arttığı, demir içeren süperoksit dismutazın sentezinin ise engellendiği bulunmuştur (Schmidt *et al.* 2005). Ayrıca bu tip proteom çalışmalarıyla, Pb(II) ve Co(II) stresine maruz bırakılan *Pseudomonas fluorescens* bakterisinde SpoVG, enolaz, ksiloziltransferaz ve uzama faktör-Tu gibi proteinlerin daha fazla sentezlendiği de tespit edilmiştir (Sharma *et al.* 2006). *Klebsiella pneumonia* bakterisinin Co(II) ağır metaline maruz bırakıldığında DNA giraz ve L-izoaspartil protein karboksil metil transferaz olmak üzere iki proteininin sentezini artırdığı belirlenmiştir (Bar *et al.* 2007).

Endüstriyel atıksularda oldukça fazla bulunan Cr(VI) ağır metali, aktif olarak gelişen mikrobiyel hücre tarafından etkin bir şekilde detoksifiye edilmektedir. Fakat bu mikrobiyel hücrelerin hangi mekanizma ile Cr(VI) direncini gerçekleştirdiği tam olarak aydınlatılmamıştır.

Literatürde oldukça yeni olan bu çalışmalarda Cr(VI) gideriminden sorumlu proteinlerle yalnızca *P. aeruginosa* bakterisinin sahip olduğu plazmid üzerinden kodlanan ve Cr(VI) ağır metalini hücre dışına atmaktan sorumlu bir protein tanımlanmıştır (Jienez Mejia *et al.* 2006).

Farklı bakteri türlerindeki Cr(VI) direnç mekanizmalarını aydınlatmak ve dirençten sorumlu proteinleri belirlemek amacıyla planlanan tez çalışmasında, Cr(VI) içeren deri endüstrisi atıksularından izole edilen bakterilerdeki Cr(VI) direnç mekanizmaları proteomik yaklaşımla açıklanmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, Cr(VI) içeren ve içermeyen ortamlarda geliştirilen mikroorganizmaların protein içeriğinin değişimi proteom analizleri ile tespit edilmiştir. Denemeler, iki boyutlu (2D) jel elektroforez ve kütle spektrofotometri çalışmaları ile gerçekleştirilerek bakterilerin direnç mekanizmalarıyla ilgili proteinlerinin karakterleri belirlenmiş ve farklı mikroorganizmalarda mikrobiyel ağır metal direnç sistemleri aydınlatılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Endüstriyel Atıksular ve Özellikleri

Sayısız alanda çalışma kolları bulunan endüstri ülkemizde hızla gelişmekte olan bir sektördür. Bu sektördeki sanayi kolları, yünlü ve pamuklu dokuma sanayii, hazır giyim sanayii, deri sanayii, makine sanayii, kağıt mamulleri sanayii, çelik yapı ve baskı işleri sanayii, boya-reçine sanayii, çeşitli kimya sanayii, Cu(II) ve Cu(II) alaşımları sanayii, sabun, temizleyici maddeler ve kozmetik sanayii ile cam ve cam eşya sanayii vb. gibi daha birçok alanı kapsamaktadır. Endüstri bu şekilde bir yandan yararlı ürünler yaparken bir yandan da fazla miktarda atıksu üretmektedir. Böylesine çeşitli endüstri kolunun ürettiği atıksular da aynı çeşitlilikte kimyasal maddeyi içermektedir. Atıksuyu üreten endüstri koluna göre bu kimyasal maddelerin miktarı ve çeşitliliği de değişmektedir. Tekstil endüstrisi atıksularından deri sanayine dahil olanlar ise deri işlenmesi sırasında kullanılan farklı uygulamalar nedeniyle birçok kimyasal maddeyi barındırmaktadır. Deri sanayi suyun en fazla kullanıldığı sanayi kollarından biridir. Bir deri işleme tesisinde ısılatma-yumuşatma, kıl giderme-kireçlik, kireç alma-sama, pikle işleme, tabaklama işleme, nötralizasyon, yağlama, boyama ve dolgu işlemleri uygulanmaktadır. Bir ton ham deriyi işlemek için yaklaşık olarak 20-80 m³ suya ihtiyaç vardır. Türkiye'deki deri sanayinde ham deriyi işlemek için gerekli su miktarı 50-65 tondur. Ülkemizde deri sanayinde günde ortalama 600 ton deri işlenmektedir. Bu endüstride 1 kg ham derinin işlenmesi sonucu 30-50 litre atıksu oluşmaktadır. Derilerin mekanik darbelere dayanıklı, iyi kimyasal yapı ve kabul edilir termal harekete sahip olması istenmektedir. Bu nedenle deriler tabaklanır ve bu işlem krom tuzu ile yapılmaktadır. Krom(VI) derideki proteinlerin karboksil grubları ile kimyasal reaksiyona girmekte ve sabitlenmiş Cr(VI), deriyi kararlı yaparak kuvvetlendirmektedir. Bir ton ham deri için tabaklama işleminde ortalama 50 kg krom tuzu kullanılmaktadır. Ham deri ağırlığının yaklaşık olarak %5-8 oranında ortama krom bileşiği ilave edilir. Tabaklama ünitesinden çıkan atık suyun pH değeri yaklaşık olarak 3-4.5 ve toplam krom konsantrasyonu 3000-6000 ppm arasında değişmektedir. Tabaklama aşamasından sonra nötralizasyon, yağlama, boyama, dolgu işlemleri yapılmakta ve çıkan atıksu pH'ı alkali veya asidik özellik taşıyabilmektedir (http://www.cevreorman.gov.tr/belgeler1/deri_krom.doc, 2007).

Görüldüğü gibi deri sanayi atıksuları yüksek miktarda krom içermektedir. Bu atıksulardan mutlaka Cr(VI) iyonunun uzaklaştırılması gerekmektedir. Krom(VI) gibi bir ağır metali içeren atıksuyun herhangi bir ortama boşaltılması çevre kirlenmesinde çok büyük bir tehdit unsuru oluşturmaktadır.

2.2 Ağır Metaller ve Özellikleri

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleridir. Bu d orbitalleri ağır metal katyonlarına redox tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır (Nies 1999). Örneğin Ca(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Fe(II), K(I), Mg(II), Mn(II), Na(I), Ni(II) ve Zn(II) gibi metaller esansiyeldir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobelerin olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat Ag(I), Al(I), Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi yoktur ve bu metaller esansiyel değildirler. Aynı zamanda besinsel değerleri de yoktur. Mikroorganizmalara oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu açıkça görülmektedir (Nies 1999, Bruins *et al.* 2000).

2.2.1 Krom özellikleri

Krom 1797'de Fransız kimyacı Louis Vauquelin tarafından keşfedilmiştir. Krom ismini bileşiklerinde birçok farklı rengi barındırması nedeniyle Yunanca'da renk anlamına gelen "chroma"dan almıştır (Ogawa *et al.* 1989).

Krom, dünyada en çok bulunan elementler arasında (yaklaşık 122 ppm) yirmibirinci sırada, en fazla bulunan geçiş metalleri arasında da altıncı sırada yer almaktadır. Krom, iki, üç ve altı değerlikli olarak bulunabilmekte, fakat Cr(II) kararsız yapıya sahip olduğundan, Cr(III) ve Cr(VI) doğada daha fazla miktarda bulunmaktadır. Krom(VI) bileşikleri suda kolay çözünebilmesi ve taşınabilir yapıya sahip olması ile Cr(III) bileşiklerinden (örneğin, Cr₂O₃) daha toksiktir. Krom(III) bileşikleri ise, çözünmeyen yapısı nedeni ile taşınmaz özelliktedir. Bu özelliği ile de altı değerlikli kromdan daha az zararlı olmaktadır. Toprakta bulunan kromat (CrO₄²⁻) ve dikromat (Cr₂O₇²⁻) en fazla çözünen ve dolayısı ile en fazla taşınabilen oldukça toksik formlardır. Krom(VI), bu özellikleri ile biyolojik zarlardan kolaylıkla geçebilmektedir. Hücre içinde protein bileşikleri ve nükleik asitlerle de reaksiyona girebilmektedir. Potasyum dikromat ile yapılan çalışmalarda hücre bölünme süresinin uzaması ve hücre bölünmesinde azalma kaydedildiği görülmüştür. Ayrıca bu değerlikteki krom, DNA polimerazla etkileşime girerek DNA sentezini de fazlasıyla etkilemektedir. Krom(VI) çift sarmal DNA ile direkt olarak etkileşime girmemektedir. Bunun yanında, Cr(III) çift sarmal DNA'daki negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanarak DNA'nın kararlı yapısını sağlayan hidrojen bağlarının kopmasına neden olmaktadır (Ogawa *et al.* 1989, Mohan and Pittman Jr. 2006).

2.3 Krom(VI) İçeren Atıksuların Arıtımı

Krom(VI) içeren deri sanayi atıksularının arıtılmasında kimyasal veya biyolojik yöntemler uygulanmaktadır.

2.3.1 Kimyasal yöntemlerle arıtım

Kimyasal yollarla ağır metallerin arıtımı, kimyasal indirgeme-çöktürme, elektrokimyasal arıtma, ters ozmoz, iyon değiş-tokuş ve adsorbsiyon olmak üzere başlıca beş farklı yöntemle yapılabilmektedir (Zouboulis *et al.* 2004). Krom(VI) içeren atıksulardan da bu tip yöntemlerle ağır metal giderimi yapıldığı bilinmektedir.

Kimyasal indirgeme-çöktürme yönteminde Cr(VI)'nın tamamıyla Cr(III)'e çevrilebilmesi için çok yüksek miktarda indirgeyici ajan kullanmak gerekmektedir.

İndirgenme tamamlandıktan sonra ise ortama kuvvetli bir baz olan sodyum hidroksit eklenmesi ile Cr(III)'ün çöktürülmesi sağlanmaktadır (Yang and Chen 2008).

1993 yılından bu yana ise elektrokimyasal çöktürme yöntemi ile iletken polimerler kullanılarak Cr(VI) içeren atıksuların arıtımına çalışılmaktadır. Bu amaçla denenmiş ve en etkili polimer ise polianilin olarak belirlenmiştir. Çeşitli araştırmacılara göre, bu polimerin kapalı devre koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonda kararlı halde kalabildiği ve en hızlı şekilde reaksiyonu sağladığı belirlenmiştir (Ruotolo *et al.* 2006).

Ters ozmoz yöntemi ise diğer tekniklere göre daha pahalı olup yüksek basınç uygulaması ile özel zar yapılara ihtiyaç duymaktadır.

İyon değiş-tokuş yönteminde ağır metali iyonlarının elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzey üzerinde tutularak ortamdaki farklı ağır metal iyonları ile yer değiştirmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntem etkili olmasına rağmen diğer arıtım tekniklerine göre oldukça fazla maliyete sahiptir.

Adsorpsiyon metal gideriminde oldukça fazla yer bulmaktadır. Bu yöntemde de belli adsorban kimyasallarla metallerin tutuklanması sağlanmaktadır. Ağır metali ortamdan uzaklaştırmak için metal tutucu olarak özellikle aktif karbon kullanılmaktadır. Fakat bu teknik bazı metallerin ortamdan uzaklaştırılması için uygun olmayabilmektedir. Bu nedenle çok da etkili bir metot olarak kabul edilmeyebilmektedir (Dubey and Gbal 2007).

Bu şekilde uygulanan kimyasal arıtım yöntemlerinin dezavantajları da oldukça fazladır. Bu tekniklerle yapılmaya çalışılan metal indirgenmesi tam olarak başırlamayabilmektedir. Bu yöntemler oldukça fazla enerjiye ve farklı birçok kimyasal maddeye ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda, bu tip arıtımda, ağır metali uzaklaştırmak için çeşitli kimyasal maddeler atık suya uygulanmaktadır. Bu durum çevre de ikinci bir kirlilik yaratmaktadır. Çünkü endüstriyel atık sular zaten fazla miktarda kimyasal maddeyi barındırmaktadır. Kimyasal arıtımda arıtılacak suyun pH'sı kullanılan yöntemle göre farklı değerlere ayarlanmak zorundadır.

2.3.2 Biyolojik yöntemle arıtım

Biyolojik arıtımda canlı veya ölü mikroorganizmaların ağır metali biriktirebilme, tutabilme veya daha az toksik formlarına indirgeyebilme yeteneklerinden yararlanılarak istenmeyen kirletici ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Biyolojik arıttımdan sonra geriye kalan çamur yığını, kimyasal arıtıma göre oldukça az ve daha zararsızdır. Ayrıca biyokütle tarafından tutulan ağır metal, desorpsiyon yolu ile tekrar, yoğun olarak elde edilebilmektedir. Biosorpsiyon olarak tanımlanmış biyolojik metal giderimi, mikrobiyel biyokütlenin yüzeyine metal iyonlarının difüzyonu ile başlayan aktif ve pasif taşıma mekanizmalarını içeren bir birleşimdir. Biyolojik olarak metal biriktirilmesi genel olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Zouboulis *et al.* 2004):

- a) Ölü biyokütle ile pasif olarak yapılan ağır metal biriktirilmesi: biosorpsiyon
- b) Canlı biyokütle ile aktif olarak yapılan ağır metal biriktirilmesi: biyobirikim

2.3.3 Krom(VI) gideriminde mikroorganizmalarla yapılan biosorpsiyon ve biyobirikim çalışmaları

Saxena *et al.* (2000) tarafından yapılan biyobirikim çalışmasında deri sanayii atık sularından alınan örneklerden 100 ppm Cr(VI) içeren Luria Broth(LB) besiyerinde gelişebilen ve *Staphylococcus cohnii* olarak adlandırılan bir bakteri izole edilmiştir. Bakterinin maksimum biyobiriktirebildiği Cr(VI) konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, Cr(VI) konsantrasyonu 0-1000 ppm aralığında değişen LB besiyeri kullanılmıştır. *S. cohnii*'nin başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu 1000 ppm olan LB besiyerindeki Cr(VI) biyobirikimi 96 saat inkübasyon süresi sonunda %75 olarak tespit edilmiş ve aynı inkübasyon süresinde bakterinin gelişimi de en yüksek değere ulaşmıştır.

Nepple *et al.* (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Rhodobacter sphaeroides*'in aerobik ve anaerobik koşullar altında Cr(VI) ağır metalini indirgeyebildiği saptanmıştır. İndirgenme reaksiyonunun *R. sphaeroides*'te bulunan kromat redüktaz ile gerçekleştiği bulunmuştur.

R. sphaeroides, 30 °C’de, ışık varlığında, sükkinik asidin karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve kazein hidrolizat içeren sistrom besiyerinde anaerobik olarak geliştirilmiştir. Aerobik kültürler için ise 250 ml’lik erlenlerde 100 ml besiyeri konmuş, karanlıkta 30 °C’de 200 rpm çalkalama hızında çalkalanmıştır. Krom(VI) indirgenmesi hem anerobik hem de aerobik olarak gerçekleşmesine rağmen anerobik koşullarda indirgenme biraz daha iyidir. Kromatın 20 µM olduğu koşullarda 6 saat boyunca yapılan inkübasyon sonrasında, anaerobikler için indirgenme oranları gram hücre başına 1.6 µmol ile aerobikler için ise 0.146 µmol olarak bulunmuştur. Kromat 20 µM’dan 43 µM’a arttırıldığında da indirgenme gözlenmiştir. Çalışmada, kromat indirgenme aktivitesinin gelişme sırasında Cr(VI)’nın fazlaca artırılmasından bağımsız olduğu ve arka arkaya kromat eklenmesinden etkilenmediği görülmüştür (Neppele *et al.* 2000).

Dönmez and Aksu (2002) yaptıkları biyosorpsiyon çalışmasında, fotosentetik ve ökaryotik organizmalar arasında yer alan ve çok geniş bir tuz konsantrasyon aralığında (%0.2-%35 w/v) gelişebilen *Dunaliella* türlerini Tuz Gölü’nden izole etmişlerdir. Kültürler %15 (w/v) NaCl ve %1 (w/v) Bacto Agar içeren katı Johnson’s besiyerine ekilerek geliştirilmiş ve daha sonra biyosorpsiyon çalışmaları için kurutulmuştur. Elde edilen biyokütle ile yapılan biyosorpsiyon çalışmalarında en yüksek Cr(VI) gideriminin pH 2’de yapıldığı tespit edilmiştir. Tüm tuz konsantrasyonlarında pH arttıkça Cr(VI) giderimi azalmıştır. Ortam NaCl konsantrasyonu %20 (w/v) olduğunda *Dunaliella 1* için gram hücre başına Cr(VI) alımı 37.7 mg’dan 13.4 mg’a ve *Dunaliella 2* için 27.7 mg’dan 8.6 mg’a düşmüştür. Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının biyosorpsiyona etkisini belirlemek için yapılan denemelerde tuz içeren ve içermeyen ortamda başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu arttıkça Cr(VI) alımının da arttığı görülmüştür. Tuz içermeyen ortamda başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu 50 ppm’den 250 ppm’e arttırıldığında *Dunaliella 1* türünde gram hücre başına Cr(VI) alımı 37.7 mg’dan 102.5 mg’a; *Dunaliella 2* türünde ise 27.7 mg’dan 85.5 mg’a yükselmiştir. Denemelerin sonuçlarından *Dunaliella 1* türünün *Dunaliella 2* türüne göre daha fazla Cr(VI) alımı yaptığı tespit edilmiştir. Başlangıç Cr(VI) konsantrasyonu 100 mg/g olduğunda *Dunaliella 1*, %53.6; *Dunaliella 2*, %45 oranında Cr(VI) alımı yapmıştır.

Dunaliella hücrelerinin zarlarında Cr(VI) iyonlarının bağlanabileceği iyon değiştirebilen lipidler, proteinler ve polisakkaritler gibi fonksiyonel gruplara sahip yapıtaşları bulunmaktadır. Amino, karboksil, sülfidril, fosfat ve tilol gibi fonksiyonel grupların Cr(VI)'ya afiniteleri ve spesifikliğin farklı olması algin de Cr(VI) almasını etkilemektedir. Farklı Cr(VI) ve tuz konsantrasyonlarının *Dunaliella* 1 ve *Dunaliella* 2 türlerinin Cr(VI) biyosorbsiyonuna etkisi araştırıldığında tuz konsantrasyonu %20 (w/v) olduğunda algin aldığı Cr(VI) miktarının da belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Başlangıç Cr(VI) miktarı 50 ppm olduğunda, tuz konsantrasyonu da 0'dan %20 (w/v) arttırıldığında *Dunaliella* 1 için gram hücre başına Cr(VI) alımı 37.7 mg'dan 13.4 mg'a; *Dunaliella* 2 için 27.7 mg'dan 8.6 mg'a düşmüştür. *Dunaliella* türlerinde sert polisakkarit yapıda hücre duvarı ve hücreyi çevreleyen elastik bir plazma zarı bulunmaktadır. Bu durum, hücre şeklinde ani değişikliklere ve osmotik basıncın değişmesinde hacim artış azalışlarına olanak sağlamaktadır. Birçok çalışma *Dunaliella* türleri için osmotik dengenin yüksek tuz konsantrasyonlarında sağlandığını göstermiştir. Alg hücreleri ancak tuzlu ortamlarda canlı kalabilmekte, tuzsuz ortamlarda ise hücre hasarına uğramaktadırlar. Tuzun olmadığı ortamda alg hücreleri şekillerini kaybederek kırılmakta ve Cr(VI)'nın bağlanabileceği bölgeler artmaktadır. Fakat tuz konsantrasyonu arttıkça Cr(VI) biyosorbsiyonu azalmaktadır. Bu durum ise biyosorbsiyon mekanizması ile ilgilidir. Alg hücrelerinin aktif merkezinde klorid ve Cr(VI) iyonlarının yarışmalı olarak inhibisyonu olmaktadır. Tuz, hücre zarı geçirgenliğini azaltarak Cr(VI)'nın aktif taşınmasını engellemektedir (Dönmez and Aksu 2002).

Srinath *et al.* (2002) çalışmalarında hem biyobirikim hem de biyosorpsiyon denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Deri sanayi atıksularından örnekler alarak 50 ppm Cr(VI) içeren nutrient agara ekimler yapmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda morfolojik olarak birbirinden farklı 71 adet saf kültür izole edilmiştir. Bu izolatlara MIC (minimal inhibisyon konsantrasyonu) testi uygulanarak, besiyerinde hiçbir koloninin gelişmediği Cr(VI) konsantrasyonu bulunmuştur. Bu konsantrasyonu bulabilmek için saf kültürler %1 (w/v) pepton, %5 (w/v) NaCl içeren besiyerinde geliştirilmiştir. Daha sonra Cr(VI) konsantrasyonları 50-200 ppm aralığında değişen nutrient agara ekilmiştir. Buna göre birçok izolat 100 ppm'den daha az Cr(VI) konsantrasyonunda gelişebilmiştir.

Yalnızca 11 izolat yüksek Cr(VI) konsantrasyonuna direnç gösterebilmiştir. Krom(VI) gideriminin canlı ve ölü hücrelerle yapıldığı çalışmada, canlı hücrelerin Cr(VI) alımını belirlemek amacıyla pepton içeren besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri pH'ı 4 ve Cr(VI) konsantrasyonları 0, 25, 50, 100 ve 150 ppm olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar bakteri ekildikten sonra 150 rpm de, 28 °C'de, 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Uzaklaştırılan Cr(VI) miktarı, bakteri biyokütlesinin 1 gramının alabildiği Cr(VI) miktarı (mg) olarak hesaplanmıştır. Buna göre, Cr(VI)'ya dirençli bakterilerin birçoğunun 10 mg/g'dan daha az Cr(VI) aldığı görülmektedir. Saf kültürlerden 181 ve A'nın canlı ve ölü hücreleri ile yaptıkları Cr(VI) giderimi karşılaştırıldığında, ölü hücrelerle daha fazla Cr(VI) giderimi gerçekleşmiştir. Yetmişbir izolatın dışında H ve A olarak adlandırılan ve MIC testinde 130 ppm ve 170 ppm Cr(VI) konsantrasyona dirençli olan 2 suş daha izole edilmiştir. Bu suşların farklı başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunda 24 saatte biriktirebildikleri Cr(VI) miktarları gösterilmiştir. Buna göre 25 ve 50 ppm Cr(VI) varlığında H suşu 33.1 ve 34.5 mg/g, A suşu ise 30.6 ve 32 mg/g şeklinde Cr(VI) giderimi yapmıştır. Fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda A, H ve 181 suşlarının sırasıyla *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* ve *Bacillus coagulans* olduğu gösterilmiştir (Srinath *et al.* 2002).

Kazscyki *et al.* (2004) dokuz farklı maya türü ile Cr(VI) ve Cr(III) giderim denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar biyokütle oranını 0.03 mg/ml ile 1 mg/ml arasında değiştirerek ağır metali bu biyokütle ile uzaklaştırmayı denemişlerdir. Hücreler önce iki dakika, daha sonra da 3 saat boyunca 4mM Cr(III) ile ve 0.8 mM Cr(VI) ile muamele edilmiştir. Buna göre Cr(III) uzaklaştırılması iki dakika içinde hızla gerçekleşmiş ve üç saat sonunda sabit kalmıştır. Krom(VI) giderimi ise Cr(III)'e göre daha yavaş gerçekleşerek ancak üç saatin sonunda yüksek bir değere ulaşmıştır.

Dönmez and Koçberber (2005a) deri sanayii atıksularından izole ettikleri karışık mikrobiyel kültürü Cr(VI) giderim çalışmalarında kullanmışlardır. Başlangıç pH derecelerinin, farklı NaCl konsantrasyonlarının ve artan Cr(VI) konsantrasyonlarının Cr(VI) giderimine etkisinin araştırıldığı çalışmada yaklaşık 25 ppm Cr(VI) içeren melaslı besiyerinde bütün denenen pH dereceleri ve tuz konsantrasyonlarında Cr(VI) gideriminin %95-99 olduğu görülmüştür.

Krom(VI) uzaklaştırılmasının yapıldığı optimum pH değeri %2 (w/v) ve %4 (w/v) NaCl içeren ortamda 7; %6 (w/v) NaCl olan ortamda 9 ve tuz içermeyen ortamda 8 olarak belirlenmiştir. Bütün denemeler sonunda pH 8'de, NaCl içermeyen melaslı ortamda, 164.4 ppm başlangıç Cr(VI) konsantrasyonunda, hücre başına biriktirilen metal miktarının 109.45 mg olduğu bulunmuştur. En yüksek tuz konsantrasyonunda, düşük Cr(VI) konsantrasyonunda bu değer 26.2 mg/g, yüksek Cr(VI) varlığında ise 87.5 mg/g olarak tespit edilmiştir (Dönmez and Koçberber 2005a)

Dönmez and Koçberber (2005b) endüstriyel atıksulardan elde ettikleri mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmada Cr(VI)'ya dirençli saf kültürler izole etmişleridir. Ortam pH derecesinin 8 olduğu, %4 NaCl (w/v) ve 50 ppm Cr(VI) içeren ortamda karışık kültür zenginleştirilmiş ve buradan onbir farklı saf kültür elde edilmiştir. Bu saf kültürler arasında sekizinci suş %4 (w/v) NaCl ve 100 ppm Cr(VI) içeren melaslı besiyerinde %99.3 oranında metal giderimi yaparken; onuncu suş aynı ortam koşullarında %99.1 oranında giderim yapmıştır. Sekizinci suşun yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarında, ağır metali ortamdan uzaklaştırması artan NaCl konsantrasyonlarında oldukça fazla etkilenmiştir. Bununla birlikte, artan NaCl konsantrasyonuna rağmen düşük Cr(VI) konsantrasyonlarında metalin giderim verimleri %2 (w/v) NaCl ve 110.0 ppm Cr(VI) içeren ortamda %98.8; 217.1 ppm Cr(VI) olan ortamda %98.6; 381.7 ppm Cr(VI) içeren besiyerinde %98.6 ve 547.6 ppm Cr(VI) varlığında %98.2 verimle gerçekleşmiştir.

Kseheminska *et al.* (2005) gerçekleştirdikleri çalışmada mayalarda Cr(III) ve Cr(VI) biyobirikimini incelemişlerdir. Çalışmada maya hücrelerinin Cr(III)'e göre (0.25-5 mM) Cr(VI)'ya (0.1-0.5 mM) karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür. Hücrelerin biriktirdiği Cr(III), 0.29 mg/g ile 11.10 mg/g arasında değişirken, Cr(VI) biriktirilmesi ise 0.21-3.3 mg/g arasında değişmektedir.

