



**T.C.
MEHMET AKIF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURDUR GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN AĞIR METAL VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN KÜLTÜREL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Orhan YAVUZ

BURDUR, 2017

**T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURDUR GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN AĞIR METAL VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN KÜLTÜREL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Orhan YAVUZ

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL

BURDUR, 2017

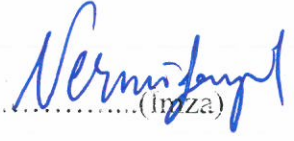
YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Orhan YAVUZ tarafından **Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL** yönetiminde hazırlanan "**Burdur Gölü'nden İzole Edilen Mikroorganizmaların Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliğinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/11/2017

Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL (Başkan)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....


(İmza)

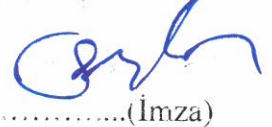
Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....


(İmza)

Doç. Dr. Seyhan ULUSOY (Jüri Üyesi)

Süleyman Demirel Üniversitesi.....


(İmza)

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

(İmza)

Prof. Dr. İskender GÜLLE

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü


ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Burdur Gölü’nden İzole Edilen Mikroorganizmaların Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliğinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24 / 11 / 2017


Orhan YAVUZ

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, tüm laboratuvar ve altyapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan değerli Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL' e,

Ağır metal analizleri konusunda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY ve Kimya Mühendisi Mahmut DOĞANTÜRK' e

Arazi çalışmaları ve deneysel aşamalarda beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşlarım Ali SOYUÇOK ve Berat TOCAN' a,

Tez çalışmam boyunca bana gerekli tüm kolaylık ve yardımlarını esirgemeyen Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimi ve değerli mesai arkadaşlarıma,

Tez çalışmamı 0256-YL-15 numaralı proje ile destekleyen MAKÜ Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğüne,

Tez çalışmamın başınsan sonuna kadar maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen değerli hocam Mert SUDAĞIDAN'a,

Her zaman yanımda olan ve benim başarımlarım için maddi manevi hiçbir emeğini esirgemeyen değerli eşim Tuğçe YAVUZ'a

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Kasım, 2017

Orhan YAVUZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Burdur Gölü.....	3
2.2. Ağır Metal Kirlilik Kaynakları.....	3
2.3. Ağır Metal Direnci	9
2.3.1. Metalin Hücre İçine Alınmasının Engellenmesi	12
2.3.2. Metal İyonlarının Hücre Dışına Taşınması	13
2.3.3. Metallerin Hücre İçi Biriktirilmesi.....	15
2.3.4. Metallerin Hücre Dışında Biriktirilmesi	16
2.3.5. Enzimatik Detoksifikasyon	17
2.3.6. Hücre Hassasiyetinin Düşürülmesi	18
2.4. Ağır Metal ve Antibiyotik Direnç Arasındaki İlişki	19
2.5. Ağır Metal Direncinin Tespit Edilmesi	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyaller	24
3.1.1. Burdur Gölü.....	24
3.2.2. Kültür Besiyerleri	25
3.2.2.1. 6mM Na ₂ HAsO ₄ içeren 0,5 X Nutrient Agar	25
3.2.2.2. Nutrient Broth ve %40 Giserol İçeren Nutrient Broth	25
3.2.2.3. Mueller Hinton Agar II	25
3.2.2.4. Lipaz Test Ortamı.....	26
3.2.2.5. Amilaz Test Ortamı	26
3.2.2.6. Proteaz Test Ortamı.....	26
3.2.2.7. Jelatinaz Test Ortamı.....	27
3.2.2.8. Üreaz Testi Ortamı	27
3.2.3. Boyalar ve solüsyonlar	27
3.2.3.1. % 0,9 Sodyum Klorür Solüsyonu.....	27
3.2.3.2. Kristal Viyolet Solüsyonu	27
3.2.3.3. Gram İyodür Solüsyonu	28
3.2.3.4. Safranin Solüsyonu	28
3.2.3.5. %33 Asetik Asit Solüsyonu.....	28
3.2.3.6. Ağır Metal Stok Solüsyonları.....	28
3.2.4. Moleküler Yöntemler İçin Kullanılan Malzemeler	29
3.3. Aletler ve Cihazlar.....	29
3.4. Yöntem	30
3.4.1. Örneklerin Toplanması ve Ağır Metal Analizleri	30
3.4.2. Mikroorganizmaların Saflaştırılması ve Stoklanması	30

3.4.3. Gram Boyama	30
3.4.4. Ekstrasellüler Enzim Testleri	31
3.4.4.1. Katalaz Testi.....	31
3.4.4.2. Lipaz Testi.....	31
3.4.4.3. Amilaz Testi	31
3.4.4.4. Proteaz Testi.....	31
3.4.4.5. Jelatinaz Testi.....	31
3.4.4.6. Üreaz Testi	32
3.4.5. Biyofilm Testi	32
3.4.6. Ağır Metal Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi .	32
3.4.7. Antibiyotik Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (A-MİK) Testi.....	33
3.4.8. Ağır Metal Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemi ile Belirlenmesi	34
3.4.9. Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Ağır Metal Analizi Sonuçları	37
4.2. Gram Boyama, Hücre Morfolojisi ve Katalaz Testi Sonuçları	38
4.3. Ekstrasellüler enzim testi sonuçları	40
4.4. Biyofilm Testi Sonuçları	44
4.5. Ağır Metal MİK Testi Sonuçları	45
4.6. Antibiyotik MİK Testi Sonuçları	50
4.7. Tespit Edilen Ağır Metal Direnç Genleri	55
4.8. Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı	58
5. SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Ağır metallerin doğaya yayılma kaynakları.....	4
Şekil 2.2. Metal direncinin genel mekanizmaları.....	12
Şekil 2.3. RND proteinlerinin hücre içi fonksiyonları.....	15
Şekil 2.4. 4582 Plazmid dizisine dayanan antibiyotik direnç genleri	20
Şekil 2.5 Metal ve antibiyotik direncini oluşturan sistemlere örnekler.....	21
Şekil 3.1. Örneklemeye Noktaları.....	24
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonda bakır içeren besiyeriler.....	33
Şekil 4.1. Lipaz pozitif suşa ait fotoğraf.....	41
Şekil 4.2. Amilaz pozitif bir deney fotoğrafı.....	41
Şekil 4.3. Proteaz pozitif bir deney fotoğrafı.....	42
Şekil 4.4. Jelatinaz pozitif bir deney fotoğrafı.....	42
Şekil 4.5. Üreaz deneyi sonuçları.....	43
Şekil 4.6. Biyofilm testi yapılan mikropolanın fotoğrafı.....	45
Şekil 4.7. Çinko için yapılan MİK deneyi fotoğrafı.....	47
Şekil 4.8. Kadmiyum için yapılan MİK deneyi fotoğrafı.....	48
Şekil 4.9. Vankomisin için yapılan A-MİK deneyi fotoğrafı.....	53
Şekil 4.10. copA genine ait jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.11. cadD genine ait jel görüntüsü.....	57

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ağır metaller ve yayılımına sebep olan endüstriyel faaliyetler.	7
Çizelge 2.2. Ağır metallerin insan sağlığı üzerinde etkileri	8
Çizelge 2.3. Ağır metal dirençliliği tespit edilmiş mikroorganizmalar	11
Çizelge 2.4. Ağır metal direncinden sorumlu bazı genler	23
Çizelge 3.1. Örneklem Noktalarının Koordinatları.	24
Çizelge 3.2. Ağır metal tuzlarının moleküler ağırlıkları	29
Çizelge 3.3. PZR deneylerinde kullanılan primerler	35
Çizelge 4.1. Ağır metal analizi sonuçları.	37
Çizelge 4.2. Gram boyama, hücre morfolojisi ve katalaz testi sonuçları.	39
Çizelge 4.3. Ekstrasellüler enzim testleri sonuçları.	40
Çizelge 4.4. Biyofilm testi sonuçları.	44
Çizelge 4.5. Ağır Metal MİK testi sonuçları.	46
Çizelge 4.6. Ampisilin, gentamisin, penisilin, klindamisin ve vankomisin için yüksek metal dirençli izolatlara ait MİK sonuçları	51
Çizelge 4.7. Ampisilin, gentamisin, penisilin, klindamisin ve vankomisin için düşük metal dirençli izolatlara ait MİK sonuçları.	51
Çizelge 4.8. Rifampisin, sefpodoksim, ofloksasin ve enrofloksasin için yüksek metal dirençli izolatlara ait MİK sonuçları.	52
Çizelge 4.9. Rifampisin, sefpodoksim, ofloksasin ve enrofloksasin için düşük metal dirençli izolatlara ait MİK sonuçları	52
Çizelge 4.10. Ağır metal direnci tespit edilen izolatlar ve tespit edilen genler.	56
Çizelge 4.11. Tür tanısı yapılan bakteriler ve NCBI kayıt numaraları.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
A-MİK	: Antibiyotikler için Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
cm³	: Santimetre küp
G	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
MAKÜ	: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Burdur Gölü'nden İzole Edilen Mikroorganizmaların Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliğinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

Orhan YAVUZ

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL

Kasım, 2017

Bu tez çalışmasında Burdur Gölü'nden izole edilen bakterilerin ağır metaller dirençliliği kültürel ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Burdur Gölü'nden 5 farklı noktadan toplanan su ve sediment örneklerinden ağır metal analizi (bakır, çinko, kurşun, kadmiyum, arsenik ve cıva) yaptırılmış ve bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ağır metal dirençli tespit edilen 39 izolat saflaştırılmış ve çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatlarda Gram boyama ve ekstraselüler enzim üretimleri (proteaz, lipaz, amilaz, üreaz, jelatinaz ve katalaz), biyofilm oluşturma kapasiteleri test edilmiştir. Bakır, çinko, kurşun, kadmiyum, arsenik ve cıvanın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları belirlenmiştir. İzolatların tamamında ağır metal direncinden sorumlu olduğu bilinen 15 farklı gen Polimeraz Zincir Reaksiyon yöntemi ile taranmıştır. Yüksek derecede dirençli olan 7 izolat ve düşük derecede direnç gösteren 5 izolat üzerinde Antibiyotik Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu testi yapılmıştır. Yüksek dirençli bulunan 7 izolatın 16S rRNA bölgesi kullanılarak moleküler olarak tür tanısı gerçekleştirilmiştir.

Yapılan ağır metal analizlerinde sediment örneklerinde en yüksek 49,63 µg/g çinko ve 27,15 µg/g bakır tespit edilmiş diğer 4 metal tespit edilememiştir. Gram boyama sonucunda 15 Gram pozitif 24 Gram negatif izolat olduğu belirlenmiştir. 39 izolat üzerinde yapılan enzim testleri sonucu 17 izolat üreaz, 15 izolat proteaz, 14 izolat lipaz, 8 izolat amilaz ve 1 izolat jelatinaz enzimlerini ürettiği belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma testi sonucunda 18 izolatın biyofilm oluşturabildiği gözlemlenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonları; bakır için 8 mM, kadmiyum için 4mM, kurşun için 16 mM, çinko için 16 mM, arsenik için 16 mM ve cıva için 0,025 mM olarak tespit edilmiştir. PZR ile taranan 15 farklı direnç geninden 4 tanesi çalışmamızda gözlemlenmiştir. Bunlar bakır, kadmiyum ve kadmiyum-çinko-kobalt dirençlerini kodlayan genlerdir. Antibiyotik direnci ağır metal direncine benzer sonuçlar göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Burdur gölü, ağır metal, antibiyotik, dirençlilik