Thacker *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada kimyasal atıklarla kirletilmiş bölgelerden izole edilen Cr(VI) ağır metalini indirgeyen bir bakteri ile Cr(VI)'nın indirgenme oranlarını tespit etmişleridir. Mikroorganizma 16S rDNA analizlerinde *Providencia* sp. olarak tanımlanmıştır.

Denemelerde, bakterinin 100-300 ppm Cr(VI) konsantrasyon aralığında kromatı %100 indirgediği, 400 ppm konsantrasyonda ise %99.31 oranında indirgenme olduğu tespit edilmiştir (pH 7; 37 °C). Çalışma sonucunda, Cr(VI) indirgenme reaksiyonunun yalnızca hücrelerin çözümlü kısmı ile ilgili olduğu görülmüştür. (Thacker *et al.* 2006)

Aksu *et al.* (2007) beyaz-çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* ile boya ve Cr(VI) giderim çalışmaları yapmıştır. Çalışmada yalnızca glukoz ile glukoz ve peyniraltı suyu içeren ortamlar kullanılmıştır (pH 4). Maksimum Cr(VI) giderimi glukoz ve peynir altı suyu içeren ortamda belirlenmiştir. En yüksek Cr(VI) uzaklaştırılması 30 ppm Cr(VI) içeren ortamda %32.2 olarak belirlenmiştir.

Congeevaram *et al.* (2007) elektrolaklama tesislerinin atıksularından ağır metallere dirençli mikroorganizmalar izole etmişlerdir. Çalışmada, metal giderimi için optimum pH derecesi belirlenmiştir. Fungal izolatlar için optimum pH 5-5.2; bakteriler için ise 7 olarak bulunmuştur. Denemelerde durgun fazdaki hücrelerin Cr(VI) ağır metalinin uzaklaştırılmasında kullanılabileceği önerilmiştir. İzolatlardan fungal olanın ise 10.000 ppm Cr(VI) ile kontamine olmuş ortamı bile tolere edebildiği görülmüştür. Aynı zamanda bakteriyel izolatlardan *Micrococcus* sp. ve *Aspergillus* sp. gibi mikroorganizmaların hem Cr(VI) hem de Ni(II)'nin endüstriyel atıksulardan uzaklaştırılmasında kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Koçberber and Dönmez (2007) endüstriyel atıksulardan izole edilmiş karışık kültürün tuz içeren ortamlarda Cr(VI) biyobirikim kapasitelerini belirlemişlerdir. Karışık kültürün ağır metali ortamdaki uzaklaştırması 25-300 ppm Cr(VI) ile %2-6 (w/v) NaCl içeren Nutrient Broth besiyerlerinde (pH 7, 8 ve 9) incelenmiştir. Artan NaCl ve Cr(VI) konsantrasyonları ağır metalin biyobirikim kapasitesinde belirgin bir azalmaya neden olurken, hücre başına biriktirilen ağır metal miktarı artmıştır. Hücre başına maksimum biriktirilen ağır metal miktarı tuz içermeyen ortamda, pH 8'de, 316.1 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda 58.9 mg/g olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, %2 (w/v) NaCl içeren besiyerinde bu değer, pH 9'da 194.5 ppm Cr(VI) içeren ortamda 130.1 mg/g olarak tespit edilmiştir.

Tuz konsantrasyonu %4 (w/v) olduğunda hücre başına biriktirilen maksimum metal oranı 221.1 ppm konsantrasyonda pH 9'da 127.0 mg/g; %6 (w/v) olduğunda ise pH 7'de 278.1 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda 114.9 mg/g olarak ölçülmüştür. (Koçberber and Dönmez 2007)

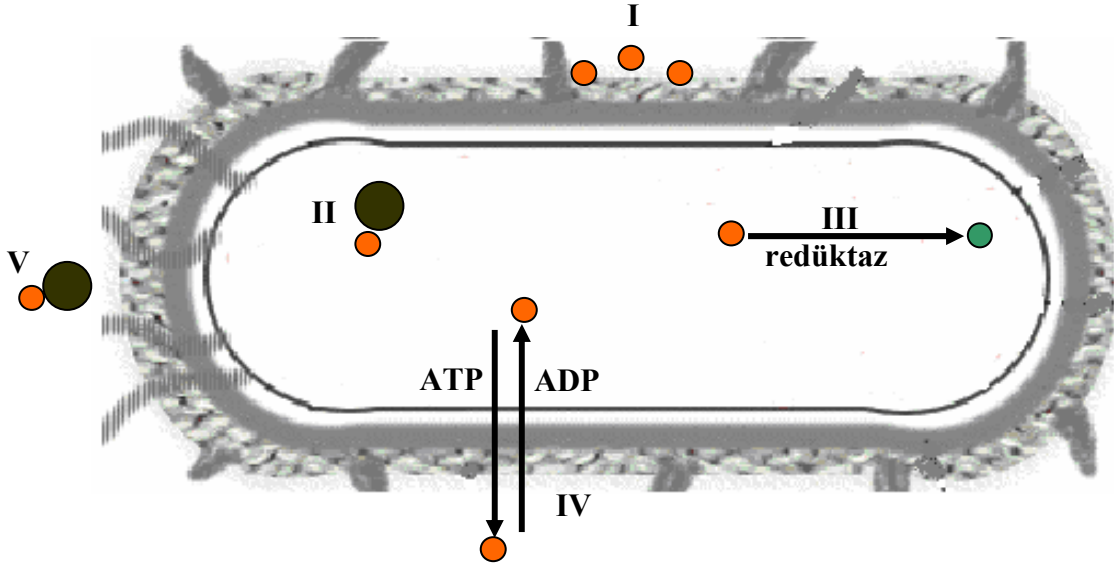
Kılıç and Dönmez (2007) Cr(VI) içeren endüstriyel atıksulardan izole ettikleri *Micrococcus* sp. ile Cr(VI) giderim çalışmalarını yüksek konsantrasyonda NaCl içeren melaslı besiyerlerinde belirlemişlerdir. Bakterinin Cr(VI) biyobirikim kapasitesi üç farklı pH derecesinde (7, 8 ve 9), artan NaCl (0, 2, 4, 6 ve 8 (w/v)) ve Cr(VI) konsantrasyonlarında (72.0-185.5 ppm) belirlenmiştir. Denemeler sonucunda, yüksek miktarda Cr(VI) içeren ortamlarda mikroorganizmanın ağır metali uzaklaştırmasının artan tuz konsantrasyonlarından olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Tuz konsantrasyonunun %8 (w/v) olduğu ortamda en yüksek biyobirikim, 163.6 ppm Cr(VI) içeren besiyerinde %71.2, 180.2 ppm Cr(VI) olan ortamda %47.3 olarak belirlenmiştir. Tuz konsantrasyonunun %6 (w/v) olduğu ortamda, 78.1-109.3 ppm Cr(VI) içeren ortamlarda mikroorganizmanın %93'den daha fazla verimle ağır metali ortamdan uzaklaştırdığı görülmüştür. Bu ortamda hücre başına biriktirilen maksimum Cr(VI) miktarı 150.2 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda 116.34 mg/g olarak belirlenmiştir.

Sadettin and Dönmez (2007) atıksulardan ağır metallerin gideriminde termofil *Phormidium* sp. ile çalışmışlardır. Denemelerde hem Cr(VI) giderimi hem de çeşitli boyar maddelerin ortamdan uzaklaştırılması ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucu, mikroalgin 5.8-19.9 ppm Cr(VI)'yı pH 8.5'da 45 °C'de tolere edebildiği görülmüştür. Denenen tüm boya konsantrasyonlarında ağır metal içeren ortamda Cr(VI) gideriminin %10.4-69.9 verimle gerçekleşmiştir. En yüksek Cr(VI) uzaklaştırılmasının en düşük Cr(VI) konsantrasyonunda 40 °C'de farklı boyaları içeren ortamlarda %19.4 ve %28.5 oranlarında yapıldığı belirlenmiştir.

2.4 Mikroorganizmalarda Ağır Metallere Direnç

Farklı türdeki bazı mikroorganizmalar ağır metallere karşı direnç mekanizmaları geliştirebildikleri için toksik kirleticileri içeren atıksuların arıtımında kullanılabilirler. Bugüne kadar açıklanmış mikrobiyel ağır metal direnç mekanizmaları beş farklı sistemi işaret etmektedir (Bruins *et al.* 2000).

- I. Hücre içine alınmama
- II. Metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması
- III. Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi
- IV. Metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması
- V. Metalin hücre dışında tutulması



Şekil 2.1 Mikroorganizmalarda bulunan metal direnç sistemlerinin şematik gösterimi

2.4.1 Metalin hücre içine alınmaması

Mikroorganizmaların hücre duvarında, hücre zarında veya dış zar proteinlerindeki değişiklikler metalin zardan içeri alınmamasına neden olmaktadır. Bu mekanizma, esansiyel hücre bileşenlerini korumak için mikroorganizma tarafından geliştirilmektedir. *E. coli*'deki zar kanal proteini porinin değişmesi ile Cu(II)'nin içeri alınmaması bu tip mekanizmaya örnek oluşturmaktadır. Bu sıklıkla tek gen mutasyonu ile açıklanmaktadır. Bu mutasyon sayesinde metal iyonlarına karşı zarın geçirgenliği azalmaktadır (Bruins *et al.* 2000, Rensing and Grass 2003).

2.4.2 Metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması

Ağır metallerin hücre içinde tutulmaları, metallerin sitoplazmada birikmesini sağlayarak temel hücre bileşenleri ile etkileşimini engellemektedir. Kadmiyum(II), Cu(II) ve Zn(II) bu yolla biriktirilebilmektedir. *Synehococcus* sp.'deki metallothionein ve *Pseudomonas* sp.'nin sistein zengin proteinleri de bu tip birikime örnek oluşturmaktadır. *Synehococcus* sp. direnç sistemi *smt A* ve *smt B* olmak üzere iki gen içermektedir. *Smt A* proteini, Zn(II) ve Cd(II) gibi metalleri bağlayabilen metallothioneini kodlamaktadır. *Smt A*, yüksek konsantrasyondaki Cd(II), Zn(II) ve Cu(II) ile indüklenmektedir ve *smt B* gen ürününden repress edilmektedir (Bruins *et al.* 2000). *Smt B* proteini, *smt A* ekspresyonunu ve metallothionein üretimini önleyen transkripsiyonel represör olarak görev yapmaktadır. Sistemdeki metallothionein hayvan metallothioneininden daha fazla sistein içermektedir. *Smt A* metallothioneindeki sistein amino asitleri toksik katyonları tutan bir bariyer gibi görev yapmaktadır. *Smt B* proteini, DNA bağlanma proteinlerine benzer bir motif içermektedir. Proteinin yapısal analizleri, dört tane Zn(II) bağlanma bölgesinin olduğunu göstermektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*, siyah bakır sülfat çökmesi ile Cu(II)'nin hücre içinde tutulmasını gerçekleştirilmektedir (Bruins *et al.* 2000). Domates patojeni *Pseudomonas syringae* bakterisinde Cu(II) direncini kodladığı bulunan pPT23 isiminde bir plazmid bulunmaktadır. Klonlanan ve sekans analizi yapılan plazmide göre direnç *cop* operonundan kodlanmaktadır. Operonu saran dört yapısal gen bulunmaktadır. *copA* ve *copB* isimindeki yapısal genler tam verimli Cu(II) direnci ekspresyonu için gerekmektedir. *copC* ve *copD* genlerinde oluşan herhangi bir delesyonda ağır metale dirençte az miktarda azalma gözlenmiştir.

Sekans analizlerinden CopA ve CopB'nin aspartik asit, metiyonin ve histidin bir çok kez tekrar ettiği sekiz amino asitlik bir peptid olduğu ve bunun Cu(II) bağlayan kısım olarak fonksiyon yaptığı öne sürülmektedir. *cop* operonunun ekspresyonu sonucunda CopA ve CopC'nin polipeptid başına sırasıyla onbir ve bir Cu(II) bağlayan periplazmik proteinler olduğunu göstermişlerdir. CopB, dış zar proteindir ve dışarıdan gelen Cu(II) metalini bağlamaktadır. Aynı zamanda zarı boydan boya geçen Cu(II) taşınmasında da görevli olduğu düşünülmektedir. pPT23 plazmidindeki *copB* geni, Cu(II) dirençli patojen ve saprofitik bakteri plazmidleri veya kromozomal DNA'ları ile homoloji göstermektedir. Bakır(II) taşınmasını sağlayan dördüncü gen ürünü CopD, iç zarda bulunmaktadır. *P. syringae*'de *copA* ve *copB*'nin kaybı Cu(II)'ye karşı aşırı derecede duyarlılığa neden olmaktadır. *copR* operonunun düzenlenmesi *copR* geni ile olmaktadır. Gen distal şekilde *copD*'de yerleşmiştir. Bu gen bazı patojenik *Pseudomonas*'larda kodlanmaktadır. Atıklardan izole edilen *P. putida*'da ise Cd(II)'un hücre içinde biriktirebildiği gösterilmiştir. Bu mikroorganizma, metalotiyoneinlerle benzer olan üç tane düşük molekül ağırlıklı sisteince zengin protein üretmektedir. (Cervantes and Gutierrez-Corona 1994).

2.4.3 Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi

Metallerin daha az toksik forma dönüştürülmesi genellikle hücre içinde ve enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu tip direnç mekanizmasına Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde rastlanmaktadır. Aşağıda bugüne kadar indirgenme mekanizmaları belirlenmiş (AsO_4^{3-} , Hg(II) ve Cu(II) gibi metallerin mikroorganizmalarca daha az toksik forma dönüştürülmeleri açıklanmıştır.

E. coli ve *S. aureus*'taki arsenat direnci dirençli hücreler tarafından arsenatın indirgenerek içeri alınmasıyla ilgilidir. Arsenat yapısı bakımından fosfatla ($(\text{PO}_4)^{3-}$) oldukça yakından ilgilidir. Metalin toksikliği bir biyoelement olan fosfor metabolizması ile karışmasının sonucudur (Nies 1999). Arsenik iyonlarına bakteriyel direnç ağır metallere direnç gösteren *Staphylococcus aureus*'taki β -laktamaz plazmidlerinde keşfedilmiştir. Arsenik direnç plazmidleri arsenit, arsenat ve antomoni(III)'ye direnç göstermektedir. Arsenik direnci, en çok *Staphylococcal* ve *Rhodococcus* plasmidlerinde yaygındır. Ayrıca Gram-negatif bakterilerde de görülmüştür.

Örneğin, *E. coli*'deki R773 plazmidi *ars* operonuna sahiptir. Bu operon, *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* ve *arsC* olmak üzere beş tane gen içermektedir. Bunun tersine, *S. aureus* plazmidi pI258 ve *S. xylosum* plazmidi (pSx267) *arsR*, *arsB* ve *arsC* olmak yalnızca üç gen içermektedir. *arsC* *S. aureus*'da 131 amino asit, *E. coli*'de 141 amino asit içeren çözünebilir bir proteini kodlamaktadır. Bu protein arsenat redüktazdır ve hücre içine taşınan arsenatı arsenite indirgemektedir. İki arsenat redüktaz %20 oranında benzer aminoasitler içermektedir; aralarındaki en belirgin fark enerji gereksinimleridir. Saflaştırılan enzimlerin tek başına aktivite göstermediği görülmüştür. *S. aureus* aktivite için tiyoredoksine ihtiyaç duyarken; *E. coli*, aktivite için glutaredoksine ihtiyaç duymaktadır (Cervantes *et al.* 1994).

Başka bir toksik ağır metal olan civa ise bütün ağır metaller arasında en toksik olan olarak bilinmektedir. Civanın mikroorganizmalara yararlı bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Yüksek konsantrasyonda civa, biosidal etki gösterirken, düşük konsantrasyonda bulunması da mutajenik etki göstermektedir (Stafford *et al.* 1999, Nies 1999).

Civaya direnç gösteren bakterilerde mer operonu bulunmaktadır. Operon, hem Hg(II)'yi detoksifiye etmekte hem de taşımaktadır. Kendi kendini düzenleyebilen operon, Hg(II) yokluğunda transkripsiyonu azaltan düzenleyici bir protein kodlamaktadır. Aynı zamanda operondaki genler periplazmik bağlanma proteinleri ve membrana bağlı taşıma proteinlerini de kodlamaktadır. Periplazmik bağlanma proteinleri Hg(II)'yi biriktirirken taşıma proteinleri bunları detoksifikasyon için sitoplazmaya götürmektedir (Bruins *et al.* 2000).

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde civaya karşı bu yolla direnç gösterilmektedir. (*S. aureus*, *Bacillus sp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Thiobacillus ferrooxidans*). Bu tip direnç mekanizmasında bulunan proteinler Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde benzer genler tarafından kodlanmaktadır. *Bacillus cereus* RC607'deki direnç ile ilgili olan *merA* geninin *Clostridium butyricum*'daki *merA* genleri ile nükleotid sekansının benzerliği %76.8'den %100'e kadar değişmektedir. *merA* geni kromozom veya plazmid kaynaklı da olabilmektedir (Stapleton *et al.* 2004).

S. aureus'da *merA* geni pI258 plazmidinde bulunurken, *Streptomyces lividans*'da kromozom üzerinde bulunmaktadır. *Staphylococcus aureus* ve *Streptomyces lividans* *merA* genleri de %58.8 ve %35.2 oranında nükleotid sekans benzerliği göstermektedir (Stapleton *et al.* 2004).

P. aeruginosa'da civanın indirgenme mekanizmasında öncelikle civa(II) periplazmadan MerP ile MerT'ye aktarılmakta, böylece hücre içine giren metal MerA (civa redüktaz) ile indirgenmektedir. İndirgenmiş civa uçucu bir molekül olduğundan ortamdan kolayca uzaklaşmaktadır (Madigan *et al.* 2003).

Bakır(II) radikallerle özellikle moleküler oksijenle etkileşime girmektedir. Bu karakteriyle Cu(II) çok toksik bir ağır metaldir ve birçok organizma Cu(II)'ye duyarlıdır. Bakır(II) toksisitesi hidrojen peroksit radikalleri oluşumu ve bunların hücre zarıyla etkileşime girmesiyle olmaktadır (Nies 1999). Bakır(II) direnç operonları *E. coli*, *P. syringae* ve *Xanthomonas campestris*'te karakterize edilmiştir. Bu genler üç mikroorganizmada da büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda genlerin benzer fonksiyonları gerçekleştirdikleri de saptanmıştır. *E. coli*'den izole edilen plazmid pRJ1004 adını almaktadır. Bu suş, büyüme promotörü olarak Cu(II) sülfatın domuzların beslenmesinde kullanılan bir ortamda bu hayvanları bağırsak florasından izole edilmiştir. Bakterideki plazmidle karakterize edilen Cu(II) direnci *pco* gen bölgesini içermekte ve bu bölgede yedi adet gen bulundurmaktadır (*pco ABCDRSE*) *P. syringae*'deki Cu(II) direnci *cop* ile ifade edilmektedir. Burada altı gen bulunmaktadır (*copABCDRS*). Bu genler *copABCD* ve *copRS* isimli iki operonla düzenlenmektedir. Aynı düzenlenme *pco* sisteminde de bulunmaktadır, fakat burada diğer genlere ek olarak *pcoE* geni de bulunmaktadır. PcoA 605 amino asit içermektedir ve *pco* operonunun merkezi proteindir. PcoA içeren periplazmik özüt, Cu(II) ile indüklenen oksidaz aktivitesi gösterdiğinden *pco* ürünlerinin fonksiyonundaki işaret CueO'nun sonucu ile kazanılmaktadır. Buna ek olarak PcoA'nın *E. coli*'deki CueO'nun fonksiyonel vekili olduğu düşünülmektedir. PcoB 296 aminoasit içeren, dış zar proteini olarak tahmin edilmektedir. Bakır(II)'ye duyarlı *E. coli* suşunda PcoA ve PcoB birlikteyken, tek başına PcoA ile karşılaştırıldığında daha düşük Cu(II) direnci göstermektedir. Aynı tip bulgular *P. syringae*'de de gösterilmiştir.

P. syringae'deki çalışmalar, CopC ve CopD'nin Cu(II) alımında birlikte fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Maksimum direnç için ikisinin de ortamda olması gerekmektedir. PcoC ve PcoD homologları muhtemelen benzer fonksiyonları gerçekleştirmektedirler. PcoC 126 amino asit içeren, molekül başına bir Cu(II) atomu bağlayan ve muhtemelen bir dimer proteindir. PcoC Cu(II) alımını PcoD ile düzenlemektedir. PcoD 309 amino asit içeren bir integral zar proteindir. İlginç olarak *B. subtilis*'deki *pcoC* ve *pcoD* genleri ayrı genler olarak kodlanmıştır ve *ycnJ* olarak adlandırılmıştır. Bu protein 541 aminoasit içermekte ve PcoC'ye N-terminalinden homolog PcoD'ye de C-terminalinden homologdur. Bu bulgular *E. coli*'de PcoC ve PcoD'nin fonksiyonel bir ünite olarak etkileşime girebileceğini göstermektedir. PcoC'nin periplazmik Cu(II)'yi sitoplazmaya götürmesi için PcoD'ye taşıdığı bilinmektedir. Muhtemelen taşınan Cu(II) PcoA'da depolanmaktadır. Pco sistemi tam direnç için gerekli *pcoE* isimli başka bir gen daha içermektedir. *pcoE* geni *pcoABCD*'nin bir parçası değildir fakat pRJ1004 plazmidinin ileri yöndeki akışında yer almaktadır. *pcoE*'nin ekspresyonu Cu(II) ile düzenlenen promotörle kontrol edilmektedir ve iki bileşenli *cusRS*'nin kontrolü altındadır. *pcoE*'nin tek başına ekspresyonu periplazmada Cu(II) bağlanmasını indükleyip Cu(II) biriktirilmesine sebep olmaktadır (Rensing and Grass 2003).

2.4.4 Metalin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması

Metallerin mikroorganizmadan aktif olarak taşınması, metal direnç sistemlerinin en geniş kategorisini oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar metalleri sitoplazmalarından aktif taşıma yolu ile hücre dışına pompalayarak uzaklaştırmaktadırlar. Direnç sistemlerini kodlayan genlerin çoğu plazmid kökenli olmakla birlikte, direnci sağlayan bu genler, kromozom kökenli de olabilmektedir (Trevors *et al.* 1985, Silver 1996, Bruins *et al.* 2000). *Bacillus sp.*'de civa direnci ve arseniğin P tipi ATPazlarla dışarı pompalanması, *E.coli*'de arseniği dışarı pompalayan kromozom üzerinde bulunan genler bu direnç sistemlerine örnek oluşturmaktadır (Silver 1996, Rosen 2002).

Bu iki direnç mekanizması arasındaki fark şu şekilde açıklanabilir: Kromozom kökenli sistem daha karmaşıktır ve esansiyel metallerin direncinden sorumludur.

Plazmidler aracılığı ile olan sistem sıklıkla toksik iyonların dışarı pompalanması şeklinde olmaktadır. Bu plazmidler diğer organizmalara da kolaylıkla taşınabilmektedir. Esansiyel olmayan metaller normal olarak hücreden içeriye besin taşıma yolu ile girmekte ve hızlıca dışarı çıkmaktadırlar. Dışarı pompalama sistemleri, taşınan anyon ve katyona yüksek derecede spesifikklik göstermektedir Toksik metallerin dışarı pompalama sistemleri ATP'ye bağımlı veya bağımsız olabilmektedir. ATP'ye bağımlı sistemlerde P tipi ATPazlar kullanılmaktadır (Bruins *et al.* 2000). Bu ATPazlar çok eskisen beri bütün organizmalarda bulunmaktadır (Margeay *et al.* 2003). Bunlar ATP hidrolizi ile çalışan taşıma proteinleridir. Substratları, H⁺, Na⁺, K⁺, Mg⁺, Ca⁺, Cu⁺, Ag⁺, Zn⁺ ve Cd⁺ gibi inorganik katyonlardır. Bir P tipi ATPaz substratını dışarıdan içeriye veya periplazmadan sitoplazmaya alabilmektedir. Bunun tam tersi olarak katyonları sitoplazmadan hücre dışına veya periplazmaya taşıyabilmektedir. Ağır metal katyonlarını taşıyan P tipi ATPazların büyük bir kısmı korunmuş sekans bölgesi olarak prolin ve onu takip eden sistein motifi taşımaktadır. Bu motif fonksiyonun yerine getirilebilmesi için esansiyeldir (Nies 2003). Aynı zamanda bu proteinlerin alışlagelmiş yapılarında korunmuş olarak bir ATP bağlanma bölgesi, fosfoenzim oluşumunun gerçekleştiği bir aspartat kısım ve bir fosfataz domain bulunmaktadır. CopA'nın N-terminal bölgesinde iki sitoplazmik metal bağlanma bölgesine (MBD1 ve MBD2) ve sekiz transmembran parçaya sahip olduğu tahmin edilmektedir. Modelde bir fosfataz kısım, bir fosforilasyon kısım ve bir de korunmuş motif bulunmaktadır (Rosen 2002). Bu proteinler iki açıdan önem taşımaktadırlar. Birincisi, mikroorganizmalar için çok gerekli elementler (Örneğin Mg⁺²) içeri alınırken ağır metaller de içeri alınabilmektedir. Bu şekilde hücre içine giren ağır metal hücre içinde tutulup indirgenerek daha az toksik formuna dönüştürülebilir ve etkisiz hale getirilebilir. İkincisi ise bu ATPazların ağır metal katyonlarını dışarı pompalama sistemleri ile hücreden hızla dışarı atarak mikroorganizmayı ağır metalin toksik etkisinden koruyabilmeleridir (Nies 2003). Aktif taşıma ile dışarı pompalanan metal iyonlarından bazıları Cr(VI), Cu(II), Co(II), Zn(II) ve Cd(II) gibi metallerdir. ATPaz'larla dışarı pompalama yolu ile Cd(II), Zn(II) ve Co(II) da birlikte czc sistemi ile hücre dışına atılmaktadır. Bu tip bir model Gram-negatif bakteriler için önerilmektedir.

Bu kompleks, CzcA, CzcB ve CzcC isimindeki üç proteinden oluşmaktadır. CzcC, dış membran proteini olarak görev yapmaktadır. CzcB ise dış ve iç zar arasında köprü vazifesi gören bağlayıcı bir protein gibi görünmektedir. CzcA, CzcB ve CzcC'nin birlikteliğinde, ağır metallerin dışarı pompalanmasına izin vermektedir. CzcA proteini katyon/protein antiport sistemini yapabilen transmembran bir protein gibi görünmektedir. pMOL30 plazmidinde *czc* gen kümesi Cd^{+2} , Co^{+2} ve Zn^{+2} gibi metallere dirençten sorumludur. Gen kümesi, *czcCBAD* operonunu içermektedir. Genin devamında düzenleme bölgesi mevcuttur. Yüksek derecede hidrofobik CzcCBAD'nin yukarısında 400 baz çifti içeren mRNA'yı kodlayan düzenleyici bir lokus bulunmaktadır. Genin sonu 1mM Zn^{+2} varlığında indüklenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, *P. pickettii*'de bulunan ve kadmiyuma karşı düşük derecede direnç gösteren PMBCR isimli yeni bir plazmid bulunmuştur. Buna göre, plazmid bilinen kadmiyum direnç mekanizmalarını içermemektedir (Bruins *et al.* 2003).

Mikroorganizmalarda Cu(II) iyonlarına karşı da dışarı pompalama sistemi ile direnç gösterilebilmektedir. Örneğin *E. coli*'de kromozom kökenli Cut A ve Cut B olmak üzere iki çeşit Cu(II) direnç sistemi bulunmaktadır. CutA, hem çinko alımında hem de Cu(II) taşınmasında görevlidir. Sitoplazmada bulunan Cu(II), hidroksil radikalleri yapıp hücrede oksidatif hasara yol açmaktadır, fakat glutatyonla Cu(I)'e indirgenmektedir. Cut E ve Cut F isimli Cu(II) depolayan ve taşıyan proteinler hücreyi Cu(I) toksisitesinden koruyabilmektedir. *cutC* ve *cutD* genlerinin yapısı Cu(II) ağır metalini dışarı pompalama sisteminde rolleri olduğunu göstermektedir. Cut C ve Cut D proteinleri muhtemelen Cu(II) ağır metalini dışarı pompalama sistemindeki ATPazlardır. *cutE* geni sekans analizi yapıldığında 512 aminoasit içeren muhtemelen Cu(II) bağlayıcı bölgesi olan bir proteini sentezlediği görülmüştür. *P. syringae*'deki Cut E'nin Cu(II) bağlayıcı bölgesi *cop* plazmidi gen ürünüyle ilgilidir. Bazı araştırmacılara göre sistemde *copA* ve *copB* olmak üzere iki tip ATPaz bulunmaktadır. Bunların Cu(II)'yi dışarı pompalama sistemindeki ATPaz'ları kodladığı öne sürülmüştür. Bunlara ek olarak Cut R, *cut* operonunun düzenlenmesinden sorumludur. Cut sisteminin iki bileşenli Cut R/Cut S sistemi ile gerçekleştiği öne sürülmektedir (Rensing and Grass 2003).

Bu sistem, plazmid kodlu sisteme oldukça benzemektedir. *cut* operonunun gen ürünleri Cu(II) dengesini düzenlemek için plazmid kodlu Cu(II) sistemi ile etkileşime girmektedir (Rensing and Grass 2003).

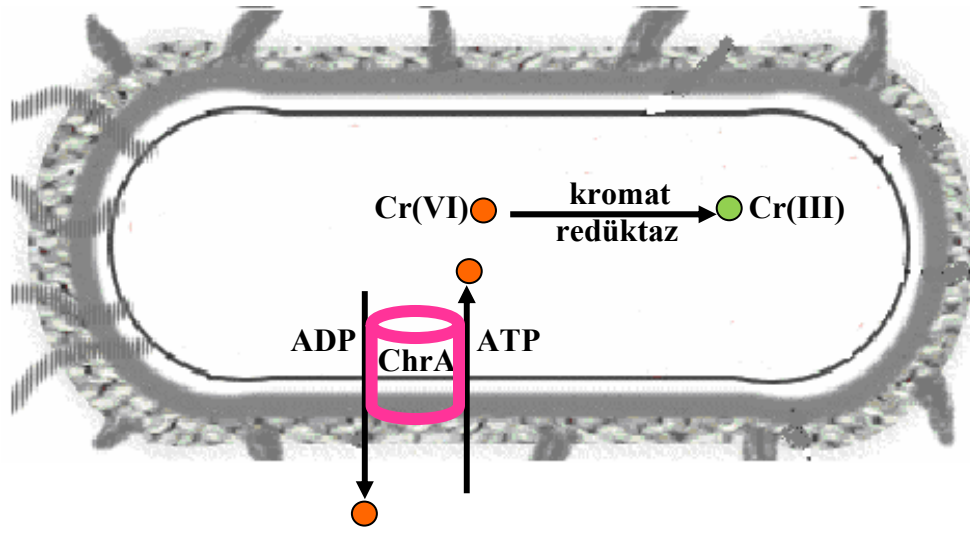
2.4.5 Metalin hücre dışında tutulması

Metallerin hücre dışında tutulması, bakterilerde, mayalarda ve funguslarda gösterilmiştir. Mayalarda Ni(II) direnç bu yolla olmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*, büyük miktarda glutasyonu boşaltarak Ni(II) absorpsiyonunu azaltmaktadır. Mayanın taşıdığı metilglioksal direnç geni, metalin yoğun olduğu ortamda ekstraselüler metal-glutasyon kompleksleri oluşturma yeteneğindedir. Direnç, toksik metalin bu komplekse bağlanması ve hücre zarından geçememesi ile olmaktadır. Buna benzer bir mekanizma funguslarda Cu(II) direncinde görülmektedir. Bu fungus, metaloksalat kompleksi oluşturmak için oksalat salgılamaktadır. *Citrobacter* de Cd(II) direnci oluşturmak için çözünmeyen kadmiyum fosfat kompleksleri meydana getirmektedir (Bruins *et al.* 2000).

Metallerin dış zara veya kılıf proteinlerine spesifik olmayan bir şekilde bağlanması da metalin geçirgen zardan içeri alınmaması ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, bakterilerin doğal olarak bulundurdukları ekstraselüler polisakkarit kısım metal iyonlarını biyolojik olarak tutmakta ve onları hücre bileşenleri ile etkileşiminden korumaktadır. Bu polisakkarit kısım metal iyonlarının tutunabileceği bölgeler de oluşturabilmektedir (Cervantes *et al.* 1994, Bruins *et al.* 2000). Ekstraselüler olarak metal direnci gösteren bakterilerden bazıları, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus*'dur. Bu suşlar, koruyucu ekzopolisakkarit kısmı olmayan bakterilere göre iki kat daha fazla metal direnci göstermektedir. Deniz bakterisi *Vibrio alginolyticus* Cu(II) değişiminde Cu(II) bağlayan ekstraselüler proteinler sentezlemektedir. Buradaki mekanizmada metal kelasyonu şeklinde olmaktadır (Bruins *et al.* 2000).

2.5 Mikroorganizmalarda Cr(VI) Direnci

Mikroorganizmalar Cr(VI) gibi bir ağır metali öncelikle hücre dışına atmaya çalışmaktadır (Cervantes *et al.* 1990, Alvarez *et al.* 1999, Nies 1999, Pimentel *et al.* 2002). Aynı zamanda Cr(VI) daha az toksik formu olan Cr(III) formuna da enzimatik yolla dönüştürülmektedir (Cheung and Gu 2007). Mikroorganizmalardaki Cr(VI) direnç yolları şekil 2.2’de özetlenmiştir.

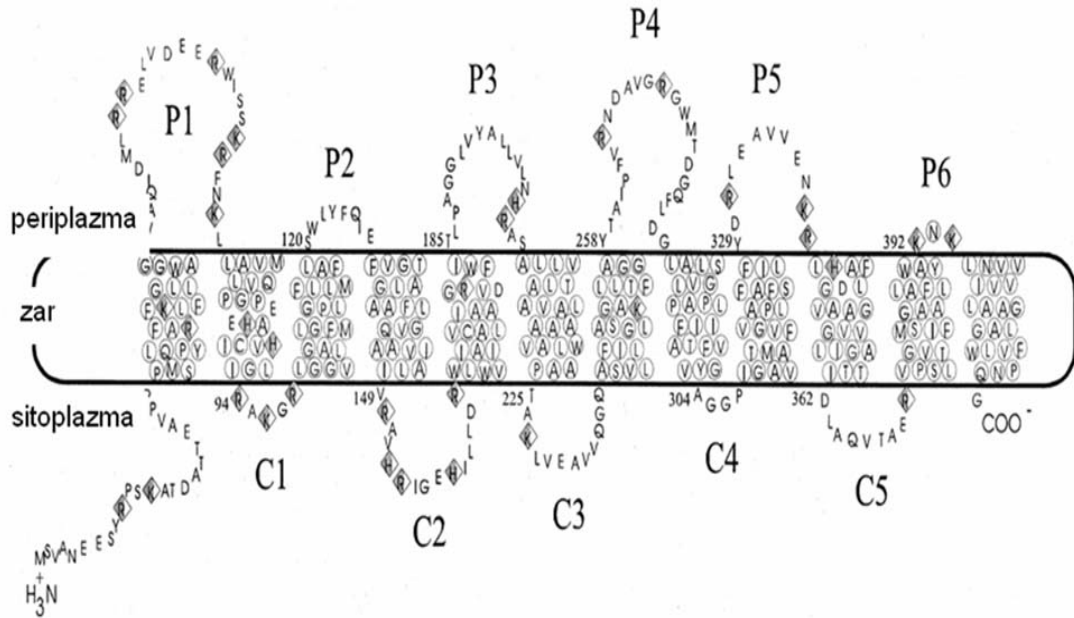


Şekil 2.2 Mikroorganizmalarda Cr(VI) direncinin şematik gösterimi

2.5.1 Krom(VI)’nın hücre dışına atılması

Krom(VI) mikroorganizmalardan, kromat sülfat antiport sistemi ile dışarı pompalanmaktadır (Nies *et al.* 1998). Sülfat taşınması ile ilgili plazmid veya kromozomdan kodlanan kromat direnci *P. fluorescens*, *A. eutrophus*, *P. aeruginosa* ve *P. mendocina* gibi mikroorganizmalarda gösterilmiştir. *P. fluorescens*’teki kromat indirgenmesi mikroorganizmadaki kromat direncinden sorumlu, pLHB1 plazmidinden bağımsız olmaktadır. *P. mendocina*’dan elde edilen plazmid (pARI180) ise hem indirgenmeden hem de dirençten sorumludur (Nies 1999). *P. aeruginosa* ve *A. eutrophus*’un sahip olduğu plazmidler, *chr A* genini içermektedir. Krom alımının Chr A proteini ile gerçekleştiği varsayılmaktadır.

P. aeruginosa'daki Chr A ile yapılan direnç, kromatı sitoplazmadan çıkararak bir dışarı pompalama sistemine dayanmaktadır. Kromatin dışarı pompalanması sülfatla inhibe olmaktadır, çünkü sülfat Chr A'ya bağlanmaktadır (Cervantes *et al.* 2001). Daha önceki çalışmalarda, CHR protein ailesine dahil olan ve *P. aeruginosa*, *A. eutrophus*'da gibi mikroorganizmalarda bulunan ChrA proteininin, enerji bağımlı olarak kromatin hücreden dışarı çıkarılmasını katalizlediği gösterilmiştir (Alvarez *et al.* 1999, Nies 1999, Jiemez Mejia *et al.* 2006). Şekil 2.3'te ChrA proteininin şematik olarak gösterilişi verilmiştir.



Şekil 2.3 ChrA proteininin şematik gösterimi

Krom(VI)'ya bu şekilde gösterilen direnç *P. ambigua* (Horitsu *et al.* 1983), *P. fluorescens* (Ohtake *et al.* 1987) ve *Enterobacter cloacae* (Ohtake *et al.* 1990) gibi mikroorganizmalarda kromatin hücre içinde biriktirilmesinin azaltılmasıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu mekanizma, kromatin hücre dışına atılması veya ağır metalin hücre içine alınımının durdurulması şeklindeki sistemlerle ilgili olabileceği gibi her iki sistemi de içerebilmektedir (Cervantes *et al.* 1990, Alvarez *et al.* 1999, Pimentel *et al.* 2002).

2.5.2 Krom(VI)'nin aerobik indirgenmesi

Krom(VI)'nin hücre içine girip proteinler aracılığı ile hücre dışına pompalanmasının yanı sıra metalin enzimatik yolla daha az toksik formuna indirgenmesi de mikroorganizmaların geliştirdiği başka bir dirençtir. Krom(VI) aerobik veya anaerobik koşullarda indirgenerek Cr(III)'e dönüştürülebilmektedir.

Krom(VI) ağır metalinin aerobik olarak indirgenmesi *B. sphaericus* (Pal and Paul 2004), *Ochrobactrum intermedium* (Sultan and Hasnain 2006), *Providencia* sp. (Thacker *et al.* 2006), *Vibrio fischeri* (Fulladosa *et al.* 2006) ve *Brucella* sp., (Thacker *et al.* 2007) gibi mikroorganizmalarda görülmüştür. Bakteriyel olarak Cr(VI) ağır metalinin bu şekilde indirgenmesi iki veya üç aşamalı bir reaksiyondur. Krom(VI) öncelikle Cr(V) ve/veya Cr(IV)'e dönüşmekte daha sonra da son ürün olan Cr(III)'e çevrilmektedir. Fakat Cr(V)'in Cr(IV)'e ve Cr(IV)'ün de Cr(III)'e çevriminin kendiliğinden mi yoksa enzimin katalizlediği bir reaksiyon olup olmadığı henüz kanıtlanmamıştır. Bu indirgenme reaksiyonunda NADH ve NADPH elektron verici olarak görev almaktadır. Kromat redüktaz (ChrR), Cr(VI)'yı indirgerken bir elektronu Cr(VI)'e aktarır, bunu takiben iki elektron da Cr(III)'ü oluşturmak üzere tekrar aktarılmaktadır (Cheung and Gu 2007).

2.5.3 Krom(VI)'nin anaerobik indirgenmesi

Kroma dirençli birçok fakültatif mikroorganizmanın Cr(VI) indirgenmesi araştırılmıştır. Sülfat indirgeyen bakterilerin (SRB) de Cr(VI)'yı da içeren farklı ağır metalleri indirgediği bulunmuştur. *D. vulgaris*'teki indirgenmede çözümlü c₃ sitokrom, *Desulfomicrobium norvegicum*'da ise hidrojenaz ve c-tipi sitokrom Cr(VI) indirgenmesi katalizlemektedir. Krom(VI)'yı indirgeyebilen diğer anaeroblar ise *Microbacterium* sp. MP30, *Geobacter metallireducens*, *Shewanella putrefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium radiobacter* gibi mikroorganizmalardır. Bu indirgenme mekanizmasında, hem çözümlü kısımda hem de zar kısımda indirgenmeden sorumlu enzim bulunmuştur. Aerobiklerdeki enzimden farklı olarak anaeroblardaki enzimde elektron transfer sistem (özellikle sitokrom ailesi) reaksiyonun katalizlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Cheung and Gu 2007).

Sülfat indirgeyen bakterilerin H₂S gibi metabolik ürünleri oksijensiz koşullarda Cr(VI) indirgenmesi için çok etkili kimyasallardır. Anaerobik ortamda Cr(VI), bakteri için besin maddelerinden enerji üretilirken terminal elektron tutucu olarak davranarak bu arada da indirgenmektedir (Cheung and Gu 2007).

Mikroorganizmalarda ağır metallere karşı direnç sistemlerinin birçoğunda proteinler anahtar rol oynamaktadır. Bu proteinlerin izolasyonları ve karakterlerinin belirlenmesi direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda dirençten sorumlu proteinlerde meydana gelebilecek değişikliklerin tespiti, ağır metallere karşı oluşturulan direnç sistemlerinin daha kolay anlaşılmasını da sağlayacaktır. Bu tip araştırmalar ancak proteom analizleri ile yapılmaktadır.

2.6 Proteom Çalışmaları

Proteom terimi ilk kez 1995 yılında bir genomun proteininin tam olarak tamamlanması anlamıyla kullanılmıştır. Genden kaynaklanan ve aktif proteinde sonlanan düzenleyici olaylar çağlayanında proteom, genomun son ürünü olarak görülmektedir. Genom proteoma kıyasla değişmezken, proteom oldukça yüksek bir dinamizme sahiptir (Rabilloud 2000).

Bu dinamizm, hücrenin çevresel koşullardan, çeşitli stres durumlarından etkilenmesine bağlı olurken, hücrenin sağlıklı olup olamaması ile fizyolojik durumundan da kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, farklı koşullar altında, genom aynı olsa bile tabiki farklı organizmaların farklı proteomları olacaktır. Proteom çalışmalarına proteomiks adı verilmektedir (Rabilloud 2000). Proteomiks, belli koşullar altında bütün bir organizmanın, özel bir dokunun veya herhangi bir hücresel kısmın proteinlerindeki değişiklikleri belirleyebileceğiniz bir analiz yöntemidir. Bu tip çalışmaların iki önemli amacı bulunmaktadır. Birincisi, hücrelerden izole edilen proteinlerin tanımlanması, ikincisi de tanımlanmış proteinlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesidir. Bu iki hedefe ulaşmada kütle spektrofotometri (MS) vazgeçilmez bir araç olmuştur. Bu tip çalışmalarda öncelikle proteinler izoelektrik noktalarına (birinci boyut) ve daha sonra molekül ağırlıklarına (ikinci boyut) göre ayrılmaktadır.

Bu şekildeki ayırma yöntemine iki boyutlu jel elektroforezi (2D jel elektroforezi) adı verilmiştir. MS analizinden önce proteinler denatüre edilerek, enzimatik yolla sindirilmektedir. Proteinlerin sindirilemesinde sıklıkla tripsin enzimi kullanılmaktadır. Son olarak da peptid örnekleri kütle spektrofotometri de ölçülmektedir (Kolker *et al.* 2006). Bütün bu çalışmalar sonucunda, bir mikroorganizmanın bütününün, özel bir dokusunun veya herhangi hücresel bir kısmının proteinlerindeki değişiklik izlenebilmektedir.

2.6.1 Mikroorganizmalarda ağır metal direnç sistemleri ile ilgili yapılan proteom çalışmaları

Bu tip çalışmalar henüz çok yeni olmakla birlikte mikrobiyel ağır metallerin direnç sistemlerinin araştırıldığı proteomik çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi Felicio *et al.* (2003)'nin gerçekleştirdiği ve Cu(II) iyonlarının *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın protein sentezi üzerine etkinin araştırıldığı çalışmadır. Denemelerde demir içeren ortamda geliştirilen *At. ferrooxidans*'ın zar ve periplazma protein sentezine 200 mM Cu(II)'nin etkisi incelenmiştir. Mikroorganizma Cu(II) içermeyen ve içeren olmak üzere iki farklı ortamda geliştirilmiştir. İki farklı besiyerinde geliştirilen bakterinin proteinleri izole edilerek protein profillerindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Bakır(II) içeren ortamda bakterinin bazı proteinlerinin sentezinin azaldığı veya arttığı görülmüştür. Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin Cu(II) iyonları tarafında belirgin bir şekilde yapımının azaldığı belirlenmiştir. Muhtemelen bu proteinlerin asidik proteinler olduğu ve dış zara ait elemanlar olabileceği ileri sürülmüştür. Çalışmada rustiksiyanin isimli bir proteinin ise ağır metal içeren ortamda daha fazla sentezlendiği tespit edilmiştir. Periplazmik bir protein olan rustiksiyaninin demir oksidayon yolunun elektron taşıma zincirinde görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar bakterinin iki yolla Cu(II) iyonlarına karşı direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Birinci yolda Cu(II) iyonlarına karşı geçirgenlik azaltılmakta, ikinci yolda ise Cu(II) periplazmada sentezi artan proteince tutulmaktadır.

Schmidt *et al.* (2005) Ni(II) iyonlarının *Streptomyces acidiscabies*'in hücre içi protein sentezine etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, mikroorganizma Ni(II) içermeyen ve içeren iki farklı ortamda geliştirilmiştir. Protein sentezindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Denemelerde, Ni(II) içeren ortamlarda glikoliz ile ilgili bazı enzimlerin sentezinin arttığı, demir içeren süperoksit dismutazın sentezinin ise engellendiği bulunmuştur.

Sharma *et al.* (2006) *P. fluorescens*'in ağır metal stresine karşı gösterdiği direnç mekanizmasında proteinlerin rolünü proteomik bir yaklaşımla açıklamışlardır. Çalışmada bakteri çeşitli ağır metallere maruz bırakıldığında farklı olarak sentezlenen proteinleri 2D jel elektroforezi ile belirlenmiş ve MS ile tanımlanmıştır. Bakteri Pb(II) ve Cu(II)'ye maruz bırakılınca spo VG ile enolaz proteinlerinin sentezinin arttığı görülmüştür. Mikroorganizma Co(II) ağır metaline maruz kaldığında ise varsayılan proteinin sentezinin azaldığı, ksilotransferaz, ORF 18 faj fi KZ, OMP H1 ve translasyonel uzama faktör (EF-Tu) gibi proteinlerin ise yalnızca bu metale maruz kalındığında sentezlendiği görülmüştür. Bütün bu sonuçlar, bakterinin ortamda ağır metaller varken çalışmada tanımlanan proteinler aracılığı ile yaşama çabasını göstermektedir.

Bar *et al.* (2007) ağır metallerle kirletilmiş ortamlardan izole ettikleri mikroorganizmayı *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlamışlardır. Bakteri Co(II) ağır metaline ve Pb(II) içeren ortamlarda geliştirilmiştir. Ağır metale maruz kalan bakterinin farklı olarak sentezlediği proteinler 2D jel elektroforezi ve MS ile belirlenerek tanımlanmıştır. Buna göre L-izoaspartat protein karboksimetiltransferaz tip II ile DNA girazın farklı olarak sentezlendiği görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Atıksu

Mikroorganizma kaynağı olarak kullanılan atıksu örnekleri, Sepiciler Deri Fabrikası'ndan (İzmir, Türkiye) alınmıştır.

3.1.2 Krom(VI) çözeltisi

Krom(VI) stok solüsyonu, 10 g/l olarak hazırlanan stok $K_2Cr_2O_7$ solüsyonundan gerekli seyreltmeler yapılarak elde edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Saf kültürlerin eldesi

Atıksu örnekleri 50 ml'lik erlenlere 20 ml olacak şekilde hazırlanmış yaklaşık 50 ppm Cr(VI) içeren sıvı nutrient broth besiyerine ekilmiştir. Atıksu pH derecesi yaklaşık 8 olduğu için besiyeri pH değeri de bu dereceye ayarlanmış ve ortamlar atıksu örneklerinin 1 ml'si ile aşıl原因 olarak 30 °C'de inkübe edilmiştir. Geliştirilen sıvı kültürlerden 0.1 ml alınarak 100 ppm Cr(VI) içeren nutrient agara (pH 8) çizgi ekimler yapılmıştır.

İki günlük inkübasyon süresi sonunda (30 °C) gelişen kültürlerden tek koloniler elde edilmiş ve bunların saflık kontrolleri tekrar aynı besiyerlerine ekilerek yapılmıştır. Elde edilen saf kültürler, yatık nutrient agarda, +4 °C'de muhafaza edilmiş ve her 3 ayda bir yenilenmiştir.

Nutrient Broth Besiyeri Bileşimi

Bileşen	Miktar (g/l)
Pepton.....	5.0
Maya özütü.....	3.0

Nutrient Agar Besiyeri Bileşimi

Bileşen	Miktar (g/l)
Pepton.....	5.0
Maya özütü.....	3.0
Agar.....	15.0

3.2.2 Saf kültürlerin tanımlanmaları

Deri sanayi atıksularından elde edilen dört adet saf kültürün tanımlanması (izolat 1, izolat 2, izolat 3 ve izolat 4) Doç. Dr. Jeppe Lund Nielsen ve teknisyen Jane Ildal tarafından Aalborg Üniversitesi Biyoteknoloji, Kimya ve Çevre Mühendisliği bölümünde (Danimarka) gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Saf kültürlerle yapılan Cr(VI) biyobirikim çalışmaları

Saf kültürlerin biyobirikim çalışmaları nutrient broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmaların izole edildikleri atıksu pH derecesi 8 olduğundan biyobirikim çalışmalarında kullanılan ortamların pH derecesi 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile 8 derecesine ayarlanmıştır. İzolatlar 50, 100, 200 ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamlarda sürekli pasajlar yapılarak geliştirilmiştir. Saf kültürlerin Cr(VI) giderim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla tüm izolatların gelişebildiği 300 ppm Cr(VI) içeren ortamlar kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlara aynı besiyerlerinde iki kez aktifleştirilmiş saf kültürlerden 1'er ml inoküle edilmiştir.

Biyobirikim çalışmaları, 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik besiyerlerinde 30 °C'de ve 100 rpm karıştırma hızındaki çalkalayıcıda (New Brunswick Scientific Innova 4230) 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Krom(VI)'ya dirençli mikroorganizmaların proteom çalışmaları

Mikroorganizmaların Cr(VI)'yı ortamdaki uzaklaştırmak için nasıl bir mekanizma kullandığını araştırmak amacıyla dört farklı izolat Cr(VI) içermeyen ve yaklaşık 300 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyerinde geliştirilmiştir. Denemelerde kullanılan yöntem, Plesa *et al.* (2006) tarafından daha önce uygulanmış yöntemin tez çalışmasına modifiye edilmesinden sonra kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların toplam zar ve sitozol proteinlerinin izolasyonu

Toplam zar ve sitozol proteinlerinin izolasyonları için iki kez aktifleştirilmiş kültürler 1000 ml hacmindeki erlenlerde 500 ml olarak hazırlanmış kromsuz ve 300 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyerlerine ekilmiştir. Protein izolasyonu için izolat 1 ve 2 için OD₅₄₀:2.0, izolat 3 için OD₅₄₀:1.5 ve izolat 4 için OD₅₄₀:1.0 olduğunda aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- a) Besiyeri 10.000 x g'de 20 dakika santrifüj yapılarak uzaklaştırılmıştır.
- b) Çökelti alınmış ve 10 ml tampon ile süspansiyon edilmiştir (Tampon: 50 mM Tris (pH 8) ve EDTA içermeyen proteaz inhibitör kokteyl).
- c) Bu süspansiyon ile 30 saniyelik sürelerle buz üzerinde sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyon 5 kez tekrarlanmıştır.
- d) Parçalanmamış hücrelerin uzaklaştırılması için 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- e) Bu aşamada süpernatant toplam proteinleri içermektedir.
- f) Süpernatant alınarak 30.000 x g'de 90 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamada süpernatant kısımdan sitozol proteinleri, çökelti kısımdan ise toplam zar proteinleri elde edilmiştir.