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 0256-YL-15 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Determination of Heavy Metal and Antibiotic Resistance of Microorganisms Isolated from Burdur Lake by Cultural and Molecular Methods

Orhan YAVUZ

**Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Asisst. Prof. Dr. Nermin SARIGÜL

November, 2017

In this study heavy metal resistance of bacteria, isolated from Burdur Lake, were investigated by cultural and molecular methods. Water and sediment samples for isolation and heavy metal (copper, zinc, lead, cadmium, arsenic and mercury) detection were collected from 5 sampling points. Heavy metal resistant 39 isolates were purified and stocked for further analysis. Basic microbiological tests such as Gram staining, extracellular enzyme tests (protease, lipase, amylase, urease, gelatinase and catalase) and biofilm formation were performed. Minimum inhibition concentration of copper, zinc, lead, cadmium, arsenic and mercury were detected. 15 different genes related with heavy metal resistance were screened by PCR based methods. Antibiotic minimum inhibition concentration were detected for 7 heavy metal resistant and 5 sensitive cultures. Resistant cultures were identified by 16SrDNA sequences.

Zinc and copper were detected in sediment samples and the highest amount were 49.63 µg/g and 27.15 µg/g respectively. Lead, cadmium, arsenic and mercury were not detected in any samples. 15 Gram positive, 24 Gram negative, 17 urease, 15 protease, 14 lipase, 8 amylase, 1 gelatinase and 18 biofilm production positive strains observed. Minimum inhibition concentrations of copper, zinc, lead, cadmium, arsenic and mercury were studied in all cultures and detected 8 mM, 16 mM, 16 mM, 4 mM, 16 mM and 0,025 mM respectively. Copper, cadmium and cadmium-zinc-copper resistance genes were observed by PCR.

Antibiotic resistance results show similarities with heavy metal resistance results.

Keywords: Burdur lake, heavy metal, antibiotic, resistance

This master degree thesis were financially supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Project Unit 0256-YL-15 numbered project.

1. GİRİŞ

Metaller, biyolojik olarak mevcut konsantrasyonları esas olarak jeolojik ve biyolojik süreçlere bağlı olan ekosistemin temel bileşenleridir. Farklı ağır metal tanımları vardır ve tanımlamaların çoğunluğu elementlerin kütle yoğunluğuna dayanmaktadır. Araştırmacıların bir kısmı ağır metal tanımı için 3.5 ile 7 g/cm³ arasında değişen eşik yoğunluk değeri kullanmaktadır. Genel kabul, ağır metallerin özkütlesinin 4.5 g/cm³'den daha fazla olması gerektiği yönündedir. Ağır metaller arasında canlı organizmaların metabolik faaliyetleri için gerekli olan ve olmayanlar ya da etkisi henüz bilinmeyen elementler bulunmaktadır. Organizmalarda ağır metallere genellikle mikrogram seviyelerinde ihtiyaç duyulmaktadır.

Ağır metal terimi, genellikle toksisite ile bağlantılı olsa da bu durum her zaman geçerli değildir. Herhangi bir maddenin canlı bir sistem üzerindeki etkisi hücrelerde olan mevcut konsantrasyonuna bağlıdır. Bazı ağır metal iyonları düşük konsantrasyonlarda metabolik faaliyetler için gerekli iken yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Bununla birlikte çeşitli biyolojik, jeolojik ve antropojenik süreçler sonucunda metallerin çevreye salınması ve yayılımı hız kazanmıştır. Madencilik faaliyetleri sonucunda, bu faaliyetlerin gerçekleştiği alanlarda, işlenen ağır metalin çevrede bulunan konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. Bu durum önemli çevre ve sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Karasal ortamların ağır metal kirliliği, ekosistemdeki metallerin kalıcılığı ve tüm canlı organizmalar için tehditlerinden dolayı büyük endişe kaynağıdır (Lenart-Boroń ve Boroń, 2014).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çevrede bulunan ağır metallerin organizmalar üzerine etkilerinin belirlenmesi, hücre yüzeyine metallerin tutunması ve hücre içine alınması, metal-mikroorganizma etkileşimlerinin ve metabolizmasının belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hücre tarafından kullanılabilir formdaki metallerin eksikliği durumunda mikroorganizma davranışlarının incelenmesi ise ilgi çeken diğer araştırma konularındandır (Sobolev ve Begonia, 2008).

Ağır metallerin bir kısmı organizmalar için mikronutrient olarak gereklidir; hücrede ozmotik basıncın düzenlenmesinde, moleküllerin dört boyutlu yapısının oluşturulmasında ve bu yapının korunmasında ve enzimlerde kofaktör olarak rol oynarlar. Ağır metallerin yüksek dozları organizmalar için toksiktir ve sürekli maruziyet organizmada oluşan etkinin şiddetini artırır. Toksisite ortamın pH değerine, ortamdaki besin kompozisyonuna ve ortam koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Özellikle madencilik faaliyetlerinin gerçekleştirildiği çevreler

uzun süre ağır metal maruziyeti sağlaması yanında diğer çevresel koşullar nedeni ile de toksisitenin artmasına neden olmaktadır (Ayangbenro ve Babalola, 2017).

Pal vd., (2015) tarafından yapılan çalışmada; deniz suyundaki ağır metaller konsantrasyonlarına bağlı olarak dört sınıfa ayrılmıştır:

- Sınıf I, 100 nM ve 1 µM konsantrasyon değerlerinde ve deniz suyunda yaygın olarak bulunan ağır metalleri içermektedir. Bunlar; demir, çinko ve molibdendir.
- Sınıf II, 10-100 nM konsantrasyondaki ağır metalleri içermektedir. Nikel, bakır, arsenik, vanadyum, mangan, kalay, uranyum bu gruptaki ağır metallerdir.
- Sınıf III, kobalt, seryum, gümüş, antimon gibi nadir elementleri içermektedir.
- Sınıf IV, 1 nM'den daha az konsantrasyonda bulunan kadmiyum, krom, volfram, galyum, zirkonyum, toryum, cıva, kurşun gibi ağır metalleri içermektedir.