İzoelektrik fokuslama (IEF)

Çalışmanın bu aşamasında 1. yöntem ve 2. yöntem olmak üzere iki farklı yol izlenmiştir. Birinci yöntem izolat 1 ve izolat 2'den elde edilen sitozol proteinlerinin proteomik çalışması dışında bütün denemelerde kullanılmıştır. İkinci yöntem ise izolat 1 ve izolat 2'den izole edilen sitozol proteinleriyle yapılan çalışmada kullanılmıştır.

1. yöntem: İzoelektrik fokuslama çalışmasında öncelikle protein örneklerinin bu yöntemde kullanılan, pH derecelendirilmesine sahip (pH 3-10) şeritlere bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla, protein örnekleri rehidrasyon tamponu ile karıştırılmış ve şeritlerle gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Rehidrasyon tamponu: 7M üre, 2 M tiyoüre, %1 (w/v) ASB14 (amidosülfobetain14), 2 mM TBP (tribütil fosfin), %2 (v/v) şerit tamponu (pH 3-10) ve eser miktarda bromofenol mavisi.

İzoelektrik fokuslama, 15 °C'de 150V (2 saat), 300V (2 saat), 600V (1.5 saat), 1200V (1 saat), 2400V (1 saat) ve 3500V (17 saat) olarak gerçekleştirilmiştir (Multiphor II system-Amersham Biosciences).

2. yöntem: İzoelektrik fokuslama için öncelikle protein örneklerinin pH derecelendirilmesine sahip (pH 5-8) şeritlere bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla, protein örnekleri denatürasyon tamponu ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Daha sonra indigrenmiş proteinler şeritlere bağlanması için rehidrasyon tamponu ile gece boyu muamele edilmiştir.

Denatürasyon tamponu: 6 M üre, 2 M tiyoüre, %1.5 (w/v) formalit, %0.8 (w/v) CHAPS, % 1 (w/v) ditiyoeritrol (DTE).

Rehidrasyon tamponu: 6 M üre, 2 M tiyoüre, 5 µl/ml formalit, %0.8 (w/v) CHAPS

İzoelektrik fokuslama, 15 °C'de 200V (0.1 saat), 200V (5 saat), 500V (1 saat), 500V (2 saat), 3500V (1 saat) ve 3500V (15 saat) olarak gerçekleştirilmiştir (Multiphor II system-Amersham Biosciences).

Bu aşamadan sonra her iki yöntemle şeritlere bağlanmış proteinlerin poliakrilamid jellerde yürüyebilmesi için gerekli işlemler yapılmıştır. Bu amaçla, şeritler dengeleme tamponu ile 15 dakika ve alkalasyon tamponu ile de 15 dakika inkübe edilmiştir.

Dengeleme tamponu: 6M üre, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), %30 (v/v) gliserol, %2 (w/v) SDS, 5 mM TBP.

Alkalasyon tamponu: 6M üre, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), %30 (v/v) gliserol, %2 (w/v) SDS, %2.5 (w/v) iodoasetamid.

SDS-PAGE

Bu çalışmada iki farklı yol izlenmiştir. Yalnızca izolat 1 ve izolat 2'den elde edilen sitozol proteinlerinin proteomik çalışmasında ikinci yöntem, diğer denemelerde ise birinci yöntem kullanılmıştır.

1. yöntem: Dengeleme ve alkalasyonu tamamlanmış şeritler, SDS-PAGE tanklarına yerleştirilerek 16 saat boyunca SDS içeren poliakrilamid jellerde (%10) yürütülmüştür. Protein örneklerinin 30V düzeyinde yığılması ve 80V seviyesinde de molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Jellerdeki proteinlerin görünür hale gelmesi Coomassie G250 boyası ile gerçekleştirilmiştir.

2. yöntem: Dengeleme ve alkalasyonu tamamlanmış şeritler, SDS-PAGE tanklarına yerleştirilerek 16 saat boyunca %8 ile %16 oranlarında derecelendirilmiş SDS içeren poliakrilamid jellerde yürütülmüştür. Bu jeller Criterion (11 cm) olarak adlandırılmakta olup hazır olarak firmadan satın alınmıştır (BioRad). Protein örneklerinin sabit 200V akım altında molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Jellerdeki proteinler öncelikle Flamingo Pink floresans protein boyası ile (BioRad, Hercules, CA) bir gece boyunca boyanmıştır.

Bu proteinlerin görüntülenmesi Typhoon 8600 görüntüleme cihazı ile (GE Healthcare) yapılmıştır. Protein noktalarının gözle görünür hale gelmesi de Coomassie G250 boyaması ile gerçekleştirilmiştir.

Jellerdeki proteinlerin belirlenmesi ve incelenmesi

Jellerdeki proteinler Image Master 2D Platinum-6-Melanie ve Image Master Melanie7 (Swiss Institute of Bioinformatics) software ile belirlenmiştir. Krom(VI) içermeyen ortamda gelişen bakterilerin proteinleri standart olarak kabul edilmiş ve Cr(VI) içeren ortamda izole edilenler ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucu ağır metal içeren ortamda yeni olarak sentezlenen veya bu ortamda daha fazla sentezlenen proteinler kütle spektrofotometrisi için jellerden tekrar izole edilmiştir.

Kütle spektrofotometrisi

Coomassie Brilliant Blue G250 ile boyanmış jellerdeki proteinlerin kütle spektrofotometrisinde ölçülebilmeleri için öncelikle jellerden tekrar izole edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla sırasıyla şu işlemler yapılmıştır:

- a) Tespit edilen proteinler jelden kesilip çıkarılmıştır.
- b) Jel parçaları asetonitril (%50 v/v) ile yıkanmıştır.
- c) Asetonitril ortamdan uzaklaştırılmış ve yerine 12.5 ng/ μ l tripsin ve 50 mM amonyum bikarbonat içeren sindirim solüsyonu eklenmiştir. Jel parçaları, bu solüsyon ile 4 °C'de 45 dakika inkübe edilmiş ve proteinlerin jelden tekrar izole edilmesi sağlanmıştır.
- d) İnkübasyon süresi sonunda sindirim solüsyonu uzaklaştırılmış ve yerine 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiştir. Jel parçaları, bu tamponda 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- e) İzolasyonunun son aşaması, jel parçaları üzerine formik asit (%5 v/v) ve saf asetonitril eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir.
- f) Peptid örnekleri, vakumlu santrifüj ile konsantre edilmiş ve %5 (v/v) formik asit ile çözülmüştür.

g) Örnekler kullanılmalarına kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2.5 Mikroorganizmalardan plazmid izolasyonu

Mikroorganizmalarda bulunan ağır metal direnç mekanizmalarını sağlayan proteinler, plazmidler üzerinden de kodlanabileceğinden çalışmada kullanılan bakterilerin sahip olabilecekleri plazmidler izole edilmiştir. Bu amaçla izolat 1, izolat 2, izolat 3 ve izolat 4, 50 ppm Cr(VI) içeren ve krom içermeyen nutrient broth ortamlarında geliştirilmiştir. Plazmid izolasyonları GenElute HP Plazmid Miniprep Kit (Sigma-NA0160) ile gerçekleştirilmiştir. Ağır metal içeren ve içermeyen ortamlardan izole edilen plazmidler karşılaştırılmıştır. Ağır metal içeren ortamda plazmide sahip bakterinin plazmidini *E. coli* DH5 α bakterisine ısı şoku uygulamasıyla aktararak transformanın Cr(VI) içeren ortamda gelişip gelişmediği kontrol edilmiştir. Bu şekilde ağır metale direnci sağlayan proteinin plazmid üzerinde kodlanıp kodlanmadığı belirlenmiştir.

3.3 Analitik Yöntemler

Optik yoğunluğun belirlenmesi (OD)

İnkübasyon süresi boyunca erlerden belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Çökelti, fizyolojik tuzlu su ile yıkanmış ve gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra optik yoğunluk 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Krom(VI) konsantrasyonunun belirlenmesi

Krom analizi Cr(VI)'nın sülfürik asit (%20) içeren ortamda difenilkarbazid ile verdiği renkli kompleksten yararlanılarak spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan difenilkarbazid solüsyonu 0.25 g difenilkarbazidin 100 ml etil alkolde (%95) çözülmesi ile hazırlanmıştır.

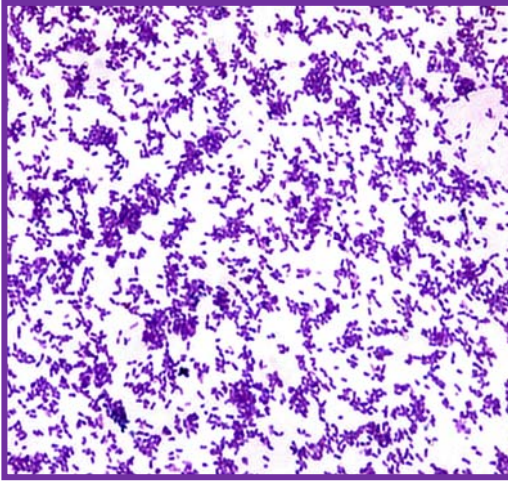
İnkübasyon sırasında belirli zamanlarda alınan örnekler, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra sıvı kısım besiyerinde kalan krom(VI)'nın analizi için kullanılmıştır. Sıvı kısımdan 1 ml, %20'lik H₂SO₄'ten 3.3 ml ve difenilkarbazid solüsyonundan 1 ml alınarak yapılan karışım, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Ölçümler spektrofotometrik olarak 540 nm'de gerçekleştirilmiştir (Snell and Snell 1959).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

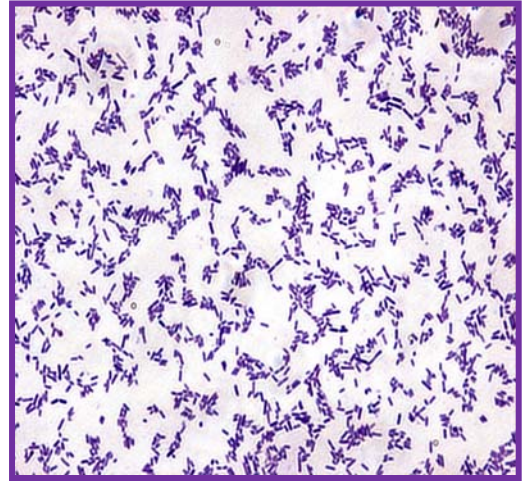
Gerçekleştirilen tez çalışmasında, deri sanayi atıksularından Cr(VI)'ya direnç gösteren dört farklı mikroorganizma izole edilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında bu mikroorganizmaların Cr(VI) biyobirikim kapasiteleri nutrient broth besiyerlerinde belirlenmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşamasında da Cr(VI)'ya dirençli bu bakterilerin direnç mekanizmaları iki boyutlu jel elektroforez ve kütle spektrofotometri çalışmalarıyla aydınlatılmıştır.

4.1 Saf kültürler ve Tanımları

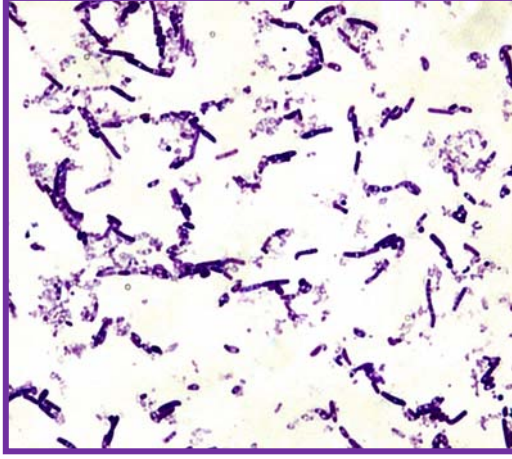
Atıksu örneklerinden yaklaşık 100 ppm Cr(VI) içeren nutrient agar besiyerinde gelişebilen dört farklı koloni elde edilmiştir. Bu mikroorganizmaların 16S rDNA analizi yapıldığında izolat 1'in *Ochrobactrum* sp., izolat 2'nin *Pseudomonas aeruginosa*, izolat 3'ün *Bacillus thuringiensis* ve izolat 4'ün *B. cereus* olduğu bulunmuştur. (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4)



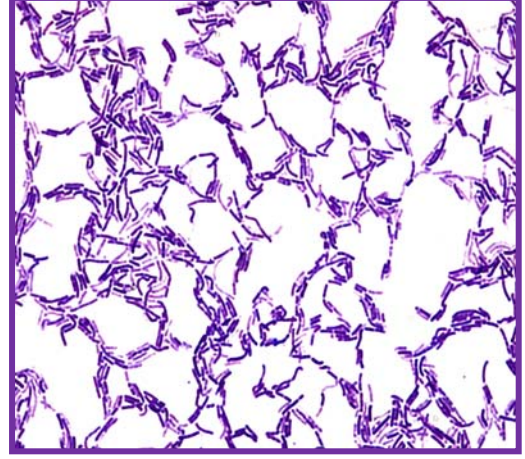
Şekil 4.1 *Ochrobactrum* sp. (izolat 1)



Şekil 4.2 *P. aeruginosa* (izolat 2)



Şekil 4.3 *B. thuringiensis* (izolat 3)



Şekil 4.4 *B. cereus* (izolat 4)

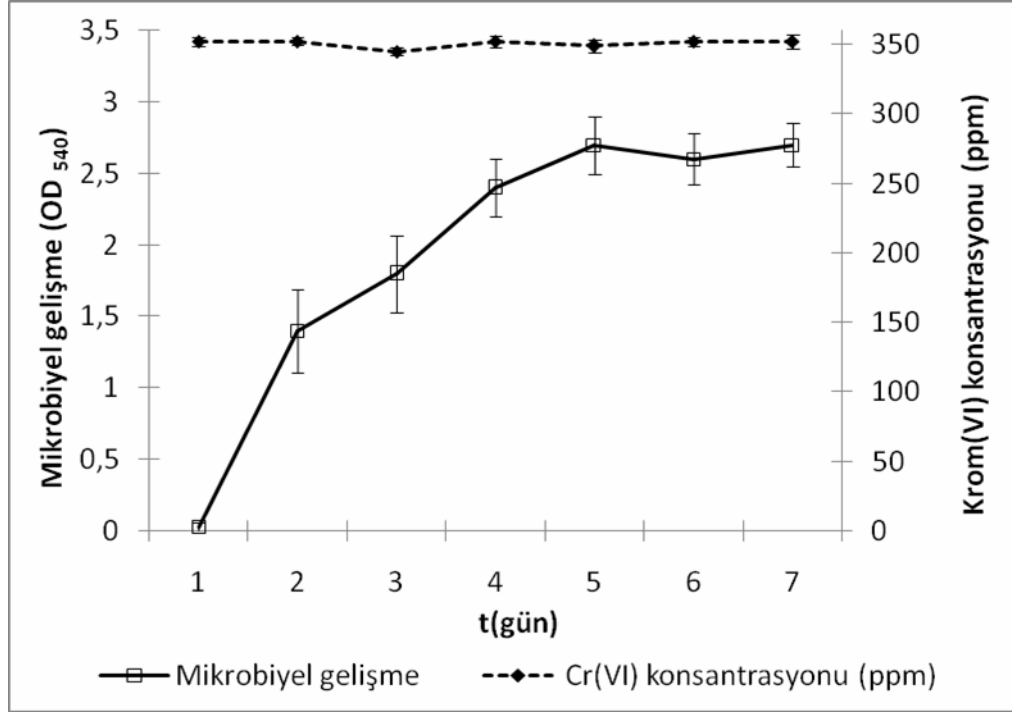
4.2 Saf Kültürlerle Yapılan Cr(VI) Biyobirikim Çalışmaları

Çalışmada kullanılan dört farklı mikroorganizmanın (*Ochrobactrum* sp. *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus*) Cr(VI) biyobirikim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yaklaşık 300 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerinin pH dereceleri mikroorganizmaların izole edildiği atıksu pH derecesine (pH 8) ayarlanmıştır. Bu amaçla, 250 ml'lik erlenlerde bahsedilen Cr(VI) konsantrasyonunu içeren 100'er ml'lik besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine yine aynı ortamlarda aktifleştirilmiş kültürden 1 ml aşılansmış ve denemeler 100 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Ochrobactrum sp.'nin Cr(VI) biyobirikim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla pH derecesi 8'e ayarlanmış, 352.3 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmanın yaklaşık 300 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Yapılan denemelerde mikroorganizma, yüksek Cr(VI) konsantrasyonuna sahip ortamda gelişmesine rağmen, ortamdaki Cr(VI) ağır metalini besiyerinden uzaklaştırmamıştır. Bu nedenle besiyerinde bakteri aşılansmasından sonra geriye kalan Cr(VI) konsantrasyonu inkübasyon süresi sonuna kadar sabit kalmıştır.

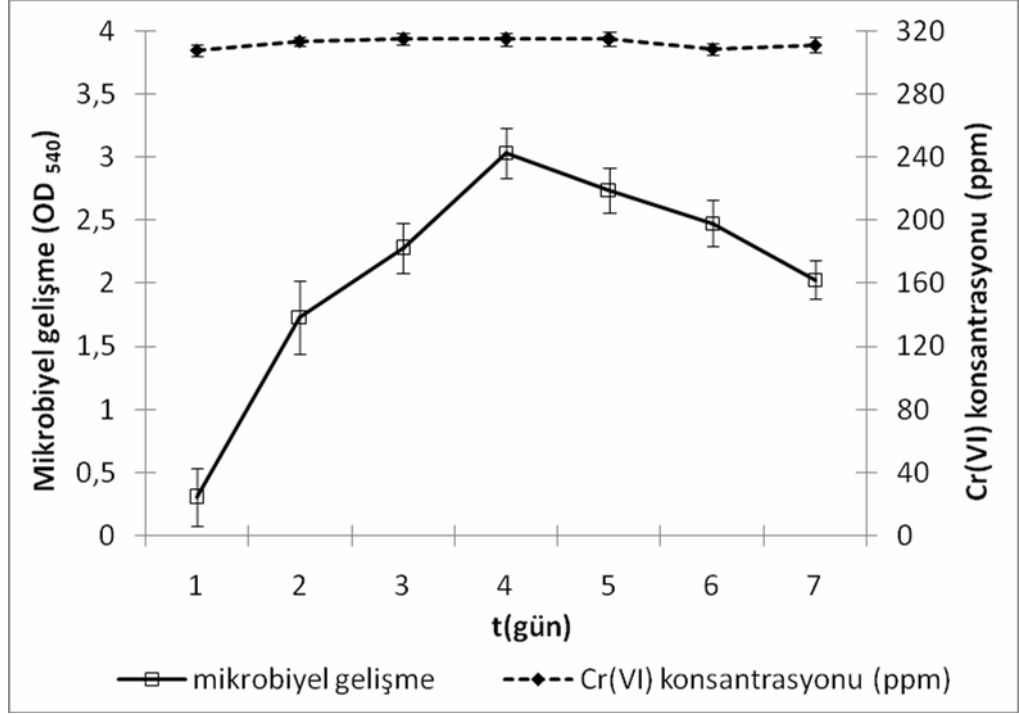
Yedi günlük inkübasyon süresinin sonunda OD₅₄₀: 2.7, besiyerinde ölçülen Cr(VI) konsantrasyonu ise 352.3 ppm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5 *Ochrobactrum* sp. bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi (K.H.: 100 rpm; T: 30 °C; inkübasyon süresi: 7 gün)

P. aeruginosa için Cr(VI) biyobirikim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla pH derecesi 8'e ayarlanmış, 315.2 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmanın bu ortamdaki Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi şekil 4.6'da gösterilmiştir

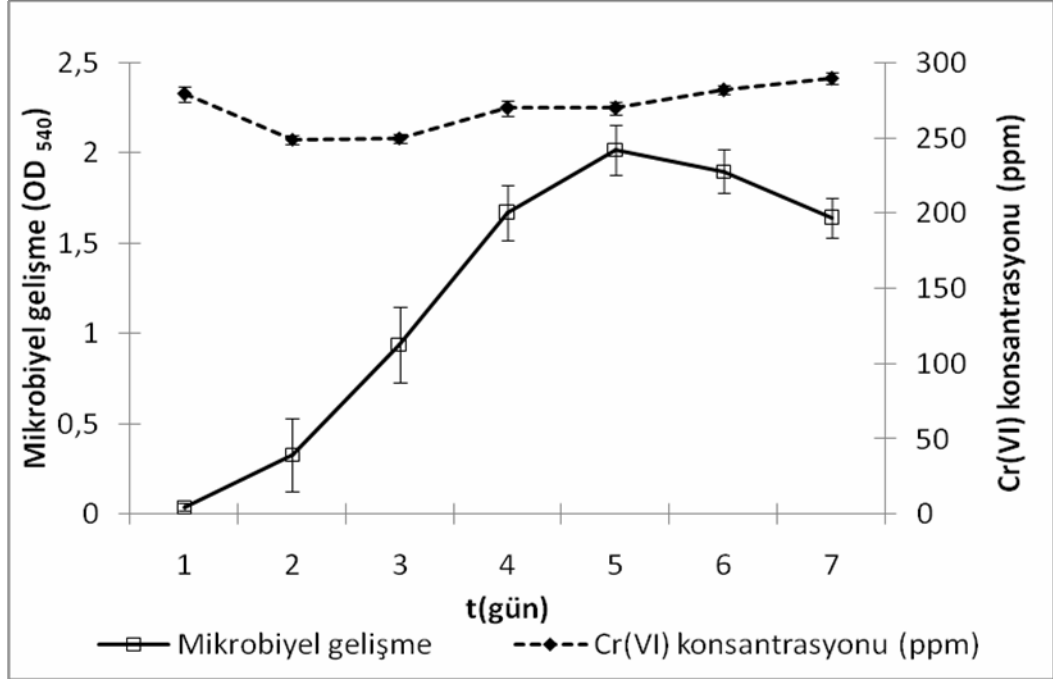
P. aeruginosa ile yapılan çalışmada, bakteri yaklaşık 300 ppm Cr(VI) konsantrasyonuna sahip ortamı tolere etmiştir. Buna rağmen mikroorganizma, besiyerindeki Cr(VI) ağır metalini ortamdaki uzaklaştırmamıştır. Bu nedenle besiyerinde bakteri aşılmasından sonra geriye kalan Cr(VI) konsantrasyonu inkübasyon süresi sonuna kadar yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Yedi günlük inkübasyon süresinin sonunda OD₅₄₀: 2.03, besiyerindeki Cr(VI) konsantrasyonu ise 311.7 ppm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6 *P. eruginosa* bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi (K.H.: 100 rpm; T: 30 °C; inkübasyon süresi: 7 gün)

B. thuringiensis için Cr(VI) biyobirikim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla pH derecesi 8'e ayarlanmış ve 301.9 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmanın bu ortamdaki Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi şekil 4.7'de gösterilmiştir

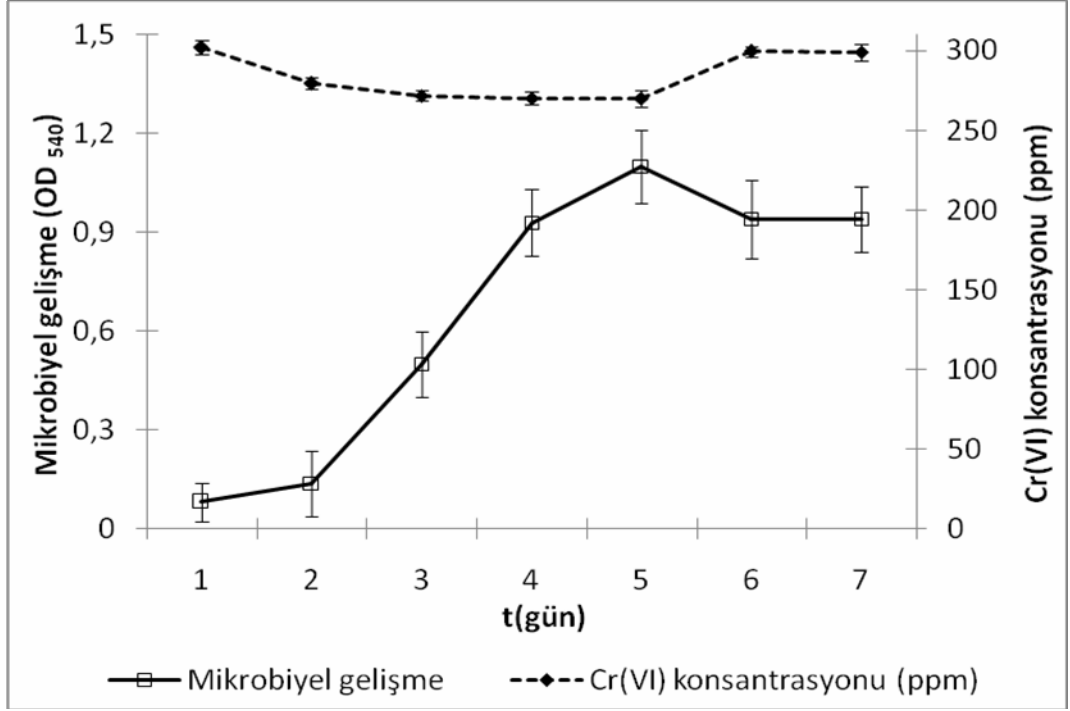
B. thuringiensis bakterisi ile yapılan deneylerde, bakteri yaklaşık 300 ppm Cr(VI) konsantrasyonundaki besiyerinde, inkübasyon süresinin beşinci gününde en yüksek gelişimi göstermiştir (OD₅₄₀: 2.02). Mikroorganizma yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda gelişmesine rağmen, metali ortamdan uzaklaştırmamıştır. Yedi günlük inkübasyon süresi sonunda, besiyerindeki Cr(VI) konsantrasyonu 289.6 ppm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7 *B. thuringiensis* bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi (K.H.: 100 rpm; T: 30 °C; inkübasyon süresi: 7 gün)

B. cereus için Cr(VI) biyobirikim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla pH derecesi 8'e ayarlanmış ve 301.9 ppm Cr(VI) içeren nutrient broth besiyeri kullanılmıştır. Mikroorganizmanın bu ortamdaki Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi şekil 4.8'de gösterilmiştir.

B. cereus ile yapılan çalışmada, bakteri yaklaşık 300 ppm Cr(VI) konsantrasyonuna sahip ortamı tolere edebiliği görülmüştür. Bakteri en yüksek mikrobiyel gelişmeyi inkübasyonun beşinci gününde göstermiştir (OD₅₄₀: 1.1). Buna rağmen mikroorganizma, besiyerindeki Cr(VI) ağır metalini ortamdan uzaklaştırmamıştır. Bu nedenle besiyerinde bakteri aşılmasından sonra geriye kalan Cr(VI) konsantrasyonu inkübasyon süresi sonuna kadar yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Yedi günlük inkübasyon süresinin sonunda besiyerindeki Cr(VI) konsantrasyonu ise 299.1 ppm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8 *B. cereus* bakterisinin Cr(VI) giderim kapasitesi ve mikrobiyel gelişme eğrisi (K.H.: 100 rpm; T: 30 °C; inkübasyon süresi: 7 gün)

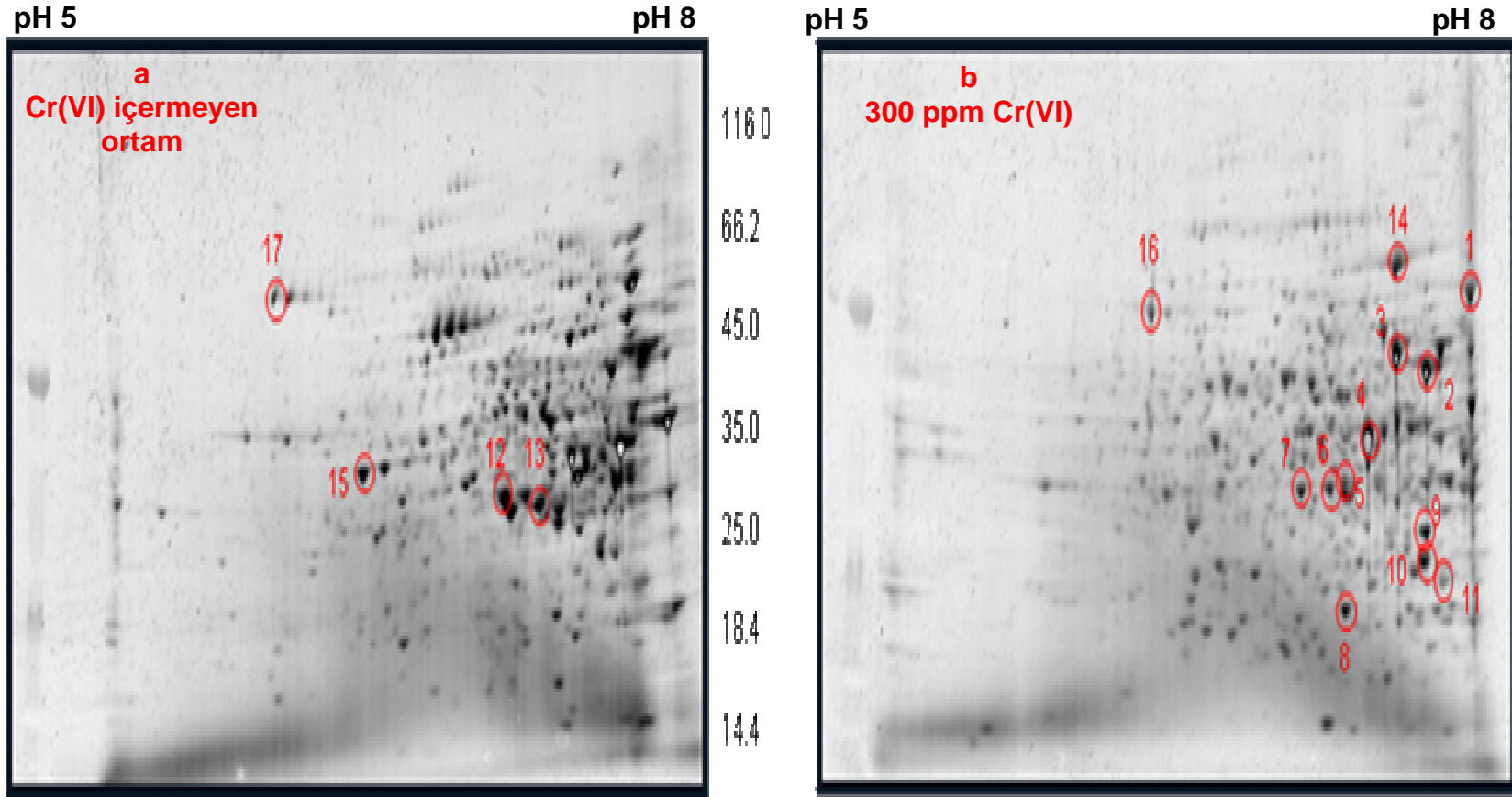
4.3 Mikrobiyel Cr(VI) Giderim Mekanizmalarının Proteomik Yaklaşımla Açıklanması

Krom(VI)'ya direnç gösteren *Ochrobactrum* sp., *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* mikroorganizmalarının ağır metale karşı nasıl bir direnç mekanizması geliştirdiklerini bulmak amacıyla bakteriler yaklaşık 300 ppm Cr(VI) içeren ve Cr(VI) içermeyen nutrient broth besiyerlerinde (pH 8) geliştirilmiştir. Bu ortamlarda gelişen bakterilerden sitozol ve toplam zar proteinleri izole edilerek, bu proteinler iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrofotometrisi ile tanımlanmıştır. Krom(VI) içeren ortamda geliştirilen mikroorganizmalardan izole edilen proteinler ile kromsuz ortamda geliştirilen mikroorganizmalardan elde edilen proteinler karşılaştırılarak her bakterinin ağır metale karşı göstermiş olduğu direnç mekanizmasının proteinlerle ilişkisi belirlenmiştir. Tanımlanan proteinler ile her bakteri için olası bir ağır metal direnç mekanizması açıklanmıştır.

4.3.1 *Ochrobactrum* sp. ile 2D jel elektroforezi çalışmaları

Ochrobactrum sp. ile yapılan denemelerde, bakterinin yüksek konsantrasyonda ağır metale maruz bırakıldığında ürettiği proteinler ile kirletici içermeyen ortamda ürettiği proteinler karşılaştırılmıştır. Bu proteinlerin bazıları kirletici içeren ortamda yeni olarak sentezlenirken bazılarının da bu ortamda sentezlenmesi artmıştır. Öncelikle izoelektrik noktalarına (IEF) daha sonra da molekül ağırlıklarına göre ayrılan sitozol proteinleri şekil 4.9'da (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir. Toplam zar proteinleri ise şekil 4.10'da (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir.

Jeller incelendiğinde 27 adet proteinin farklı olarak sentezlendiği tespit edilmiştir. Bunlardan 17 tanesi sitozolden, 10 tanesi ise zardan izole edilmiştir. İzole edilen bütün proteinlerin 24 tanesi kütle spektrofotometrisi ile sonuç vermiştir. Tanımlanan proteinlerden 17 tanesi sitozol ve 7 tanesi ise zar proteinleridir.



Şekil 4.9 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *Ochrobactrum* sp.'den izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm Cr(VI) içeren ortam

Sitozol kısım ile ilgili proteinler, moleküler şaperon DnaK (nokta 1), periplazmik dipeptid taşıyıcı protein (nokta 2), şaperonin GroEL (nokta 3), varsayımsal proteinler (nokta 4, 5, 6, 8 ve 9) gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (nokta 7), 50S ribozomal protein (nokta 10), triozfosfat izomeraz (nokta 11), metilsitrat sintaz (nokta 12), 3-metil-2-oksobütanoat dehidrogenaz (nokta 13), uzama faktör G (nokta 14), arjinin deiminaz (nokta 15), transketolaz (nokta 16), aldehyd-alkol dehidrogenaz (nokta 17) ile homoloji göstermiştir. Stres koşullarında nokta 12, nokta 13, nokta 15 ve nokta 17'de tanımlanan proteinlerin sentezi azalırken diğerlerinin sentezi artmıştır.

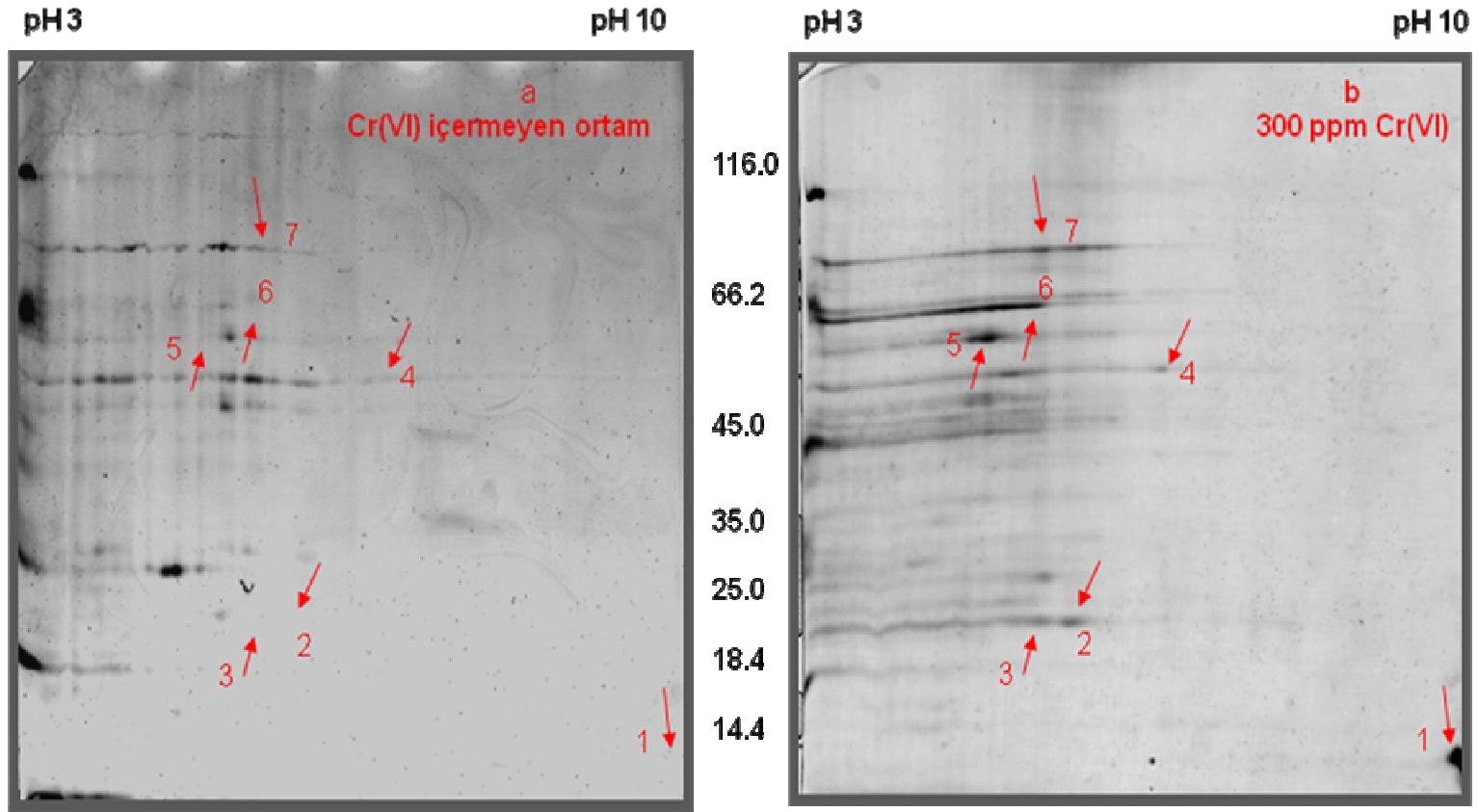
Toplam zar kısım ile ilgili proteinler, ATP sintaz alt ünite D (nokta 1), 50S ribozomal protein L25 (nokta 2), elektron transfer flavoprotein beta alt ünite (nokta 3), ATP sintaz alt ünite A (nokta 4), şaperonin GroEL (nokta 5), 30S ribozomal protein S1 (nokta 6), dış zar proteini (nokta 7) ile homoloji göstermiştir.

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin sitozol kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 *Ochrobactrum* sp.'nin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerinin tanımlanmaları

Protein no	Proteinin adı	Teorik MW (kDa)
Sitozolik kısım		
1	Moleküler şaperon DnaK	68.0 (pI 4.6)
2	Periplazmik dipeptid taşıyıcı protein	39.0 (pI 5.8)
3	Şaperon GroEL	57.0
4	Varsayımsal protein	
5	Varsayımsal protein	
6	Varsayımsal protein	
7	Glisealdehit-3-fosfat dehidrogenaz	35.0 (pI 5.0)
8	Varsayımsal protein	
9	Varsayımsal protein	
10	50S ribozomal rotein	20.0
11	Triozfosfat izomeraz	26.0 (pI 4.9)
12	Metilsitrat sintaz	42.0 (pI 5.8)
13	3-metil-2-oksobutanoat dehidrogenaz	36.0 (pI 5.3)
14	Uzama faktör G	76.0 (pI 5.1)
15	Arjinin deiminaz	47.0 (pI 6.0)
16	Transketolaz	72.0 (pI 5.8)
17	Aldehit-alkol dehidrogenaz	96.0 (pI 5.3)

* Mascot sonucu – $10 \times \log (P)$ şeklinde hesaplanmıştır. P , belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.



Şekil 4.10 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *Ochrobactrum* sp.'den izole edilen toplam zar proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm içeren ortam

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin toplam zar kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2 *Ochrobactrum* sp.’nin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen toplam zar proteinlerinin tanımlanmaları

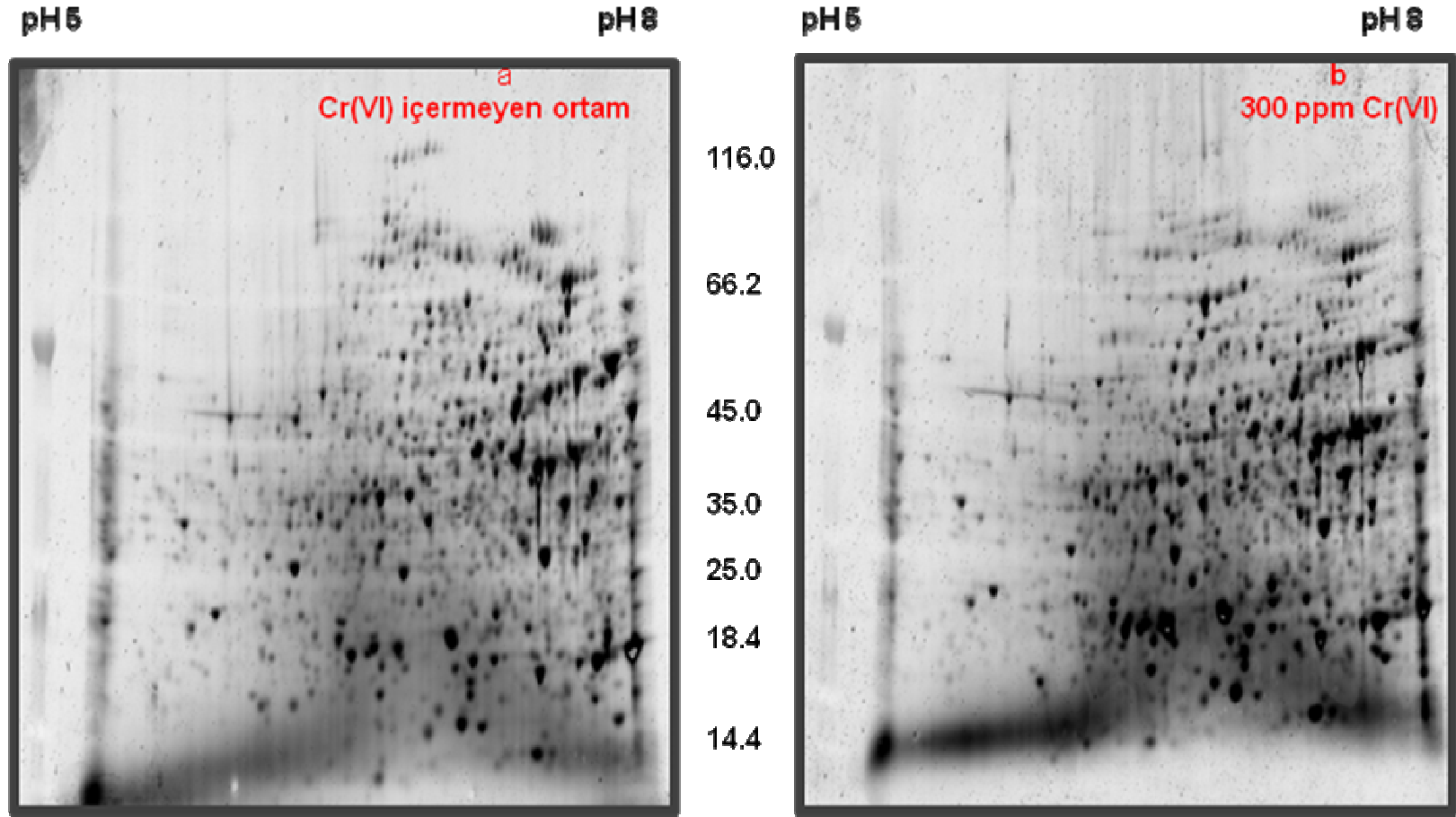
Protein no	Proteinin adı	NCBI no	Mascot sonucu*	Nadir sekans	Teorik MW (kDa)
Zar kısım					
1	ATP sintaz alt ünite D	gi 17986532	187	3	19.6
2	50S ribozomal protein L25	gi 17986764	266	5	25.1
3	Elektron transfer flavoprotein-beta-alt ünite	gi 17986380	180	5	26.4
4	ATP sintaz alt ünite A	gi 17986533	264	7	54.9
5	Şaperonin GroEL	gi 114800428	186	4	57.8
6	30S ribozomal protein S1	gi 17988198	827	25	63.6
7	Dış zar proteini	gi 17987113	229	8	85.9

* Mascot sonucu – $10 \times \log (P)$ şeklinde hesaplanmıştır. P , belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.

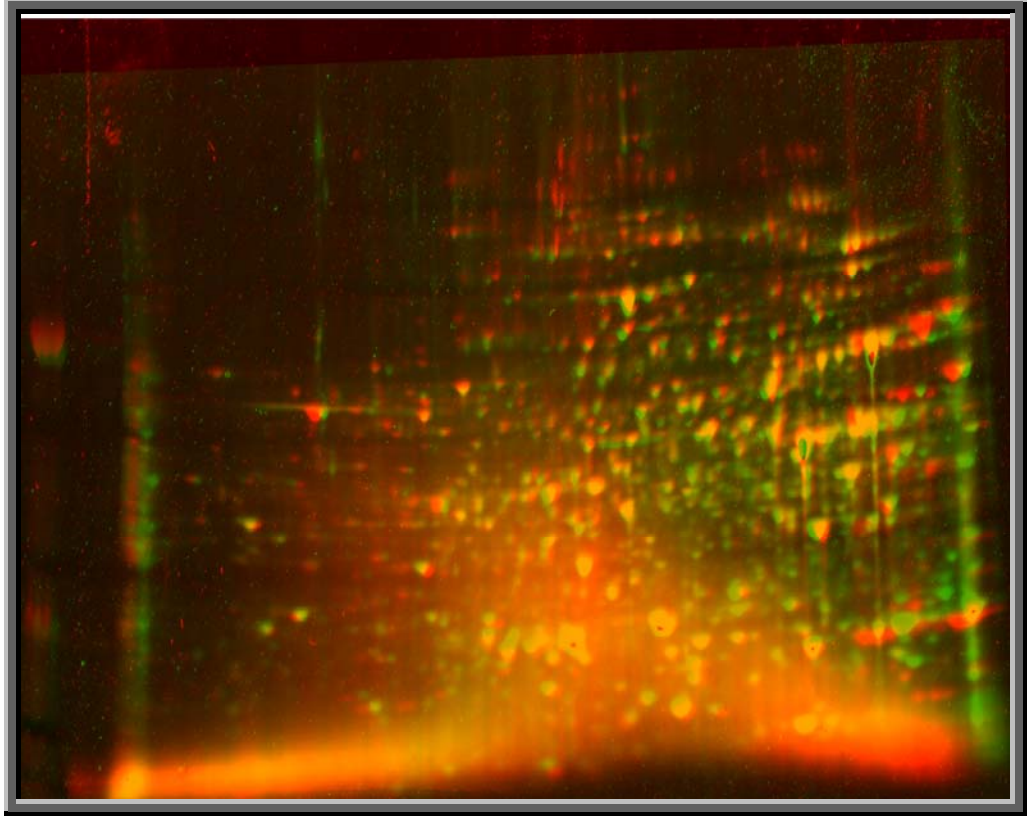
4.3.2 *P. aeruginosa* ile 2D jel elektroforezi çalışmaları

P. aeruginosa'nın yüksek konsantrasyonda ağır metale maruz bırakıldığında ürettiği proteinler ile Cr(VI) içermeyen ortamda ürettiği proteinler karşılaştırıldığında, bu proteinlerin bazılarının kirlenici içeren ortamda yeni olarak sentezlendiği bazılarının da bu ortamda sentezlenmesinin arttığı görülmüştür. Öncelikle izoelektrik noktalarına (IEF) daha sonra da molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler şekil 4.11'de (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir. Sitozol proteinlerinin jelleri üst üste çakıştırılarak bu jellerin karşılaştırılması yapılmıştır (Şekil 4.12). Sitozol proteinlerinin jellerinden kütle spektrofotometri analizi yapılan noktalar ise şekil 4.13'te gösterilmiştir. Toplam zar proteinleri ise şekil 4.14'te (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir.

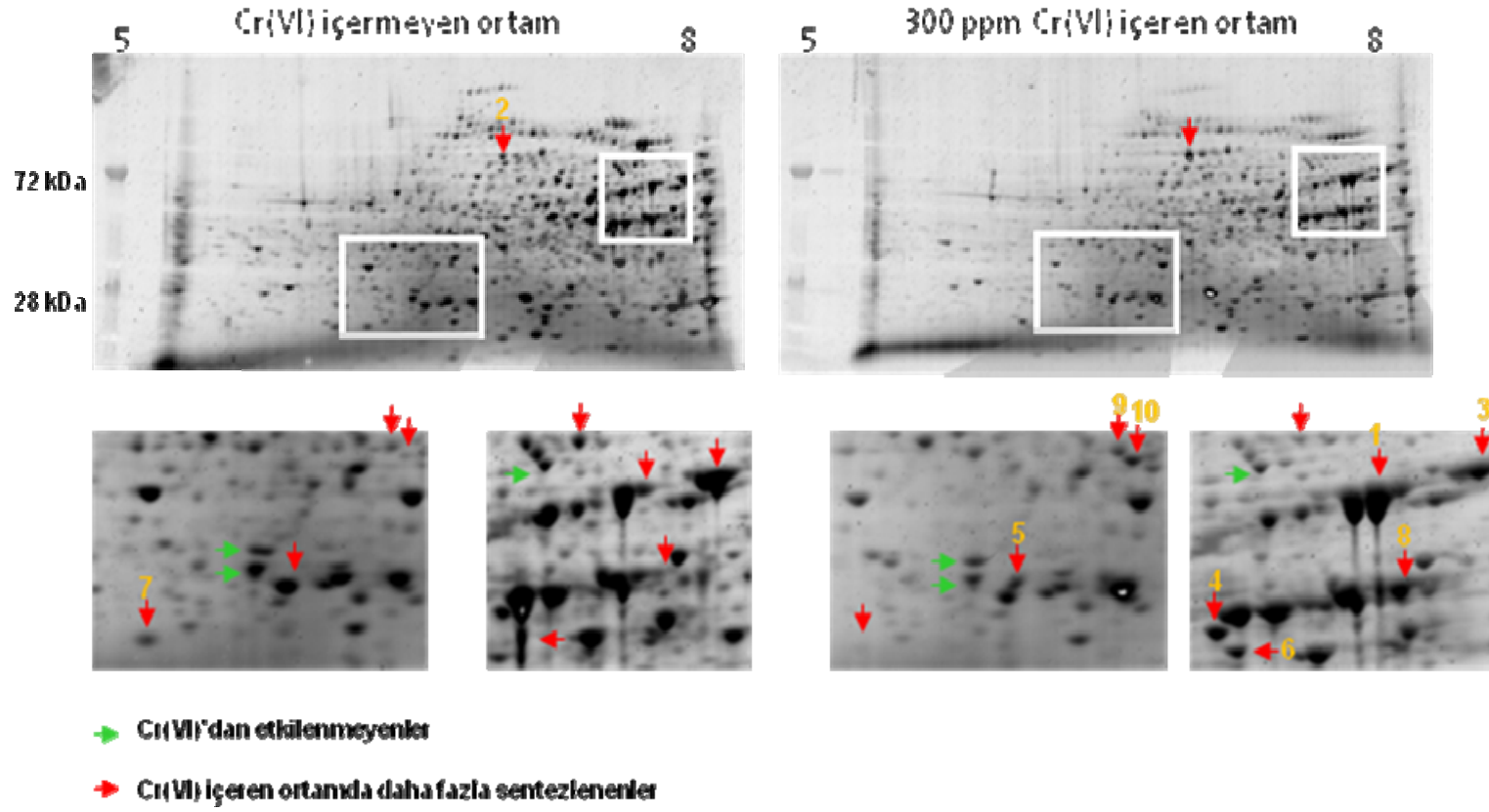
Jeller incelendiğinde 34 adet proteinin farklı olarak sentezlendiği tespit edilmiştir. Bunlardan 10 tanesi sitozolden, 24 tanesi ise zardan izole edilmiştir. İzole edilen bütün proteinlerin ancak 22 tanesi kütle spektrofotometrisinde belirlenebilmiştir. Tanımlanan proteinlerden 10 tanesi sitozol ve 12 tanesi ise toplam zar proteinleridir.