Bileşiklerde üç ya da dört değerlikli katyonlar olarak bulunan ve çok düşük çözünürlüğe sahip olan kalay, seryum, galyum, zirkonyum ve toryumun biyolojik etkisi olmadığı düşünülmektedir. Demir, molibden ve mangan düşük toksisiteye sahip biyolojik olarak önemli iz elementlerdir. Çinko, nikel, bakır, vanadyum, kobalt, volfram ve krom toksik fakat biyolojik olarak orta derecede önemli iz elementlerdir. Arsenik, gümüş, antimon, kadmiyum, cıva, kurşun ve uranyum çok az faydalı fonksiyonu bulunan toksik elementlerdir (Pal vd., 2015).

Çalışma alanı olarak seçtiğimiz Burdur Gölü yıllarca sanayi ve şehirsiz atıklara maruz kalmış bir göldür. Bu göl daha önce ağır metal dirençli mikroorganizmalar açısından hiç incelenmemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada Burdur Gölü'nden izole edilen bakterilerin ağır metal dirençliliği ve antibiyotik duyarlılıkları kültürel ve moleküler yöntemler ile incelenecektir.

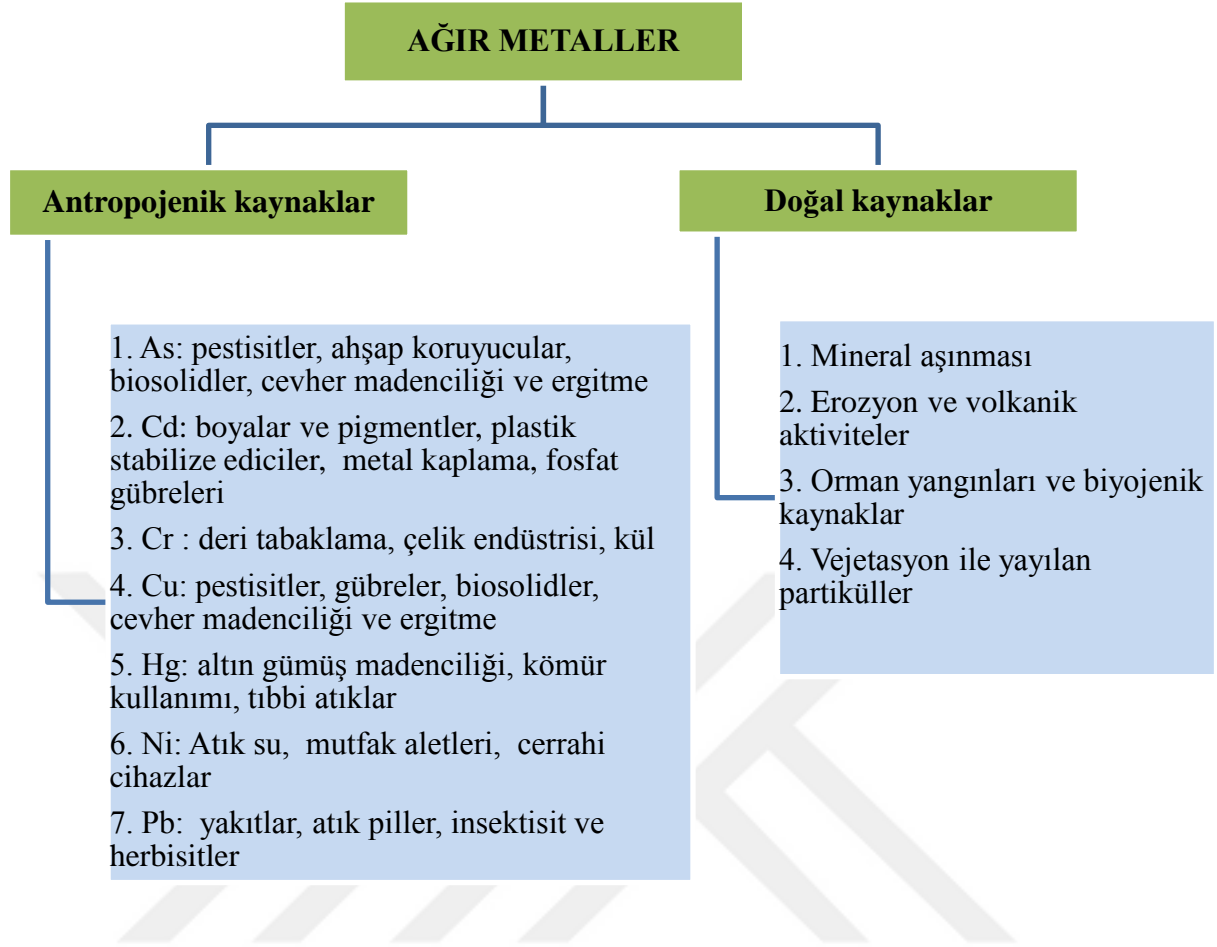
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Burdur Gölü