Şekil 4.11 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *P. aeruginosa*'dan izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm içeren ortam



Şekil 4.12 *P. aeruginosa* Cr(VI) stresine maruz kaldığında farklı olarak sentezlenen sitozol proteinleri (kırmızı noktalar: Cr(VI) içermeyen ortamdaki proteinler; yeşil nokta: Cr(VI) içeren ortamdaki proteinler)



Şekil 4.13 *P. aeruginosa* Cr(VI) stresine maruz kaldığında farklı olarak sentezlenen sitozol proteinleri ve kütle spektrofotometri ile tanımlanan proteinler

Bakterinin sitozol kısmına ait proteinler, şaperon GroEL (nokta 1), izositrat dehidrogenaz (nokta 2), 30S ribozomal protein S1 (nokta 3), uzama faktör Tu (nokta 4), glutatyon S-transferaz (nokta 5), ATP sintaz beta alt ünitesi (nokta 6), 30S ribozomal protein S1 (nokta 7), malat dehidrogenaz (nokta 8), fruktoz-1,6-bisfosfataz (nokta 9) ve glutatyon sentetaz (nokta 10) ile homoloji göstermiştir. Stres ortamında, bu proteinlerden izositrat dehidrogenaz (nokta 2) ve 30S ribozomal protein S1 (nokta 7) sentezi azalırken diğerlerinin sentezi artmıştır.

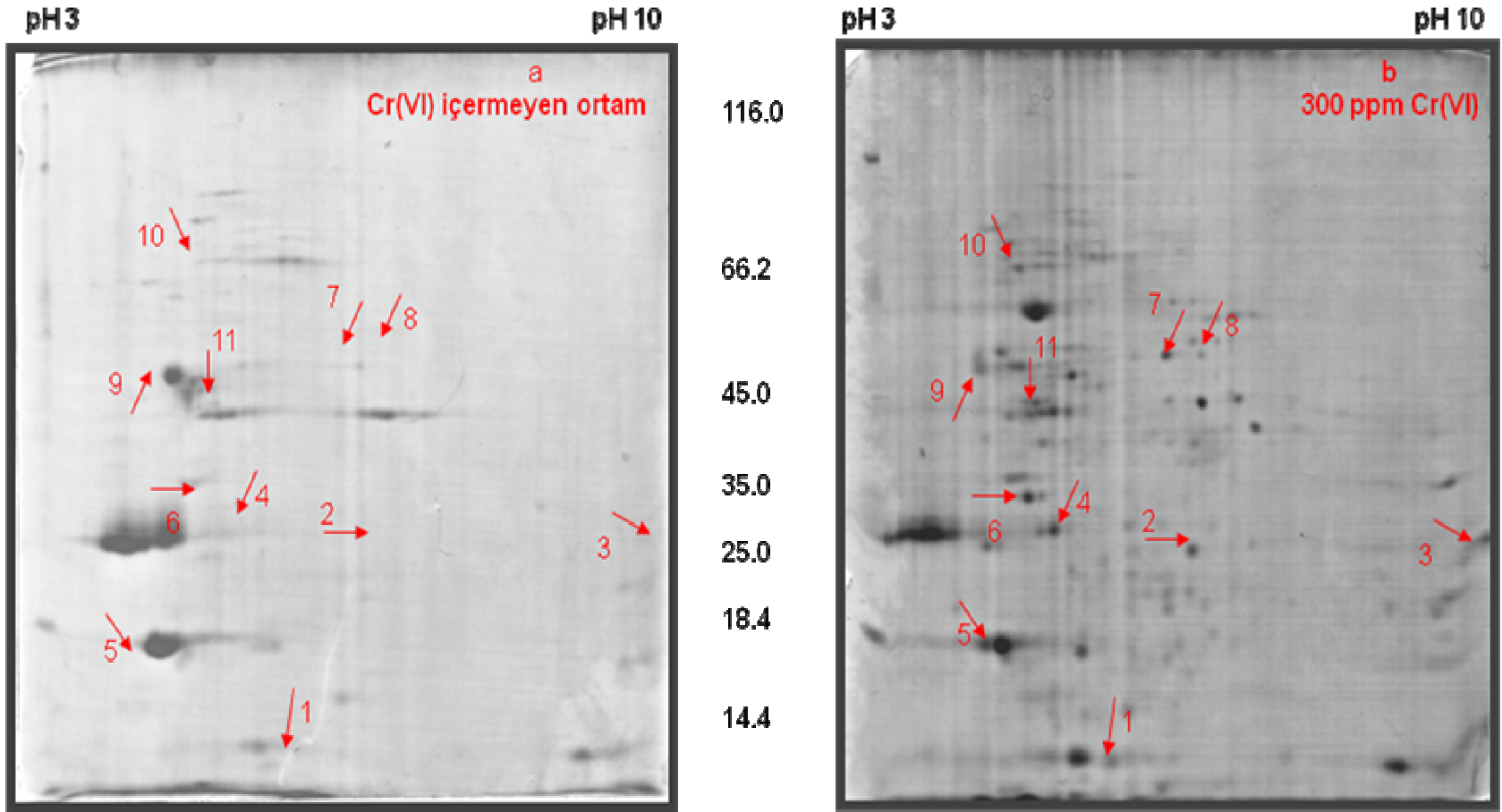
Toplam zar kısmına ait proteinler ise stres proteini (nokta 1), dış zar proteini ve peptidoglikanla ilgili lipoproteinler (nokta 2), 50S ribozomal protein L1 (nokta 3), elektron transfer flavoprotein alfa alt ünitesi (nokta 4 ve 6), dış zar proteini OprG öncüsü (nokta 5), LPS biyosentez proteini (nokta 7), inozin-5-monofosfat dehidrogenaz (nokta 8), yapısal dış zar porin OprF öncüsü (nokta 9), 30S ribozomal protein S1 (nokta 10), serin proteaz MucD öncüsü (nokta 11) ile homoloji göstermiştir.

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin sitozol kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.3 *P. aeruginosa*'nın 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerinin tanımlanmaları

Protein no	Proteinin adı	NCBI no	Mascot sonucu*	Nadir sekans	Teorik MW (kDa)
Sitozol kısım					
1	Şaperon GroEL	gi 146308703	1975	14	56.7
2	İzositrat dehidrogenaz	gi 84320592	3299	31	81.6
3	30S ribozomal protein S1	gi 15598358	2665	31	61.8
4	Uzama faktör Tu	gi 15599461	545	9	43.3
5	Glutasyon S-transferaz	gi 84321856	1053	13	25.5
6	ATP sintaz beta alt ünitesi	gi 15600747	387	8	49.5
7	30S ribozomal protein S1	gi 15598358	112	2	61.8
8	Malat dehidrogenaz	gi 146305577	588	10	45.4
9	Fruktoz-1,6-bisfosfataz	gi 15600303	1167	20	37.2
10	Glutasyon sentetaz	gi 15595604	183	5	35.6

* Mascot sonucu – $10 \times \log (P)$ şeklinde hesaplanmıştır. *P*, belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.



Şekil 4.14 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *P. aeruginosa*'dan izole edilen toplam zar proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm Cr(VI) içeren ortam

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin zar kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri Çizelge 4.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4 *P. aeruginosa*’nın 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen toplam zar proteinlerinin tanımlanmaları

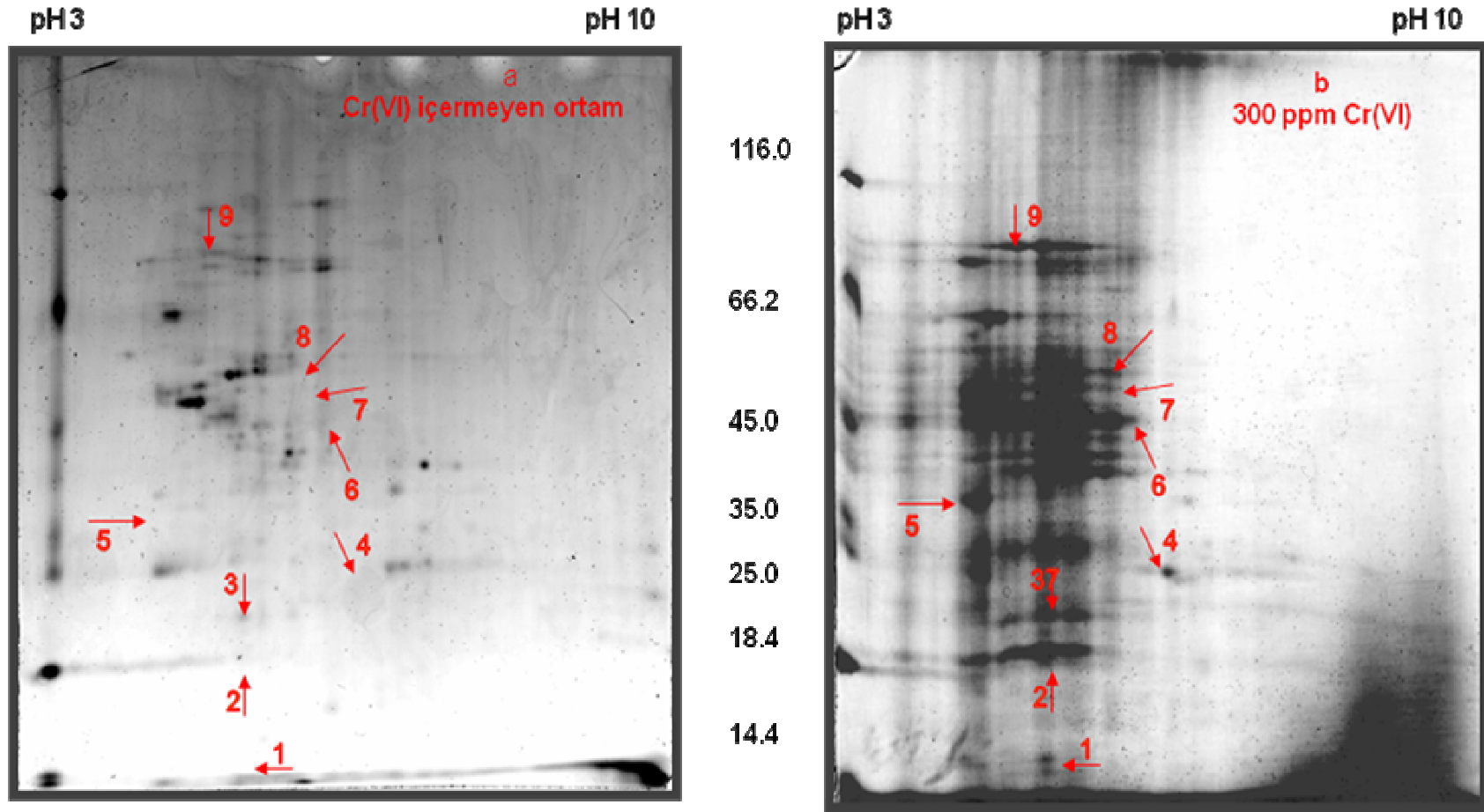
Protein no	Proteinin adı	NCBI no	Mascot sonucu*	Nadir sekans	Teorik MW (kDa)
Zar kısım					
1	Stres proteini	gi 78061126	101	1	21.3
2	Dış zar proteini ve peptidoglikanla ilgili lipoproteinler	gi 47574971	52	1	19.0
3	50S ribozomal protein L1	gi 15599469	383	9	24.2
4	Elektron transfer flavoprotein alfa alt ünitesi	gi 16124979	62	2	31.7
5	Dış zar proteini OprG öncüsü	gi 15599262	180	1	25.2
6	Elektron transfer flavoprotein alfa alt ünitesi	gi 15598147	198	4	31.4
7	LPS biyosentez proteini	gi 15600189	86	2	50.4
8	İnozin-5-monofosfat dehidrogenaz	gi 88706902	82	2	52.1
9	Yapısal dış zar porin OprF öncüsü	gi 15596974	53	1	37.9
10	30S ribozomal protein S1	gi 15598358	268	5	61.9
11	Serin proteaz MucD öncüsü	gi 15595963	149	2	50.3

* Mascot sonucu – $10 \times \log(P)$ şeklinde hesaplanmıştır. *P*, belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.

4.3.3 *B. thuringiensis* ile 2D jel elektroforezi çalışmaları

Çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* bakterisinin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda ürettiği proteinler ile Cr(VI) içermeyen ortamda ürettiği proteinler karşılaştırıldığında, bu proteinlerin bazılarının kirletici içeren ortamda yeni olarak sentezlendiği bazılarının da bu ortamda sentezlenmesinin arttığı görülmüştür. Öncelikle izoelektrik noktalarına (IEF) daha sonra da molekül ağırlıklarına göre ayrılan *B. thuringiensis*'in sitozol proteinleri şekil 4.15 (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir.

Jeller incelendiğinde *B. thuringiensis* için 16 adet proteinin ağır metal içeren ortamda farklı olarak sentezlendiği görülmüştür. Bu proteinlerden de 9 tanesi ile kütle spektrofotometrisinden sonuç alınmıştır. *B. thuringiensis*'in sitozol kısım ile ilgili 9 adet protein, ribozomal protein L10 (nokta 1), transaldolaz (nokta 2), 50S ribozomal protein L1 (nokta 3), peptidilprolil izomeraz (nokta 4), pürivat dehidrogenaz kompleks E1 komponent beta alt ünitesi (nokta 5), uzama faktör Tu (nokta 6 ve 8), alanin dehidrogenaz (nokta 7), yüzey tabaka proteini (nokta 9) ile homoloji göstermiştir.



Şekil 4.15 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *B. thuringiensis*'den izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm içeren ortam

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin sitozol kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri çizelge 4.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5 *B. thuringiensis*’in 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerin tanımlanmaları

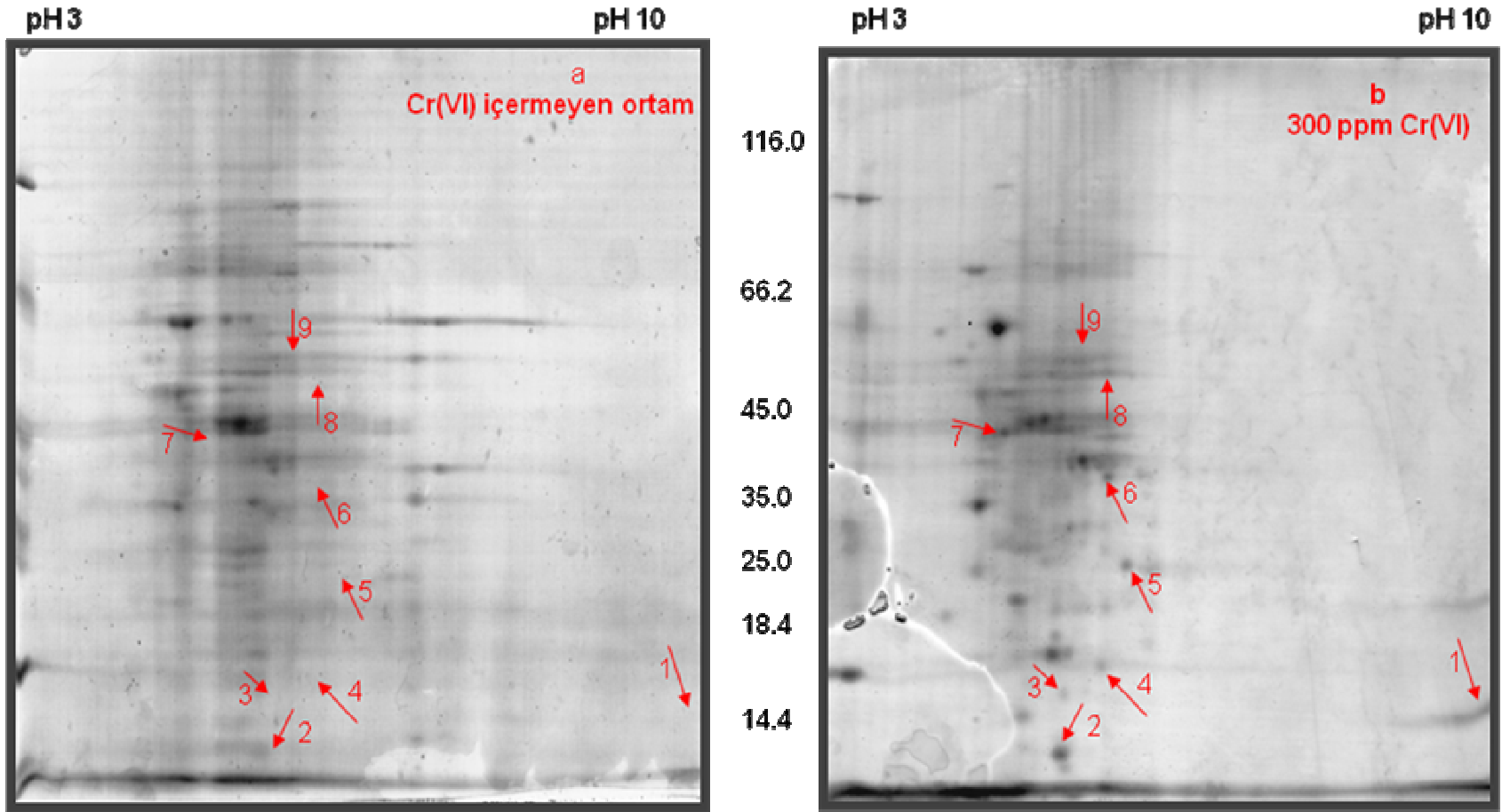
Protein no	Proteinin adı	NCBI no	Mascot sonucu*	Nadir sekans	Teorik MW (kDa)
Sitozol kısım					
1	Ribozomal protein L10	gi 89209102	254	4	18.0
2	Transaldolaz	gi 15616347	63	2	23.0
3	50S ribozomal protein L1	gi 30260289	117	2	24.5
4	Peptidilprolil izomeraz	gi 49480150	572	13	32.5
5	Pürivat dehidrogenaz kompleks E1 komponent beta alt ünitesi	gi 30264043	456	4	35.2
6	Uzama faktör Tu	gi 30018378	181	4	43.0
7	Alanin dehidrogenaz	gi 30022698	379	3	40.1
8	Uzama faktör Tu	gi 6015080	121	1	43.3
9	Yüzey tabaka proteini	gi 6580205	124	4	87.2

* Mascot sonucu – $10 \times \log (P)$ şeklinde hesaplanmıştır. P , belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.

4.3.4 *B. cereus* ile 2D jel elektroforezi çalışmaları

B. cereus bakterisinin 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda ürettiği proteinler ile Cr(VI) içermeyen ortamda ürettiği proteinler Şekil 4.16 (a-Cr(VI) içermeyen ve b-300 ppm Cr(VI) içeren ortam) gösterilmiştir.

B. cereus için ise 18 adet proteinin farklı olarak sentezlendiği tespit edilmiştir. Bunlar içinden de ancak 9 tanesi kütle spektrofotometrisinde tanımlanmıştır. *B. cereus*'un sitozol kısmı ile ilgili 9 adet protein, 50S ribozomal protein L5 (nokta 1), 50S ribozomal protein L10 (nokta 2), hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (nokta 3), transaldolaz (nokta 4), peptidilprolil izomeraz (nokta 5), bütirat kinaz (nokta 6), uzama faktör Tu (nokta 7), ATP sintaz alt ünite A (nokta 8), ATP sintaz alt ünite B (nokta 9) ile homoloji göstermiştir.



Şekil 4.16 Krom(VI) içermeyen ve 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilmiş *B. cereus*'dan izole edilen sitozol proteinlerinin 2D profilleri (a) Cr(VI) içermeyen ortam, (b) 300 ppm içeren ortam

Jeller karşılaştırıldığında bakterinin sitozol kısmı ile ilgili farklı olarak sentezlenen proteinlerin isimleri ve bazı özellikleri çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.6 *B. cereus*'un 300 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirildiğinde elde edilen sitozol proteinlerin tanımlanmaları

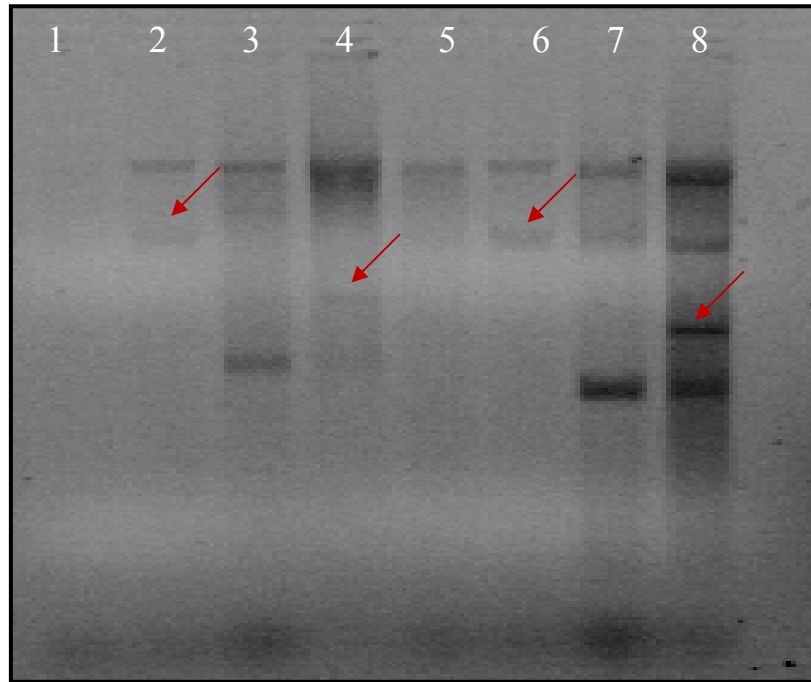
Protein no	Proteinin adı	NCBI no	Mascot sonucu*	Nadir sekans	Teorik MW (kDa)
Sitozol kısım					
1	50S ribozomal protein L5	gi 42779203	167	3	20.1
2	50S ribozomal protein L10	gi 30018369	376	7	18.0
3	Hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz	gi 30018335	154	3	20.3
4	Transaldolaz	gi 30018847	85	3	23.2
5	Peptidilprolil izomeraz	gi 30019198	510	8	32.5
6	Bütirat kinaz	gi 30022245	126	2	41.0
7	Uzama faktör Tu	gi 30018378	265	4	43.0
8	ATP sintaz alt ünite A	gi 30023339	224	6	55.1
9	ATP sintaz alt ünite B	gi 30023337	146	3	51.0

* Mascot sonucu – $10 \times \log(P)$ şeklinde hesaplanmıştır. P , belirlenen eşleşmenin rastgele olduğu durumdaki olasılıktır.

B. thuringiensis ve *B. cereus* bakterileri ile yapılan çalışmada, Cr(VI) içeren ortamda geliştirilen bakterilerin toplam zar proteinleri incelendiğinde stres ortamında farklı olarak sentezlenen proteinlere rastlanmamıştır.

4.3.5 Krom(VI) ağır metaline dirençli bakterilerin plazmidlerinin belirlenmesi

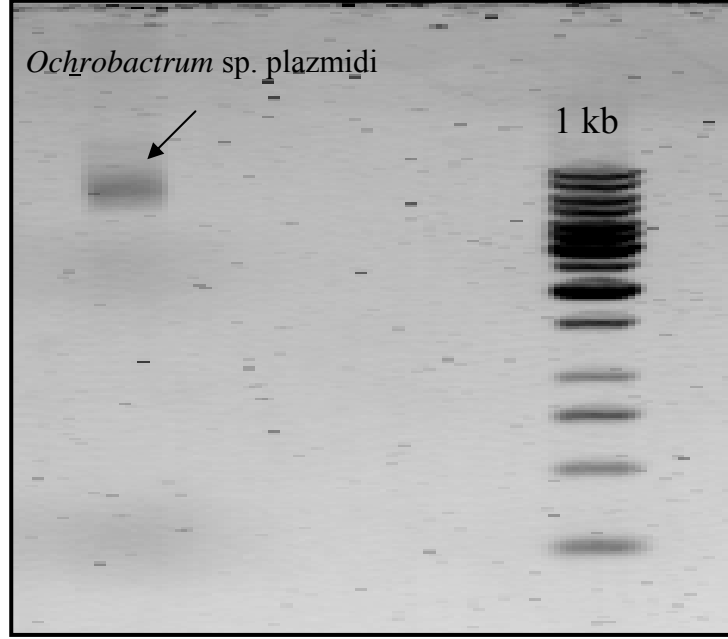
Mikroorganizmalarda bulunan ağır metal direnç mekanizmaları proteinler aracılığı ile olmaktadır. Bu proteinler çeşitli mikroorganizmalarda plazmidler üzerinden de kodlanabilmektedir. Yapılan denemelerde, 50 ppm Cr(VI) içeren besiyerinde geliştirilen *Ochrobactrum* sp., *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* bakterilerinin yalnızca Cr(VI) içeren ortamda sahip oldukları plazmidler belirlenmiştir. Her bakterinin Cr(VI) içeren ortamda bir plazmide sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.17). *E.coli* DH5a tek başına Cr(VI) içeren ortamda gelişmemiştir.



Şekil 4.17 Krom(VI) içermeyen ve 50 ppm Cr(VI) içeren ortamda geliştirilen bakterilerden izole edilen plazmidler

- | | |
|---|---|
| 1: <i>P.aeruginosa</i> (Cr(VI) içermeyen ortam) | 5: <i>Ochrobactrum</i> sp. (Cr(VI) içermeyen ortam) |
| 2: <i>P.aeruginosa</i> (50 ppm Cr(VI) içeren ortam) | 6: <i>Ochrobactrum</i> sp. (50 ppm Cr(VI) içeren ortam) |
| 3: <i>B. cereus</i> (Cr(VI) içermeyen ortam) | 7: <i>B.thuringiensis</i> (Cr(VI) içermeyen ortam) |
| 4: <i>B. cereus</i> (50 ppm Cr(VI) içeren ortam) | 8: <i>B.thuringiensis</i> (50 ppm Cr(VI) içeren ortam) |

Bu plazmidlerin Cr(VI) direncinden sorumlu olup olmadıklarını anlamak için plazmidler, *E. coli* DH5 α bakterisine aktarılmıştır. Her transformant yaklaşık 50 ppm Cr(VI) içeren nutrient agarda geliştirildiğinde, yalnızca *Ochrobactrum* sp.'den izole edilen plazmidin aktarıldığı *E.coli* bu besiyerinde gelişmiştir. Krom(VI) içeren ortamda gelişen transformattan plazmid tekrar izole edilmiştir (OD₂₆₀: 40.6 ng/ μ l) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *E.coli*'den tekrar izole edilen *Ochrobactrum* sp.'ye ait plazmid

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinler aracılığı ile mikrobiyel ağır metal direnç sistemlerinin açıklanmasında, ağır metal içeren ortamlarda gelişen mikroorganizmalardan izole edilen proteinlerin tanımlanmaları çok büyük önem taşımaktadır. Krom(VI)'ya karşı mikrobiyel direnç sistemlerinin araştırıldığı tez çalışmasında, *Ochrobactrum* sp., *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* mikroorganizmalarının, bu kirleticinin bulunduğu ortamda ürettikleri proteinler tanımlanarak, bu proteinlerin Cr(VI) direnç mekanizmalarıyla ilişkisi belirlenmiştir.

5.1 *Ochrobactrum* sp. için Cr(VI) Giderim Mekanizması

Sadece Cr(VI) içeren ortamlarda *Ochrobactrum* sp. tarafından üretilen proteinler işlevlerine göre 5 grupta toplanmaktadır:

- a) Stres proteinleri (Moleküler şaperonlar)
- b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (Uzama faktör G, 50S ribozomal protein, 30S ribozomal protein S1 ve 50S ribozomal protein L25)
- c) Taşıyıcı proteinler
- d) Enerji üretiminde görevli proteinler (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, trioz fosfat izomeraz, transketolaz, ATP sintaz, flavoprotein)
- e) Dış zar proteinleri

a) Stres proteinleri (Moleküler şaperonlar): Moleküler şaperonlar veya şaperoninler olarak bilinen bu proteinler, yüksek derecede korunmuş ve prokaryotlardan ökaryotlara kadar olan canlılarda sıklıkla rastlanan büyük bir protein ailesidir (Tosukhowong *et al.* 2005). Moleküler şaperonlar, henüz olgunlaşmamış proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olup, aynı zamanda denatüre olmuş proteinlerin yeniden katlanmalarını da sağlayabilmektedir. Bu proteinlerin başka bir işlevi de mikroorganizmalar için istenmeyen koşullarda hücre dengesini (homeostasis) sağlayabilen stres proteinleri olmalarıdır.

Örneğin, NaCl, H₂O₂, ısı, alkol, safra tuzları gibi kimyasallara ve pH değişimlerine maruz kalan *Enterococcus faecalis* bakterisinde DnaK ve GroEL gibi genel stres proteinlerinin indüklendiği görülmüştür (Rince *et al.* 2000). Stres koşullarında moleküler şaperonların *E. coli* ve *Tetragenococcus halophila* gibi mikroorganizmalarda indüklendiği görülmüştür (Battistoni *et al.* 1993, Tosukhowong *et al.* 2005).

Yapılan çalışmada da moleküler şaperonların yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortamda sentezinin artması *Ochrobactrum* sp. bakterisinin bu kirleticiye karşı verdiği cevap olarak düşünülmektedir. Krom(VI) hücre zarından kolaylıkla geçebilen bir element olduğundan, hücre içine rahatça girip herhangi bir bileşene de rahatlıkla bağlanabilmektedir. Bu özelliği ile Cr(VI) hücrede sentezlenen proteinlere bağlanıp yapılarını bozabilmektedir. Yapısı bozulan veya denatüre olan bir proteinin yeniden ve doğru bir şekilde katlanmasını sağlamak da moleküler şaperonlarla mümkün olabilmektedir. Moleküler şaperonların katlanmadan sorumlu oluşları kadar, proteinlerin hücrenin zar kısmına taşınmasında da kullanıldığı bilinmektedir (http://en.wikipedia.org/wiki/heat_shock_protein, 2008). Bu nedenle Cr(VI) gibi bir ağır metale maruz bırakılan *Ochrobactrum* sp. bu metalin proteinlerini denatüre etmesi nedeniyle proteinlerinin yeniden katlanıp doğru işlev yapmasını sağlamak amacıyla daha fazla moleküler şaperon üretmiştir. Çalışmada, moleküler şaperonların hem sitozol hem de toplam zar kısmında görülmeleri denatüre olmuş proteinlerin doğru katlanmalarının yapıldığını bir yandan da proteinlerin zar da gerekli yerlere taşındığını göstermektedir.

b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (Uzama faktör G, 50S ribozomal protein, 30S ribozomal protein S1 ve 50S ribozomal protein L25): *Ochrobactrum* sp. yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortama bazı proteinlerinin sentezini artırarak veya yeni proteinler sentezleyerek adapte olmaktadır. Böylece, ağır metale maruz bırakılan bakterinin protein biyosentezinde genel olarak bir artış olmaktadır. Bu nedenle, protein biyosentezinden çok yakından sorumlu ribozomal proteinlere stres ortamında daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Protein sentezinin translasyon aşamasında görevli olan ribozom, prokaryotlarda 70S büyüklüğünde, 50S ve 30S olmak üzere iki alt birime sahip bir molekülüstü bileşiktir. Küçük alt birim (30S) yaklaşık 22 farklı proteini içerirken (S1-S22), büyük alt birim (50S) yaklaşık 34 farklı proteini (L1-L34) barındırmaktadır. Bu alt birimlerden yalnızca S1, 61.2 kDa ağırlığında, diğer alt birimler ise 4.4 kDa ve 29.7 kDa arasında değişen ağırlıklara sahiptir (Voet and Voet 1995; http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_protein, 2008).

Çalışmada bakterinin sitozol kısmında 50S ribozomal protein (20.0 kDa) ve toplam zar kısmında ise 50S ribozomal protein L25 (25.1 kDa) ve 30S ribozomal protein S1 (63.6 kDa) proteinlerinin daha fazla sentezlendiği bulunmuştur. Ribozom, protein sentezi sırasında bakterinin sitoplazmik zarına oldukça yakın durduğundan ribozomal proteinlerinin mikroorganizmanın her iki kısmında görülmesi beklenmektedir. Bu nedenle, bakterinin hem sitozol hem de toplam zar proteinleri kısımlarında artan protein ihtiyacını karşılamak üzere protein sentezi ile ilgili ribozomal proteinlerin yapımını artırması olası sonuçlardan birisidir.

c) Taşıyıcı proteinler: Taşıyıcı proteinler bütün canlı türlerinde sayısız miktarda bulunabilen ve zardan hücre içine veya dışına çeşitli molekülleri taşıyan proteinlerdir. Ağır metaller ise hücre içine veya dışına enerji harcanarak çeşitli taşıyıcı proteinlerle taşınabilmektedirler. Metallerin bu şekilde aktif olarak taşınmalarına akış sistemi (efflux system) adı da verilmektedir. Besin yoluyla hücre içine giren metaller, hücre dışına, hızlı bir şekilde bu akış sistemi ile atılabilmektedir (Bruins *et al.* 2000). Taşıyıcı proteinler ağır metali hücre dışına atarken proton itirme gücü ve ATP gibi enerji kaynaklarına ihtiyaç duymaktadırlar (Nies 2003). Demir(II), Mn(II), Zn(II), Cu(II), As(III) ve Cd(II) gibi metaller *Saccharomyces cerevisiae*'de böyle proteinler tarafından taşınmaktadır (Diffels *et al.* 2006). Bakır(II) ve Ag(I) gibi ağır metaller ise *P. putida*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus mutans* ve *E. coli* gibi mikroorganizmalarda taşıyıcı proteinler ile aktif olarak hücre dışına taşınmaktadır (Nies 2003). *P. aeruginosa* bakterisinde Cr(VI)'yı enerji harcayarak hücre dışına taşıyan ChrA isimli bir taşıyıcı protein bulunmaktadır (Jimenez-Mejia *et al.* 2006).

Yapılan çalışmada da *Ochrobactrum* sp., metal stresinden kurtulmaya yardımcı olan taşıyıcı proteinleri yüksek konsantrasyonda Cr(VI) varlığında daha fazla sentezlemiştir.

Bu tip proteinlerin sentezinin ağır metal içeren ortamda bakteri tarafından daha fazla sentezlenmesi, hücre zarından kolayca geçen Cr(VI) ağır metalini mikroorganizmanın taşıyıcı proteinler aracılığı ile hücre dışına pompalayıp ağır metalin kendi proteinlerine zarar vermesini önlemeye çalıştığını göstermektedir.

d) Enerji üretiminde görevli proteinler (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, trioz fosfat izomeraz, transketolaz, ATP sintaz, flavoprotein) Çalışmada, kromlu ortamda kromsuz ortama göre gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), trioz fosfat izomeraz, ATP sintaz ve flavoproteinlerin daha fazla sentezlendiği tespit edilmiştir. GAPDH enzimi glikolizin altıncı basamağını katalizleyen ve dolayısıyla glukozdan enerji elde etmeyi sağlayan bir enzimdir. Bununla birlikte GAPDH metabolik olaylar dışında transkripsiyon aktivasyonunda da görev almaktadır (Voet and Voet 1995). Trioz fosfat izomeraz enzimi, glikoliz yolundan enerji üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bu enzim, tersinir olarak dihidroksiaseton fosfattan D-gliseraldehit-3-fosfat dönüşümünü katalizlemektedir (Voet and Voet 1995). Transketolaz enzimi ise pentoz fosfat yolunda iş gören önemli bir enzimdir. Enerji üretiminden sorumlu ATP sintaz ve flavoprotein (Madigan *et al.* 2003) gibi proteinlerin de stres ortamında daha fazla sentezlenmesi bakterinin artan protein sentezini karşılamak üzere daha fazla enerjiye ihtiyacı olduğunu göstermektedir.

e) Dış zar proteinleri: Yapılan çalışma, dış zar proteinlerinin stres koşullarında stres oluşturulmamış ortama göre daha fazla sentezlediğini göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalar, ağır metallerin öncelikle hücre yüzeyine tutunduğunu göstermiştir (Valls *et al.* 2000, Wang *et al.* 2004).

Gram-negatif bakterilerin anyonik lipopolisakkaritleri, fosfolipidleri içeren dış zarları ve peptidoglikan yapıları ağır metallerin bağlanabileceği anahtar yapıları oluşturmaktadır. Dış zarın büyük bir kısmını oluşturan lipopolisakkarit tabakası metal iyonları ile kelat bir yapı oluşturabilmektedir.

Wang *et al.* (2004), ağır metale maruz bırakılan bakterilerin dış zarlarının ve buna bağlı olarak da bu zara ait bileşenlerinin metali bağlamak ve ortamdan uzaklaştırmak için arttığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmada ortamdaki yüksek konsantrasyonda ağır metal varlığında *Ochrobactrum* sp. bakterisinin dış zar proteinlerinin artması Cr(VI) ağır metalini hücre yüzeyinde tutmak ve hücre içine girmesini engellemek amacıyla yapıldığını düşündürmektedir. Bakteri ağır metalin hücre içine girmesini önleyip hücre dışındaki yapılarında tutarak canlılığını devam ettirmek amacıyla böyle bir savunma mekanizması geliştirmiştir.

Çalışma sonucunda *Ochrobactrum* sp. bakterisi, hücre içine giren toksik metali taşıyıcı proteinler aracılığı ile enerji harcıyarak hücre dışına atmaktadır. Bu nedenle bakterinin enerji ihtiyacı oldukça arttığından, enerji üretimi ile proteinlerin yapımı da artmıştır. *Ochrobactrum* sp. bakterisi, metalin taşınması için gerekli olan hücrenin dış kısmındaki bölgeleri olan Cr(VI) ağır metalini bağlayıcı proteinleri de içermektedir.

Krom(VI) direncinin biyobirikim çalışmalarıyla ilişkisi incelendiğinde, bakterinin Cr(VI) biyobirikimi yapmadığı, fakat ağır metal içeren ortamda geliştiği görülmüştür. Besiyerine uygulanan Cr(VI) konsantrasyonun inkübasyon süresi boyunca yaklaşık olarak aynı kaldığından bakterinin ağır metali hücre dışına attığı kesinlik kazanmıştır.

5.2 *P. aeruginosa* için Cr(VI) Giderim Mekanizması

Stres koşullarında ve stres oluşturulmamış ortamlarda *P.aeruginosa* tarafından üretilen proteinler karşılaştırıldığında sadece Cr(VI) stresinde bakterinin ürettiği proteinler işlevlerine göre başlıca 6 grup altında incelenmiştir:

- a) Stres proteinleri (Moleküler şaperonlar)
- b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (30S ribozomal protein S1, 50S ribozomal protein L1, inozin-5-monofosfat dehidrogenaz ve uzama faktör Tu)

- c) Enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, flavoprotein, malat dehidrogenaz ve fruktoz-1,6-bisfosfataz)
- d) Serbest radikal oluşumunu önleyen proteinler (Glutasyon-S-transferaz ve GSH sentetaz)
- e) Dış zar proteinleri
- f) Serin proteaz (MucD)

a) Stres proteinleri (moleküler şaperonlar): *Ochrobactrum* sp. gibi *P. aeruginosa* bakterisinde de Cr(VI) stresine karşı cevabı moleküler şaperonların sentezini artırarak olmuştur. Moleküler şaperonların bu şekilde daha fazla sentezlenmesi bu bakterinin de stres koşullarında denatüre olmuş proteinlerini yeniden ve doğru bir şekilde katlanması için çalıştığını göstermektedir. Bu yolla bakteri proteinlerinin bozulmasını önleyip, tüm hücre işlevlerini sağlıklı bir şekilde yerine getirmiş ve canlılığını devam ettirmiş olacaktır.

b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (30S ribozomal protein S1, 50S ribozomal protein L1, inozin-5-monofosfat (IMP) dehidrogenaz, uzama faktör Tu): İstenmeyen stres koşullarında *P. aeruginosa* bakterisinin kendini savunması için protein sentezinde belirgin bir artış olmaktadır. Aynı sonuç *Ochrobactrum* sp. için de gözlemlenmiştir. Bu nedenle, protein biyosentezinden çok yakından sorumlu 30S ribozomal protein, 50S ribozomal protein ve uzama faktör Tu gibi proteinlere stres ortamında daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır ve çalışmada da bu proteinlerin daha fazla sentezlendiği görülmüştür.

IMP dehidrogenaz enzimi de pürin nükleotidlerin biyosentezinde inozin monofosfattan, ksantozin monofosfat (XMP) oluşumunu katalizleyen bir enzimdir. Bu reaksiyon XMP molekülünün guanozinmonofosfat sintaz enzimi ile guanozinmonofosfata (GMP) dönüştürülmesiyle devam etmektedir (Voet and Voet 1995). Yapılan deneylerde, protein sentezindeki artışı karşılamak üzere daha fazla protein üretilmesi için nükleotidlere de aynı oranda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle pürin nükleotidlerin yapımında görev alan IMP dehidrogenaz enziminin de stres koşullarında fazla miktarda yapılması olası sonuçlardan biridir.

c) Enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, flavoprotein, malat dehidrogenaz, fruktoz-1,6-bisfosfataz): *P. aeruginosa*'nın yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortamda ATP sintaz ve flavoprotein gibi ATP üretmekten sorumlu proteinleri daha fazla sentezlemesi bu mikroorganizmanın da *Ochrobactrum* sp. bakterisine benzer şekilde, daha fazla protein sentezlemek için enerji ihtiyacının artması ile ilişkilidir. *P. aeruginosa* bakterisi stres içeren ortamda artan enerji ihtiyacını krebs döngüsünden de karşılamaya çalışmıştır. Bu durum, bakterinin ağır metal içeren ortamda malat dehidrogenaz enziminin yapımını artırmasından kaynaklanmaktadır. Malat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon malatın oksitlenip oksaloasetat oluşumunu sağlamaktır. Bu reaksiyon sonucu, 1 NADH molekülü de ortaya çıkmaktadır. (Voet and Voet 1995). Fruktoz-1,6-bisfosfataz (FBPaz) enzimi de stres koşullarında bakteri tarafından daha fazla sentezlenmiştir. FBPaz, glukoneojenezde (öncüsü glukoz olmayan moleküllerden glukoz üretimi) fruktoz-1,6-bisfosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşümünü katalizlemektedir. Ayrıca bu enzim glukoneojenezin ne kadar yapılacağı konusunda anahtar rolü almıştır. Glukoneojenez sonucunda da hücre enerji kazanmaktadır (Voet and Voet 1995). Çalışmada, FBPaz enziminin de ağır metal içeren ortamda sentezinin daha fazla yapımı bakterinin artan enerji ihtiyacını karşılamaya çalıştığını göstermektedir.

d) Serbest radikal oluşumunu önleyen proteinler (Glutasyon sentetaz (GSH sentetaz) ve glutasyon-S-transferaz): *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmada bakteri, Cr(VI) içeren ortamda GSH sentetaz enzimini daha fazla sentezlemiştir. Bir tripeptid olan glutasyon (GSH), peroksidaz reaksiyonlarında perokistlerin parçalanmasında oldukça yardımcı bir moleküldür. Bu görevi ile serbest radikallerden canlı organizmayı koruyarak antioksidan özellik kazanmaktadır. Glutasyonun sentezi, glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetazın ardışık çalışmaları ile glutamat, sistein ve glisinden yapılmaktadır (Voet and Voet 1995). Demir(II), Cu(II), Co(II) ve Cr(VI) gibi ağır metaller oldukça reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır (Lewinska and Bartosz 2007). Yapılan çalışmada serbest radikallerin hücreye yapacağı olumsuz etkiden kurtulmak isteyen *P. aeruginosa* bakterisinin serbest radikallerin parçalanmasında yardımcı olan glutasyonu daha fazla sentezlemesi olağan bir sonuçtur.

Bununla birlikte, *P. aeruginosa* Cr(VI) içeren ortamda glutatyon-S-transferaz enziminin üretimini de daha fazla yapmıştır. Bu enzim, hücrel detoksifikasyon ve birçok elektrophilik bileşiklerin salgılanmasında kullanılan ökaryotik ve prokaryotik kaynaklı bir dimerik enzimdir. Glutatyon-S-transferaz enzimi insan, hayvan, bitki, balık, böcek, küf, maya ve bakteri gibi organizmalardan izole edilmiştir (McGuinness *et al.* 2006). Daha önceki çalışmalarda *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* sp. ve *Streptomyces griseus* gibi mikroorganizmaların bu enzime sahip olduğu belirlenmiştir (Travensolo *et al.* 2008). Enzim, metabolizma sonucu doğal olarak oluşan toksinlerin ve reaktif oksijen türevlerinin kontrolü ile insektisid, herbisid ve mikrobiyel antibiyotikler gibi ajanlara karşı dirençte görevlidir. Enzimin dimer başına iki aktif bölgesi bulunmaktadır. Her aktif bölge, iki bağlayıcı kısma sahiptir. Birincisi, glutatyonla oldukça özel olan (G-bölgesi), ikincisi, elektrophilik substratın bağlandığı (H-bölgesi) ve toksik bileşiklerle reaksiyona giren kısımdır (Celli *et al.* 2003). Mayalarda serbest radikallerin oluşturduğu toksik etkiyi ortadan kaldıran enzimlerin yokluğunda bu organizmalarda ağır metallere duyarlılığın arttığı belirtilmiştir (Bai *et al.* 2004). Krom(VI) gibi bir ağır metal oldukça reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olacağından toksik etkiden kurtulmaya çalışan bakteri glutatyon-S-transferazı ağır metal içeren ortamda daha fazla sentezlemektedir. Yapılan çalışma, *P. aeruginosa* bakterisinin ağır metal etkisinden oluşan serbest radikal oluşumundan kurtulmaya çalıştığını göstermektedir. Bakteri toksik etkiden kurtulmasına yardımcı olan iki farklı enzimi stres ortamında daha fazla üreterek yüksek konsantrasyondaki Cr(VI) toksisitesine cevap vermiştir.

e) **Dış zar proteinleri:** *Ochrobactrum* sp. için mikrobiyel ağır metal direncinin açıklanmasında dış zar proteinlerinin önemli bir yerde olduğu ve bakterinin ağır metali hücre içine almayı, hücre dışında tutmasıyla canlılığını devam ettirmesi açıklanmıştır. *P. aeruginosa* bakterisi de dış zar proteinlerinin ve bunların öncülerinin yapımını yüksek miktarda Cr(VI) içeren ortamda artırarak ağır metali hücre içine almamayı başarmıştır.

Yapılan çalışmada *P. aeruginosa*'da özellikle LPS biyosentez proteinin, peptidoglikanla ilgili lipoproteinlerin ve dış zarın yapımının stres koşullarında artması kromu bakteri yüzeyinde tutmak ve hücre içine girmesini engellemek amacıyla olduğunu göstermektedir. Bakteri bu şekilde bir savunma mekanizması kullanarak ağır metal stresinden kendini korumaktadır.

f) Serin proteaz öncüsü (MucD): Yapılan çalışmada, yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortamda geliştirilen *P. aeruginosa* bakterisinin Cr(VI) içermeyen ortama göre bir serin proteaz öncüsü olan MucD proteinini fazla sentezlediği görülmüştür. MucD proteini, *P. aeruginosa*'da aljinat biyosentezinden sorumlu genlerin transkripsiyonunu kontrol etmesiyle, stres koşullarına karşı dirençte önemli bir görevi üstlenmiştir. Aljinat ise birçok *Pseudomonas* cinsinin üretebildiği bir ekzopolisakkarittir (EPS). Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS, bakterilerin toplanarak flokleşmesinde, biyofilm oluşturmada ve bu biyofilm yapısının kararlı kalmasını sağlamada adeta korucuyu bir bariyer gibi görev alarak toksik kirleticilerin endüstriyel sulardan giderimlerinde etkili olmaktadır (Aksu 2005, Khehra *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006). EPS'nin, ağır metallerle karşı oluşturulduğu ve metal kelasyonu (Ozdemir *et al.* 2003, Iyer *et al.* 2004, Guibaud *et al.* 2005) ile ilgili olduğu bilinmektedir. MucD proteini, periplazmik bir serin proteaz olan ve yüksek sıcaklığa maruz bırakılan *E. coli*'deki hasar görmüş proteinleri azaltabilen DegP proteini ile de benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, bu protein *Salmonella typhimurium*'da da oksidatif stres koşullarında gerekmektedir (Gutsche *et al.* 2006). Bütün bulgular, MucD proteinin herhangi bir stres koşuluna cevap şeklinde daha fazla üretildiğini göstermektedir. Çalışmada da *P. aeruginosa*, oluşturulan Cr(VI) stresine karşı Cr(VI) içermeyen ortama göre daha fazla miktarda MucD üreterek EPS üretimini artırmış Cr(VI) ağır metalinin hücre dışında kalmasını sağlamıştır.

Yapılan çalışma sonucunda, *Ochrobactrum* sp. bakterisinde bulunan taşıyıcı proteinlere *P. aeruginosa* bakterisinde rastlanmamıştır. Ancak, bu bakteride *Ochrobactrum* sp. bakterisinde olduğu gibi Cr(VI) ağır metalini hücre dışında bağlayan dış zar proteinleri bulunmuştur.

Daha önce yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* bakterisinin Cr(VI) ağır metalini hücre dışına enerji bağımlı olarak taşıyan ChrA proteinine sahip olduğu gösterilmiştir (Jimenez-Mejia *et al.* 2006). Yapılan çalışmada ise böyle bir taşıyıcı proteine rastlanmamıştır. Ancak bakteri, ağır metalli ortamda ekzopolisakkarit üretimini sağlayacak serin proteaz öncüsü MucD protein sentezini artırmıştır. İzole ettiğimiz bakterinin Cr(VI) içeren ortamda Cr(VI)'yı aktif olarak hücre dışına atacak proteinler üretmediği, hücre içine alınan Cr(VI)'nın EPS üretiminden sorumlu genleri aktifleştirerek EPS üretim miktarını artırarak bu metale direnç gösterdiği düşünülmektedir. Ekzopolisakkaritler hücre dışına salgılanarak metallerle kelat bileşikler oluşturup ağır metali hücre dışında tutmaktadırlar.

P. aeruginosa tarafından kullanılan mikrobiyel direnç sistemlerinin biyobirikim çalışmaları ile ilişkisi incelendiğinde, bakteri yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren ortamda gelişmesini sürdürmektedir. Çalışmada, bakterinin Cr(VI) ağır metalini ortamdaki uzaklaştırmadığı ve besiyerinde inkübasyon süresi boyunca Cr(VI) konsantrasyonunun uygulanan ilk ağır metal konsantrasyonu ile aynı olduğu görülmüştür.

5.3 *B. thuringiensis* İçin Cr(VI) Giderim Mekanizması

İstenmeyen yüksek konsantrasyonda kirletici olan ortamda ve kirletici olmayan ortamda *B. thuringiensis* bakterisi tarafından üretilen proteinler karşılaştırıldığında sadece Cr(VI) stresinde bakterilerin ürettiği proteinler işlevlerine göre başlıca 4 grup altında incelenmiştir:

- a) Stres proteinleri (Peptidilprolil izomeraz)
- b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (Ribozomal protein L10, uzama faktör Tu)
- c) Enerji üretiminde görevli proteinler (Pirüvat dehidrogenaz, alanin dehidrogenaz, transaldolaz)
- d) Yüzey tabaka proteinleri

a) Stres proteinleri (Peptidilprolil izomeraz): Peptidilprolil izomeraz enzimi, moleküler şaperon olarak bilinmekle birlikte protein katlanmasında önemli ölçüde rol oynamaktadır (Miele *et al.* 2003, Bell *et al.* 2006).