Burdur Gölü 37° 45' Kuzey ve 30° 13' Doğu koordinatları arasında Burdur ve Isparta illeri sınırları içerisinde konumlanmış bir göldür. Yüzey alanı 205 m² ve derinliği maksimum 60 m olan tuzlu bir göldür. Gölün iyonik tipi Na-Mg-(Cl)-SO₄-HCO₃ dür. Göl yağmur suları, sezonluk ve kalıcı akıntılar, dereler ve yer altı su kaynaklarından beslenmektedir. Güneybatıda Bozçay ve Ulupınar doğuda ise Bayındır, Büğdüz, Kara Çerçin ve Keçiborlu su kaynaklarından önemli olanlarıdır. Göl ile ilgili olarak sıcaklık mevsimsel olarak değişmekle beraber 6,3 - 24,9 °C, çözülmüş oksijen 6,76 - 16,73 mg/L, oksijen doygunluğu %80 - %125, elektriksel iletkenlik 9,6 - 31,4 µS/cm, tuzluluk 18,3 – 19,3 ppt, toplam çözülmüş katı madde 27,04 – 34,3 mg/L, askıda katı madde 8,42 – 18,65 mg/L, Klorofil-a 0,7 – 16,7 mg/m³, Secchi diski görünürlüğü 1,1 – 6,01 m, renk 12- 26 Fau, bulanıklık 1 – 7 pt/Co, kimyasal oksijen ihtiyacı 177 – 1227 mg/L, PO₄P 0,021 – 0,463 mg/L ve NO₃N 0,03 – 2,1 mg/L olarak rapor edilmiştir. Burdur Gölü'nde 17 fitoplankton ve 4 zooplankton taksonu tespit edilmiştir. Göldeki kirliliğin artışı ise gölün en büyük sorunları arasında yer almaktadır (Turna vd., 2005). Son yıllarda kirlilikte ciddi oranlarda artış gözlemlenmektedir; bölgesel araştırmalar ise gölün özellikle Burdur merkez ve organize sanayiye yakın kısmında kirliliğin daha yoğun olduğunu göstermektedir. Göle gelen kirlitici kaynakların başında şeker fabrikası gelmektedir. Atıklarında yüksek oranda nitrat ve fosfat vardır. Gölü kirlitici diğer kaynaklar, tarım arazilerinden dönen sular ve Burdur kentinin atıklarıdır. Bu atıkların aynı zamanda ağır metal kirliliğinin de başlıca sebeplerinden olduğu bilinmektedir. Burdur ili atık su arıtma tesisi faaliyet göstermesiyle bu kirliliğin önüne geçildiği düşünülmektedir fakat yıllarca bu atıkların gölde yaptığı kirlenme etkilerini göstermeye devam etmektedir.

2.2. Ağır Metal Kirlilik Kaynakları

Doğal olarak oluşan ağır metaller, organizmalar tarafından kolayca alınması mümkün olmayan çözünmez formlarda bulunur. Bu ağır metallerin toprakta adsorbsiyonu çok yüksektir ve bu nedenle organizmalar tarafından alınımı zordur. İnsan faaliyetleri ile açığa çıkan ağır metaller ile karşılaştırıldığında doğal olarak bulunan ağır metaller ile toprak arasındaki bağın enerjisi çok yüksektir. Ağır metallerin açığa çıktığı doğal prosesler göktaşları, erozyon, volkanik aktiviteler ve minerallerin aşınmasıdır (Ayangbenro ve Babalola, 2017). Ağır metal kaynakları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Ağır metallerin doğaya yayılma kaynakları (Dixit vd., 2015).

Ağır metaller yer kabuğunun tamamında bulunan doğal elementler olmasına rağmen, son yıllarda nüfus artışına bağlı olarak artan ihtiyacı karşılamak nedeni ile gerçekleştirilen madencilik ve eritme işlemleri, endüstriyel faaliyetler, metal ve metal içeren bileşiklerin yaygın olarak ev içi ve tarımsal kullanımı gibi faaliyetler nedeni ile çevreye artan oranlarda yayılmıştır ve organizmalar daha sık maruz kalmaktadır. Çevresel kirlenme, metal korozyonu, atmosferik çökeltme, erozyon neticesinde topraktan metal iyonlarının ayrışması ve süzülmesi, sedimentin re-süspansiyonu ve su kaynaklarından toprağa ve yeraltı sularına metallerin buharlaştırılması yoluyla oluşabilir. Endüstriyel kaynaklar, rafinerilerde metal işleme, enerji santrallerinde kömür yakma, petrol yakma, nükleer enerji santralleri ve yüksek gerilim hatları, plastik, tekstil, mikroelektronik, ahşap koruma ve kağıt işleme faaliyetlerini kapsamaktadır (Tchounwou vd., 2012).

Kadmiyum yerkabuğunda yaklaşık 0,1 mg/kg ortalama konsantrasyonda bulunur. Doğada kadmiyum bileşiklerinin en yüksek seviyesi tortul kayalarda görülmektedir ve deniz fosfatları yaklaşık 15 mg/kg kadmiyum içerir. Kadmiyumun başlıca endüstriyel uygulamaları alaşımların, pigmentlerin ve pillerin üretimini içerir. Pillerde kadmiyum kullanımı son yıllarda önemli bir artış göstermiş olmasına rağmen, çevresel kaygılara yanıt olarak gelişmiş ülkelerde ticari kullanımı azalmıştır (Tchounwou vd., 2012). Kadmiyum kaplamaları, özellikle deniz ve havacılık gibi yüksek stresli ortamlarda, kaplara ve diğer taşıtlara iyi bir korozyon direnci kaplaması sağlar. Kadmiyumun diğer kullanımı, pigmentler, polivinil klorür (PVC) için stabilizatörler, alaşımlar ve elektronik bileşikler olarak bulunmaktadır. Kadmiyum, fosfat gübreleri, deterjanlar ve rafine edilmiş petrol ürünleri de dahil olmak üzere birçok üründe saf olmayan bir madde olarak bulunur. Buna ek olarak, asit yağmurları ve sonuçta toprak ve yüzey sularının asitlenmesi ile kadmiyumun jeokimyasal hareketliliğini arttırmıştır. Kadmiyum, çinkonun kaçınılmaz bir yan ürünü olarak üretilir ve bazen rafine edilir (Wuana ve Okieimen 2011, Akhand vd. 2016).

Kadmiyum, klorürler, hidroksil, sülfhidriller ve tiol grupları ile birlikte çözünür kompleksler oluşturur ve kadmiyumun biyolojik aktivitesi büyük ölçüde bu komplekslerin varlığına bağlıdır (Vig vd. 2003).

Cıva, vücuttaki dokularda ciddi hasarlara neden olan, yaygın bir çevresel toksik bileşik ve kirleticidir. Organizmalar, çevrede çeşitli cıva formlarına maruz kalmaktadırlar. Bunlar, cıva buharı (Hg_0), inorganik (Hg^{+1} , Hg^{+2}) ve organik cıva bileşiklerini içerir (Tchounwou vd., 2012).

Cıva döngüsünde atmosfere doğal olarak ve tekrar salınan cıva emisyonları çok önemli faktörlerdir. Doğaya cıvanın yayılmasında; mineral kaynaklardan cıvanın buharlaştırılması, kontamine su ve karasal sistemlerden cıvanın uzaklaştırılması (Hg_2C 'nin Hg_0 'ya düşürülmesi yoluyla), volkanik emisyonlar ve orman yangınları önem kazanmaktadır. Cıvanın antropojenik emisyon kaynakları çoğunlukla; katı atık yakma (belediye ve tıbbi atıklar), kömür ve yağ yakma, pirometalurjik süreçler (demir, kurşun ve çinko) ve altın üretimidir. Bu kaynaklar arasında kömür yakma ve katı atık yakma toplam küresel emisyonların yarısından fazlasını oluşturmaktadır (Wang vd., 2004).

Cıva, özellikle metil cıva ve etil cıva gibi uçucu alkile edilmiş bileşikler şeklinde veya Hg_0 elemental formda ve aynı zamanda, suda çözünebilen kompleks bileşikler halinde bulunabilir. Cıva, sülfür ve klor içeren bileşiklerin yanı sıra organik bileşikler ve organik maddeler üzerine güçlü bir affinite gösterir (Janowska vd., 2017).

Kurşun, yerkabuğunda az miktarda bulunan doğal olarak oluşan mavimsi-gri bir metaldir. Kurşun ortamda doğal olarak bulunsa da, fosil yakıtların kullanılması, madencilik ve endüstriyel üretimi gibi antropojenik faaliyetler yüksek konsantrasyonlarının salınmasına katkıda bulunur. Kurşun birçok farklı endüstriyel, tarımsal ve evsel uygulamalarda, kurşun-asit piller, mühimmat, metal ürünleri (lehim ve borular) üretiminde ve X-ışınlarından korunmak için kullanılmaktadır. 2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli endüstriyel uygulamalar için tahmini olarak 1.52 milyon metrik ton kurşun kullanılmıştır. Bu miktarın yaklaşık % 83'ünü kurşun akü üretimi, kalan kısmını mühimmat (% 3.5), boya, cam, pigment ve kimyasallar için oksitler (% 2,6) ve kurşun (% 1,7) üretimi oluşturmaktadır (Tchounwou vd. 2012).

Endüstriyel alanlardaki toplam Pb konsantrasyonu 10000 mg/kg 'ye kadar ulaşabilirken, topraktaki ortalama değer 10 ila 100 mg/kg arasındadır. Buna ek olarak, endüstriyel atık sularda Pb (II) seviyesi, 200-250 mg/kg seviyesine ulaşırken, kabul edilen kalite standartlarına göre, 0,05-0,10 mg/kg seviyesinin aşmamalıdır (Jarosławiecka ve Piotrowska-Seget, 2014).

Pb (II), Mn (II) ve Zn (II) gibi temel elementler gibi aktif taşıma yoluyla bakteriyel hücrelere girer. Pb'nin biyolojik olarak önemi bilinmemektedir ve çok düşük konsantrasyonlarda toksiktir. Pb'nin toksisitesi biyolojik olarak hücre içine alınabilir formda bulunup bulunmamasına bağlıdır (Jarosławiecka ve Piotrowska-Seget, 2014).

Çevrede bulunan önemli kirleticilerden olan kurşun ve kadmiyum, hücre zarlarına zarar verebilen, enzimlerin özelliğini değiştiren ve DNA'ya hasar verici özellikte olup insanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar için oldukça zehirlidir. Bu toksisite, kurşun ve kadmiyumun hücrede yararlı fonksiyonu olan metallerin yerine bileşiklere bağlanması ile gerçekleşmektedir (Marzan vd., 2017).

Arsenik çevresel örneklerin neredeyse tümünde düşük konsantrasyonlarda tespit edilen bir elementtir. Arsenik'in başlıca inorganik formları, arsenit (+3 değerlikli formu) ve arsenat'tır (+5 değerlikli formu). Arsenik' in organik formlarından olan metillenmiş bileşikler; monometilarsonik asit (MMA), dimetilarenzik asit (DMA) ve trimetilarsin oksit'tir (Tchounwou vd., 2012).

Metaloid arsenik çevreye ve insanlara karşı oldukça toksik olduğu ve madencilik ve ilgili faaliyetlerden (cevher işleme vb.) gelen endüstriyel atık su akımlarında bulunması nedeniyle asıl endişe kaynağıdır. Ahşap işleme endüstrisi ve ahşap yanması, karbon ve petrol işleme, rafineri ve yanma, jeotermal işlemler, tarımsal kimya endüstrisi (örneğin böcek ilacındaki yabancı maddeler) ve tarım atıksuyunun uygulamaları, atık su arıtma çamuru ve

belediye katı atık yakımı gibi faaliyetler doğaya metaloid arsenik salınımının en önemli nedenleridir (Hayat vd., 2017). Çeşitli endüstriler ve çevreye yaydığı ağır metaller Çizelge 2.1’de ve ağır metallerin insan sağlığı üzerindeki etkileri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ağır metaller ve yayılımına sebep olan endüstriyel faaliyetler (Kahvecioğlu vd., 2003).

ENDÜSTRİ	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-Alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	-	+	+
Demir-Çelik Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 2.2. Ağır metallerin insan sağlığı üzerinde etkileri (Dixit vd., 2015).