Daha önce de açıklandığı gibi moleküler şaperonlar proteinlerin doğru katlanmalarında yardımcı olmaktadır. Stres koşullarında hücre dengesini sağlayan bu proteinler ağır metale maruz bırakılan *B. thuringiensis* tarafından da daha fazla sentezlenmiştir.

b) Protein biyosentezinde görevli proteinler (Ribozomal protein L10, 50S ribozomal protein L1, uzama faktör Tu): Çalışmada ağır metale maruz bırakılan *B. thuringiensis*, stres koşullarına proteinler aracılığı ile direnç oluşturmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların stres koşullarında bazı proteinlerin sentezi daha fazla yapılmaktadır. Artan protein sentezi ihtiyacını karşılamak için de protein sentezinde görevli ribozomal proteinler daha fazla üretilmektedir. Uzama faktör Tu (Ef-Tu) proteini de protein sentezinin translasyon aşamasında GDP'den GTP değişiminde prokaryotlarda, mitokondrilerde ve kloroplastlarda kullanılmaktadır (Karring *et al.* 2002). Bu koşullarda mikroorganizmaların protein sentezinden sorumlu proteinlerin de sentezinin artması olası bir durum olarak görülmektedir.

c) Enerji üretiminde görevli proteinler (Pirüvat dehidrogenaz, alanin dehidrogenaz, transaldolaz): Gerçekleştirilen çalışmada mikroorganizmalar oluşan stresten korunabilmeleri için geliştirdikleri direnç sistemleri proteinlerle ilgilidir. Bu proteinlerin üretimi için de normalden daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır.

Bundan kaynaklanan enerji ihtiyacı da enerji üretimi ile ilgili proteinlerin yapımının artmasına neden olmaktadır. *Ochrobactrum* sp. ve *P. aeruginosa* bakterilerinde Cr(VI)'ya karşı oluşturulan direnç mekanizmalarında daha fazla sentezlenen ATP sintaz proteininden farklı olarak *B. thuringiensis* bakterisinde pürivat dehidrogenaz, alanin dehidrogenaz ve transaldolaz gibi enerji üretiminde kullanılan proteinlerin sentezlenmesi artmıştır.

Trikarboksilik asit döngüsünde (TCA döngüsü) ATP üretiminde kullanılan asetil-CoA bir çoklu enzim kompleksi olan pürivat dehidrogenaz tarafından pürivatın oksidatif karboksilasyonu sonucunda oluşmaktadır (Voet and Voet 1995). Çalışmada da *B. thuringiensis* bakterisinin TCA döngüsünden bu enzim sayesinde enerji ürettiği düşünülmektedir.

Bakterinin stres ortamında daha fazla ürettiği proteinlerden bir tanesi de alanin dehidrogenaz enzimidir. Enzim, karbon ve azot metabolizmasında L-alaninin dönüşümlü olarak pürivat ve amonyağa deanimasyonunu katalizlemektedir. Alanin dehidrogenaz, *Bacillus* suşlarının sporulasyonu sırasında TCA siklusu üzerinden enerji kaynağı olarak pürivat üretiminde rol almaktadır (Kato *et al.* 2003).

Mikroorganizmalarda enerji üretiminden sorumlu ve pentoz fosfat yolunda görev alan transaldolaz, üç karbonlu bir üniteyi sedoheptuloz-7-fosfattan gliseraldehit-3-fosfata aktararak eritroz-4-fosfat ve fruktoz-6-fosfat oluşumunu katalizlemektedir. (Voet and Voet 1995). Bu enzimin aynı zamanda *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* gibi bir mikroorganizmada reaktif oksijen türlerine karşı bakteriyi korumak amaçlı olarak da sentezlendiği Vatanaviboon *et al.* tarafından (2002) gösterilmiştir. Yapılan çalışmada da ağır metale maruz bırakılan *B. thuringiensis* bakterisinin istenmeyen koşullarda bu enzimi daha fazla üreterek kendini koruma altına aldığı düşünülmektedir.

d) Yüzey tabaka proteinleri (S-layer protein): Yüzey tabaka proteinleri, bakteri hücresi ile çevre arasında bir koruyucu bölge gibi görev yapmaktadır. Bu tabaka, toksik ağır metalleri tutma yeteneğinde olduğundan mikroorganizmaları koruyabilmektedir (Pollmann *et al.* 2006). Uranyum işleyen tesislerin atıklarından izole edilmiş *B. sphaericus* bakterisinin ağır metalleri yüzey tabaka proteinlerine bağladığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.

Aynı zamanda *B. cereus* bakterisinin de gama radyasyonundan bu tabakaya sahip olması ile korunduğu bulunmuştur (Simon *et al.* 2004, Pollmann *et al.* 2006).

Yapılan çalışmada da yüzey tabaka proteinlerinin yüksek konsantrasyonda ağır metal içeren ortamda sentezinin artması *B. thuringiensis* bakterisinin bu tabakaya ağır metali bağladığını göstermektedir.

Çalışma sonucunda, *B. thuringiensis* bakterisinde taşıyıcı proteinler bulunamamış ancak ağır metali bağlayan yüzey tabaka proteinleri belirlenmiştir. Metal içeren ortamda bakteri protein sentezini artırmıştır. Biyobirikim çalışmasında bakterinin metali hücre içine almayarak direnç gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada, bakterinin Cr(VI) ağır metalini ortamdan uzaklaştırmadığı ve besiyerinde inkübasyon süresi boyunca Cr(VI) konsantrasyonunun uygulanan ilk ağır metal konsantrasyonu ile aynı olduğu görülmüştür. Krom(VI) içeren ortamda *Ochrobactrum* sp. ve *P. aeruginosa* bakterilerinden daha az biyokütle oluşturan *B. thuringiensis* bakterisinin, EPS üretmediği görülmüştür. Ancak bakterinin çalışmada kullanılan diğer iki bakteride olduğu gibi taşıyıcı proteinlerle metali hücre dışında tuttuğu tahmin edilmektedir.

5.4 *B. cereus* İçin Cr(VI) Giderim Mekanizması

Stres koşullarında ve stres oluşturulmamış ortamlarda *B. cereus* tarafından üretilen proteinler karşılaştırıldığında sadece Cr(VI) stresinde bakterilerin ürettiği proteinler işlevlerine göre başlıca 3 grup altında incelenmiştir:

- a) Protein biyosentezinde görevli proteinler (50S ribozomal protein L5, 50S ribozomal protein L10, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz, uzama faktör Tu)
- b) Enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, bütirat kinaz; transaldolaz)
- c) Stres proteinleri (Peptidilprolil izomeraz)

a) Protein biyosentezinde görevli proteinler (50S ribozomal protein L5, 50S ribozomal protein L10, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz, uzama faktör Tu): ağır metal içeren ortamda bakteriler daha fazla protein sentezleyerek ortama adapte olmaktadır. Artan protein ihtiyacı protein sentezlemek için gereken proteinlerin de sentezinin artırılmasıyla sonuçlanmaktadır.

Bu nedenle, *B. cereus* bakterisi, 50S ribozomal protein L5, 50S ribozomal protein L10 ve uzama faktör Tu gibi protein sentezinde görevli diğer moleküllerin yapımını artırmıştır.

Stres koşullarında sentezi artan ve protein sentezinde görevli proteinlerden başka bir tanesi adenin, guanin ve hipoksantin gibi serbest halde bulunan pürinlerin yeniden yapılanmasını sağlayan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimidir (Voet and Voet 1995).

b) Enerji üretiminde görevli proteinler (ATP sintaz, bütirat kinaz; transaldolaz): Çalışmada, bakterilerin ağır metal içeren ortamda daha fazla protein ürettikleri görülmüştür. Bakteriler artan protein üretimi nedeniyle daha fazla enerji sağlamak zorunda kalmaktadırlar. Bu nedenle kirletici bulunan ortamda enerji üretiminden sorumlu proteinlerin yapımı da artmaktadır. ATP sintaz enzimi *Ochrobactrum* sp. ve *P. aeruginosa* bakterilerinde, transaldolaz enzimi ise *B. thuringiensis* bakterisinde stres koşullarında daha fazla sentezlenmiştir. Ağır metal içeren ortamda, *B. cereus* bakterisi bu proteinlerin dışında bütirat kinaz enzimini de daha fazla üretmiştir. Bütirattan bütiril koenzim A üretimini sağlayıp enerji metabolizmasında yer alan ve stres koşullarında sentezi artan başka bir protein de bütirat kinaz enzimidir. Enzim, bütiril-fosfat üretimini katalizlerken mikroorganizmalar asetil-CoA'dan ATP üretebilmektedirler (Cary *et al.* 1988). Çalışmada, *B. cereus* bakterisi yüksek konsantrasyonda Cr(VI) içeren koşullarda bu enzimlerin yapımını artırarak enerji ihtiyacını karşılamaya çalışmıştır.

c) Stres proteinleri (Peptidilprolil izomeraz): Peptidil prolil izomeraz enzimi protein katlanmasında önemli ölçüde rol oynamaktadır. Aynı zamanda, bu proteinlerin moleküler şaperon olarak da isimlendirildiği bilinmektedir (Miele *et al.* 2003, Bell *et al.* 2006).

Daha önce de açıklandığı gibi moleküler şaperonlar proteinlerin doğru katlanmalarında yardımcı olmaktadır. İstenmeyen koşullarda hücre dengesini sağlayan bu proteinler ağır metale maruz bırakılan *B. cereus* tarafından da stres ortamında daha fazla sentezlenmiştir.

B. cereus bakterisi ile yapılan denemelerde, çalışmada kullanılan diğer bakterilerde olduğu gibi bakteri yüzeyi ile ilgili proteinler veya taşıyıcı proteinler bulunamamış ancak bakterinin metal içeren ortamda protein sentezini artırdığı görülmüştür. Biyobirikim çalışmasında, bakterinin Cr(VI) ağır metalini ortamdan uzaklaştırmadığı ve besiyerinde inkübasyon süresi boyunca Cr(VI) konsantrasyonunun uygulanan ilk ağır metal konsantrasyonu ile aynı olduğu görülmüştür. Krom(VI) içeren ortamda *Ochrobactrum* sp., *P. aeruginosa* ve *B. thuringiensis* bakterilerinden çok daha az biyokütle oluşturan ve EPS üretmeyen bakterinin çalışmada kullanılan diğer üç bakteride olduğu gibi taşıyıcı proteinlerle metali hücre dışında tuttuğu tahmin edilmektedir.

5.5 Bakterilerden İzole Edilen Plazmidlerin Cr(VI) Direnç Sistemleri İle İlişkisi

Tez çalışmasında denenen bütün bakterilerin yalnızca Cr(VI) içeren ortamda bir plazmide sahip olduğu görülmüştür. Bu plazmidlerin Cr(VI) direnci ile ilişkisini belirlemek amacıyla her plazmid *E.coli* DH5 α bakterisine aktarılmış ve transformatların Cr(VI) içeren ortamda gelişip gelişmediği kontrol edilmiştir.

Yapılan çalışmada, *P. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* bakterilerinden izole edilen plazmide sahip *E.coli* DH5 α bakterisi Cr(VI) içeren ortamda gelişmemiştir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, *P. aeruginosa* bakterisinde Cr(VI) direncinden sorumlu olduğu bulunan bir plazmid izole edilmiştir (Cervantes *et al.* 2001). Bu plazmid üzerinden kodlanan ve Chr A isimli bir proteinin Cr(VI) iyonlarını hücre dışına taşıdığı bulunmuştur. CHR protein ailesine dahil olan ve *P. aeruginosa* gibi bir mikroorganizmada bulunan ChrA proteininin, enerji bağımlı olarak kromatin hücreden dışarı çıkarılmasını katalizlediği gösterilmiştir (Alvarez *et al.* 1999, Nies 1999, Jiemez Mejia *et al.* 2006). Fakat *P. aeruginosa* plazmidi *E.coli* bakterisine aktarıldığında konukçu Cr(VI) direnci gösterememiştir. Bu durum, plazmidin aktifliğini başka konukçularda kaybettiğini göstermiştir (Cervantes *et al.* 2001). Yapılan tez çalışmasında da *P. aeruginosa* bakterisinin de dahil olduğu üç bakterinin plazmidlerini başka bir konukçuya aktardığımızda, bu plazmide sahip konukçu Cr(VI) direnci göstermemiştir.

Denemelerde, *Ochrobactrum* sp. bakterisinden izole edilen plazmide sahip *E.coli* DH5 α , Cr(VI) içeren ortamda gelişmiştir. Bu durum, yalnızca *Ochrobactrum* sp. bakterisinin sahip olduğu plazmid üzerinden kodlanan proteinlerin Cr(VI)'ya dirençten sorumlu olduğunu ve başka konukçularda da işleve sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, denenen dört bakterinin de Cr(VI) ağır metalini hücre içinde biriktirmediği, bu ağır metali ne hücre içinde ne de hücre dışında kromat redüktaz enzimi ile Cr(III)'e çevirerek etkisiz hale getirmediği bulunmuştur. Tüm bakteriler Cr(VI) stresine protein sentezini artırarak cevap vermiştir. *Ochrobactrum* sp. bakterisinde belirlendiği gibi tez çalışmasında kullanılan bütün bakterilerde Cr(VI) ağır metalinin taşıyıcı proteinler ile hücre dışına atıldığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026.
- Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S. and Dönmez, G. 2007. Inhibitory effects of chromium(VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1167-1174.
- Alvarez, A.H., Moreno-Sánchez R. and Cervantes C. 1999. Chromate efflux by means of the Chr A a chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181, 7389-7400.
- Anonim. 2007. Web sitesi: http://www.cevreorman.gov.tr/belgeler1/deri_krom.doc. Erişim Tarihi: 12.12.2007.
- Anonymous. 2008. Web sitesi: http://en.wikipedia.org/wiki/heat_shock_protein. Erişim Tarihi: 25.03.2008.
- Anonymous. 2008. Web sitesi: http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_protein. Erişim Tarihi: 25.03.2008.
- Bai, M., Zhou, J-M. and Perret, S. 2004. The yeast prion Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 50025-50030.
- Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J. and Gade, W.N. 2007. Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-A proteomic approach. *Journal of Biotechnology*, 128, 444-451.
- Battistoni, A., Carr, M.T., Steinkühler C. and Rotilio G. 1993. Chaperonins dependent increase of Cu, Zn superoxide dismutase production in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 332, 6-9.
- Bell, A., Monaghan, P. and Page, A.P. 2006. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. *International Journal of Parasitology*, 36, 261-276.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme., F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme., F.W. 2003. Characterization of a small plasmid (pMBCP) from bovine *Pseudomonas pickettii* that confers cadmium resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 241-248.

- Cary, J.W., Petersen, D.J., Papoutsakis, E.T. and Bennett, G.N. 1988. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutylase and butyrate kinase genes in *Escherchia coli*. American Society for Microbiology, 170, 4613-4618.
- Celli, N., Motos-Gallardo, A., Tamburro, A., Favalaro, B. and Rotilio, D. 2003. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry study of cysteine-10 S-glutathiolation in recombinant glutathione S-transferase of *Ochrobactrum antropi*. Journal of Chromatography B 787, 405-413.
- Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T.K. and Silver, S. 1990. Cloning nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. Journal of Bacteriology, 172, 287-291.
- Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J.L. and Silver S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 15, 355-367.
- Cervantes, C. and Gutierrez-Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiology Reviews, 14, 121-138.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torrez-Guzman, J.C. and Moreno-Sanshez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 25, 335-347.
- Cheung, K.H. and Gu, J. 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. International Biodeterioration and Biodegradation, 59, 8-15.
- Congeevaram, S., Dhanarani S., Park, J., Dexilin, M. and Thamaraiselvi, K. 2007. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. Journal of Hazardous Materials, 146, 270-277.
- Diffels, J.F., Seret, M.-L., Goffeau, A. and Baret, P.V., 2006. Heavy metal transporters in hemiascomycete yeasts. Biochimie 88, 1639-1649.
- Dönmez, G. and Aksu, Z. 2002. Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. Process Biochemistry, 38, 751-762.
- Dönmez, G. and Koçberber, N. 2005a. Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched microbial cultures obtained from molasses and NaCl containing media. Process Biochemistry, 40, 2493-2498.
- Dönmez, G. and Koçberber, N. 2005b. Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. Enzyme and Microbial Technology, 36(5-6), 700-705.

- Dubey S.P. and Gopal, K. 2007. Adsorption of chromium(VI) on low cost adsorbents derived from agricultural waste material: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 145,465-470.
- Felicio, A.P., Garcia, Jr.O., Bertolini, M.C., Ottoboni, L. M. M. and Novo, M. T. M. 2003. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. *Hydrometallurg*, 71,165-171.
- Fulladosa, E, Desjardin, V., Murat J-C, Gourdon, R. and Villaescusa, I. 2006. Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. *Chemosphere*, 65, 644-650.
- Gutsche, J., Remminghorst, U. and Rehm, B.H.A. 2006. Biochemical analysis of alginate biosynthesis protein AlgX from *Pseudomonas aeruginosa*: purification of an AlgX-MucD (AlgY) protein complex. *Biochimie* 88, 245-251.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S. and Baudu, M. 2005. Comparison of the complexation potential extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59, 629-638.
- Horitsu, H., Futo, S., Ozawa, K. and Kawai, K. 1983. Comparison of characteristics of hexavalent-chromium tolerant bacterium, *Pseudomonas ambigua* G-1, and its hexavalent chromium-sensitive mutant. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2907-2908.
- Iyer, A., Mody, K. and Jha, B. 2005. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin* 50, 340-343.
- Jimenez-Mejia, R., Campos-Garcia, J. and Cervantes, C., 2006. Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 178-184.
- Karring, H., Andersen, G.R., Thirup, S.S., Nyborg, J., Spremulli, L.L. and Clark, B.F.C. 2002. Isolation, crystallisation, and preliminary X-ray analysis of the bovine mitochondrial Ef-Tu:GDP and EF-Ts complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1601, 172-177.
- Kaszycki, P., Fedorovych, D., Ksheminska, H., Babyak, L., Wjcik, D. and Koloczek, H. 2004. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research*, 159, 11-17.
- Kato, S., Ohshima, T., Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T. and Esaki, N. 2003. Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a marine bacterium, *Vibrio proteolyticus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23, 373-378.

- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. and Chimni, S.S. 2006. Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxygenic aerobic sequential bioreactor. *Dyes and Pigments*, 70, 1-7.
- Koçberber, N. and Dönmez, G. 2007. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters, *Bioresource Technology*, 98, 2178-2183.
- Kılıç, N.K. and Dönmez, G. 2007. Hexavalent chromium bioaccumulation by *Micrococcus* sp. isolated from tannery wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16, 1571-1577.
- Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P. and Koloczek, H. 2005. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochemistry*, 40, 1565-1572.
- Kolker, E., Higdon, R. and Hogan, J.M. 2006. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *TRENDS in Microbiology*, 14, 229-235.
- Lewinska, A. and Bartosz, G. 2007. Protection of yeast lacking the Ure2 protein against the toxicity of heavy metals and hydroperoxides by antioxidants. *Free Radical Research*, 41(5), 580-590.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth edition. Pearson Education, USA.
- McGuinness, M., Ivory, C., Gilmartin, N. and Dowling, D.N. 2006. Investigation of substrate specificity of wildtype and mutant BphKLB400 (a glutathione S-transferase) from *Burkholderia LB400*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58, 203-208.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier V, Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Lelie, D. and Wattiea, R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 385-410.
- Miele, R., Borro, M., Mangoni, M.L., Simmaco, M. and Barra, D., 2003. A peptidylprolyl cis-trans isomerase from *Xenopus laevis* skin: cloning, biochemical characterization and putative role in the secretion. *Peptides*, 24, 1713-1721.
- Mohan, D. and Pittman Jr., C.U. 2006. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials B137*, 762-811.

- Nepple, B.B., Kessi, J. and Bachofen, R. 2000. Chromate reduction by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, 198-203.
- Nies, D., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. and Saier, Jr., M.H. 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *Journal of Bacteriology*, 180, 5799-5802.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 51, 730-750.
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313-339.
- Ogawa, T., Usui, M., Yatome, C. and Idaka, E. 1989. Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. *Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 254-260.
- Ohtake, H., Cervantes, C. and Silver, S. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.*, 169, 3853-3856.
- Ohtake, H., Komori, K., Cervantes, C. and Toda, K. 1990. chromate resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Letters*, 67, 85-88.
- Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R. and Cosar, T. 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum antropi* producing exopolysaccharide in activated sludge, *Bioresource Technology* 90, 71-74.
- Pal, A. and Paul, A.K. 2004. Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiological Research*, 159, 347-354.
- Pimentel, B.E., Moreno-Sánchez, R. and Cervantes, C. 2002. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 249-254.
- Plesa, M., Hernalsteens, J., Vandenbussche, G., Ruyschaert, J., and Cornelis, P. 2006. The Sly outer membrane lipoprotein of *Burkholderia multivorans* contributes to membrane integrity. *Research in Microbiology*, 157, 582-592.
- Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K. and Selenska-Pobell, S. 2006. Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnol Adv* 24, 58-68.

- Rabilloud, T. 2000. Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer, Germany.
- Rensing, C. and Grass, G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiology Reviews, 27, 197-213.
- Rince, A., Flahaut, S. and Auffray, Y. 2000. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology, 55, 87-91.
- Rosen, B.P. 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 133, 689-693.
- Ruotolo L.A.M., Santos-Ju' nior, D.S., Gubulin, J.C. 2006. Electrochemical treatment of effluents containing Cr(VI). Influence of pH and current on the kinetic. Water Research, 40, 1555-1560.
- Sadettin S. and Dönmez, G. 2007. Simultaneous bioaccumulation of reactive dye and chromium(VI) by using thermophil *Phormidium* sp. Enzyme and Microbial Technology, 41, 175-180.
- Saxena, D., Levin, R. and Firer, M.A. 2000. Removal of chromate from industrial effluent by a new isolate of *Staphylococcus cohnii*. Water Sci. Technol., 42, 93-98.
- Schmidt, A. Haferburg, G. Sineriz, M, Merten, D. Büchel, G. and Kothe, E. 2005. Heavy metal mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. Chemic Der Erda, 65, 131-144.
- Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., and Gade, W.N. 2006. Role of proteins in resistanc mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. Journal of Biotechnology, 126, 374-382.
- Simon, P., Lichte, H., Wahl, R., Mertig, M. and Pompe, W. 2004. Electron holography of non-stained bacterial surface layer proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1663, 178-187.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W. and Garg, S.K. 2002. Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere, 48, 427-35.
- Silver, S. 1996. Bacterial resistance to toxic metal-ions-a review. Gene, 179, 9-19.
- Snell, F.D. and Snell, C.T. 1959. Colorimetric methods of analysis, 3rd edn, Vol 2, D Van Nostrand Company, New York, USA.

- Stafford, S.J., Humpreys, D.P. and Lund, P.A. 1999. Mutations in *dsbA* and *dsbB*, but not *dsbC*, lead to an enhanced sensitivity of *Escherichia coli* to Hg^{+2} and Cd^{+2} . FEMS Microbiology Letters, 174, 179-184.
- Stapleton, P., Pike, R., Mullany, P., Lucas, V., Roberts, G., Rowbury R., Wilson, M. and Richards, H. 2004. Mercuric resistance genes in gram-positive oral bacteria. FEMS Microbiology Letters, 236, 213-220.
- Sultan, S. and Hasnain, S. 2006. Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. Enzyme and Microbial Technology, 39, 883–888.
- Thacker U., Parikh, R., Shouche, Y. and Madamwar, D. 2006. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. Process Biochemistry, 41, 1332-1337.
- Thacker U. , Parikh, R. , Shouche, Y. and Madamwar D. 2007. Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites. Bioresource Technology, 98, 1541-1547.
- Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D. and Sonomoto, K. 2005. Reconstruction and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. Journal of Bioscience and Bioengineering, 99, 30-37.
- Travensolo, R.F., Garcia, W., Muniz, J.R.C., Caruso, C.S., Lemos, E.G.M., Carrilho, E., Araujo, A.P.U. 2008. Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione-S-transferase from *Xylella fastidiosa*. Protein Expression and Purification, Article in press.
- Trevors, J.T., Oddie, K.M. and Belliveau, B.H. 1985. Metal resistance in bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 32, 39-54.
- Valls, M., Lorenzo, V., Gonzales-Duarte, R. and Atrian, S. 2000. Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy-metal bioadsorption. Journal of Inorganic Biochemistry, 79, 219-223.
- Vataniboon, P., Varalaksit, T., Seenukun, C. and Mongkolsuk, S. 2002. Transaldolase exhibits a protective role against menadione toxicity in *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. Biochemical and Biophysical Research Communications 297, 968-973.
- Voet, D. and Voet, J.G. 1995. Biochemistry, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc. Canada.
- Wang, L., Zhou, Q. and Ren, D.M. 2004. Comprehensive analysis of the variation of Cu^{+2} adsorption capacity of *Pseudomonas putida* 5-x cell envelope with cell age, Enzyme and Microbial Technology, 34, 474-481.
- Yang L. and Chen J.P. 2008. Biosorption of hexavalent chromium onto raw and chemically modified *Sargassum* sp. Bioresource Technology, 99, 297-307.

- Zhang, D., Wang, J. and Pan, X. 2006. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, B138, 589-593.
- Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X. and Matis, K.A. 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39, 909-916.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nur KOÇBERBER KILIÇ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 15.06.1979
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Yükseliş Koleji 1996
Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2000
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,
2003

Çalıştığı Kurum ve Yıl: Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi,
2001-

Yayınları (SCI ve diğer):

- Dönmez, G. and Koçberber, N. 2005. Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched microbial cultures obtained from molasses and NaCl containing media. *Process Biochemistry*, 40, 2493-2498.
- Dönmez, G. and Koçberber, N. 2005. Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36 (5-6), 700-705.
- Kılıç N.K., Nielsen, J.L., Yüce, M. and Dönmez, G. 2007. Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere*, 67, 826-831.
- Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S. and Dönmez, G. 2007. Inhibitory effects of chromium(VI) and Remazol Black B on chromium(VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1167-1174.

- Koçberber, N. and Dönmez, G. 2007. Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. *Bioresource Technology*, 98, 2178-2183.
- Kılıç, N.K. and Dönmez, G. 2007. Hexavalent chromium bioaccumulation by *Micrococcus* sp. isolated from tannery wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16, 1571-1577.
- Kılıç, N.K. and Dönmez, G. 2007. Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *Journal of Hazardous Materials*, Article in press.