Ağır Metal	EPA Regulatory Limit (ppm)	Toksik Etki
Ag (Gümüş)	0,10	Deri veya diğer vücut dokularının maruz kalmaya dayalı gri veya mavi-gri renk alması, solunum problemleri, akciğer ve solunum yolları iltihabı ve karın ağrısı.
As (Arsenik)	0,01	Oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi gibi önemli hücresel işlemleri etkiler
Ba (Baryum)	2,0	Kardiyak aritmi, solunum yetmezliği, mide-bağırsak işlev bozukluğu, kas seğirmesi ve yüksek kan basıncı
Cd (Kadmiyum)	5,0	Kanserojenik, mutajenik, endokrin bozucu, akciğer hasarı ve kırılğan kemikler, biyolojik sistemlerde kalsiyum regülasyonunu etkiler
Cr (Krom)	0,1	Saç ve kıl kaybı
Cu (Bakır)	1,3	Beyin ve böbrek hasarı, yüksek seviyeler karaciğer sirozu ve kronik anemi, mide ve bağırsak tahrişi ile sonuçlanır
Hg (Cıva)	2,0	Otoimmün hastalıklar, depresyon, uyku hali, yorgunluk, saç dökülmesi, insomnia, hafıza kaybı, huzursuzluk, görme bozukluğu, titreme, öfke patlaması, beyin hasarı, akciğer ve böbrek yetmezliği.
Pb (Kurşun)	15	Çocuklarda aşırı maruz kalma, bozulmuş gelişim, zekâ geriliği, kısa süreli hafıza kaybı, öğrenme ve koordinasyon problemleri, kardiyovasküler hastalık riskinde artış
Se (Selenyum)	50	300 µg/gün civarında diyet maruziyeti, endokrin sistemini etkilemektedir

2.3. Ağır Metal Direnci

Ağır metaller ile ilgili olarak "direnç" ve "tolerans" terimleri sıklıkla literatürde eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Bir metal için bakteriyel detoksifikasyonun spesifik bir mekanizmasının karakterize edilmesi mümkün olduğunda "direnç" teriminin kullanılması önerilir. Dolayısıyla, tolerans terimi, bu sürecin mekanizmasının araştırılmadığı her durumda, bir metalin yüksek konsantrasyonlarında bir bakteri türünün gelişme kabiliyetine atıfta bulunmak için daha uygun gözükmetedir (Lima e Silva vd., 2012).

Birçok mikroorganizma ağır metalleri kullanarak detoksifikasyon ve solunum mekanizması geliştirmiş ve buna direnç kazanmıştır. Ağır metal dirençli bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu, metal birikimi kabiliyeti ve direnç kapasitesi açısından önemlidir (Marzan vd., 2017).

Ağır metallere karşı direnç, özellikle *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* ve *Burkholderia* gibi Gram negatif bakterilerde gözlenmiştir. *Pseudomonas* türleri iyi çalışılmıştır ve sadece ağır metallere ve diğer toksik maddelere karşı yüksek dirençleri nedeniyle değil aynı zamanda basit beslenme gereksinimleri ve standart laboratuvar ortamında hızlı büyüme özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Ceylan ve Ugur, 2012).

Ağır metallerin mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkileri, pH, şelatlama ajanlarının konsantrasyonu, mikroorganizmanın genetik özellikleri ve organik maddeler gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu elementlerin çevrede bulunmasının ekosistemler üzerindeki etkileri, biyokütle değişiklikleri, mikrobiyolojik çeşitliliğinin değişimi ve elementlerin döngüsünün bozulması şeklinde özetlenebilir (Lima e Silva vd., 2012).

Metal stresli koşullar altında bakteriler ağır metal iyonlarının alımını tolere edebilmek için modifikasyon mekanizmaları geliştirirler. Bu mekanizmalar arasında, metal iyonlarının hücre dışına çıkışı, metal içindeki iyonların hücre içine birikimi ve kompleksasyonu ve ağır metal iyonlarının daha az toksik forma indirgenmesi bulunmaktadır. Bakteriler ağır metallere zengin çevrelere kromozomal, transpozon ve plazmid aracılı direnç sistemleri ile adapte olmuşlardır (Sevgi vd., 2010).

Ağır metallerin çevreye girişi, mikrobiyal komünite yapısında ve işlevinde önemli değişikliğe neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, antibiyotiklere dirençli bazı bakterilerin, aynı zamanda ağır metallere de direnç gösterdiği belirlenmiştir (Matyar vd., 2008).

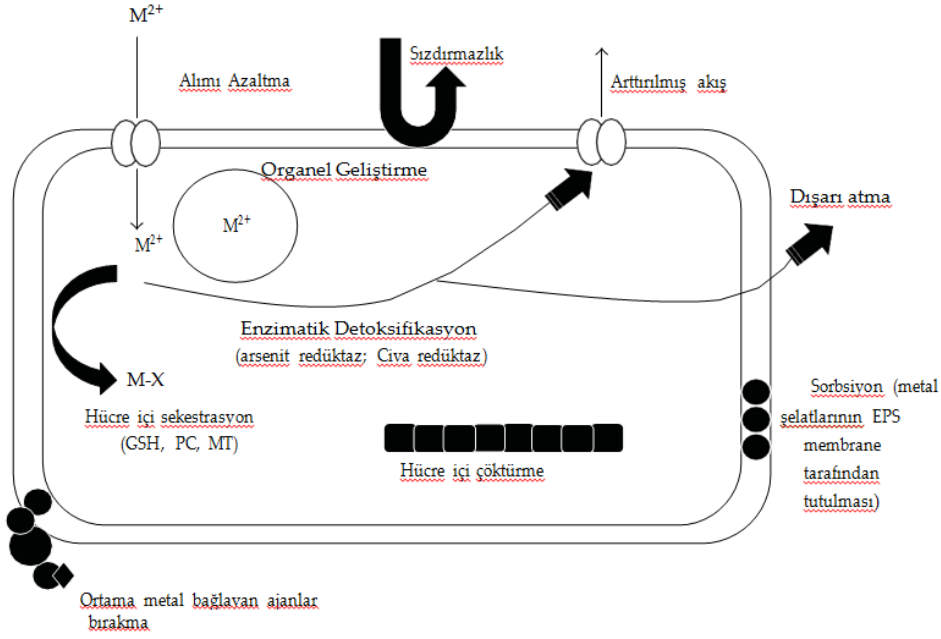
Gümüş, cıva, kurşun, alüminyum, kadmiyum, altın ve arsenik gibi ağır metaller mikroorganizmalar için potansiyel toksik ağır metallerdir. Toksikite ağır metallerin,

fonksiyonel ve hücre için ihtiyaç duyulan metallerin yerine bağlanması ile gerçekleşir. Yüksek ağır metal konsantrasyonları hücre zarının yapısal bütünlüğünü bozar, enzimatik özgülüğünü değiştirir, hücresel işlevleri engeller ve DNA'ya hasar verir. Metal homeostazi, bakterilerde ve ökaryotlarda iyi çalışılmıştır ve P1B-tipi ATPazlar, ABC taşıyıcıları, katyon difüzyon kolaylaştırıcıları (CDF'ler) ve metaloşaperonlar gibi metallere yanıt olarak düzenlenen taşıyıcıların farklılaştırılmış kontrolü ile ilişkilendirilmiştir (Kowshik, 2013).

Mikroorganizmalar geliştirdikleri metal direnç sistemleri ile metallerce zengin ortamlara uyum sağlamışlardır. Ağır metal direnci mikroorganizmalarda genelde spesifik olarak plazmid kodludur. Ağır metal direnci ile ilgili çalışmalar 1970'li yıllarda birkaç bakterinin ağır metale direnç göstermesi keşfedilerek başlamıştır. İlk çalışılan mikroorganizmalar genelde aerobik ve genel mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılmaya uygun olan; *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus sp.* türleridir (Nakahara vd., 1977; Marques vd., 1979; Harnett ve Gyles, 1984; Schwarz ve Hobel, 1989; Belliveau vd. 1991; Wang ve Shen, 1995). Dirençli tespit edilmiş mikroorganizmalardan bazıları Çizelge 2.3'de belirtilmiştir. Ağır metal direnç çalışmalarında ilk olarak cıva veya organomercuriyellere karşı direnç dikkat çekmiştir. Fakat düşünülenin aksine ağır metal direncinin yaşamın başlangıcı ile başladığı ve bugüne kadar geliştiği savunulmaktadır (Ji ve Silver, 1995). Ağır metal direnç sistemleri ve antibiyotik direnç sistemleri arasında paralel ilerleyen bir ilişki olduğu bilinmektedir (Nakahara vd. 1977; Harnett ve Gyles, 1984; McEntee vd. 1986; Schwarz ve Hobel, 1989; Belliveau vd. 1991). Bazı durumlarda her iki direnci kodlayan genlerde aynı plazmid üzerinde taşınmaktadır (Nakahara vd. 1977). Direnç sistemleri bazı durumlarda sadece direnç değil aynı zamanda ortamda bulunan ağır metallerin toplanması ve indirgenmesi şeklinde çalışmaktadır. Bu tip sistemler canlılar ve doğa için temizleyici görev yapabileceği için üzerinde durulması gereken bir konudur. Mikroorganizmalar ağır metallere karşı adaptasyon sürecinde farklı kromozomal , transpozon ve plazmid kodlu sistemler geliştirmiştir (Bruins vd., 2000). Direnç sistemleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Ağır metal dirençliliği tespit edilmiş mikroorganizmalar ve izole edildikleri kaynaklar (Yavuz ve Sarıgül, 2016).

Mikroorganizmanın Türü	Direnç Gösterdiği Metaller	İzole Edildiği Yer	Kaynak
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Cu, Hg	Atık su	Hassen vd. (1998)
<i>Bacillus</i> sp.	As	Toprak	Cavalca vd. (2010)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Zn	Toprak	Cavalca vd. (2010)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Cd	Toprak	Cavalca vd. (2010)
<i>Micrococcus luteus</i>	Pb	Toprak	Cavalca vd. (2010)
<i>Variovorax paradoxus</i>	Ag	Gümüş madeni yakınlarından	Cavalca vd. (2010)
<i>Bacillus arsenicus</i>	Co, Se, Hg , As, Cu, Zn, Mg, Cd, Pb	Sediment	Nithya vd. (2011)
<i>Planococcus maritimus</i>	Co, Se, Hg, As, Cu, Zn, Mg, Cd, Pb	Sediment	Nithya vd. (2011)
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Co, Se, Hg, Mn, As, Cu, Mg, Cd, Pb	Sediment	Nithya vd. (2011)



Şekil 2.2. Bakteriler, ökaryotlar ve arkealarda metal direncinin genel mekanizmaları (Kowshik, 2013).

Ağır metal direnç sistemleri genel olarak 6 başlıkta incelenmektedir

2.3.1. Metalin Hücre İçine Alınmasının Engellenmesi

Hücre duvarı veya zarındaki değişiklikler yoluyla geçirgenliği azaltarak veya bu iyonları eksopolisolisakkarit tabakayla bağlayarak toksik metal iyonlarının hücre içine alınması engellenmektedir. Bu sistemin en önemli örneği, membrandaki porin proteininin değiştirilmesi yoluyla *E. coli* B'de metal iyonlarının hücre içine girişinin engellenmesidir (Rouch vd., 1995). Bu sistem genellikle tek bir genetik mutasyonla oluşur ve zarın metal iyonlarına geçirgenliğini azaltır (Ji ve Silver, 1995). Başka bir sistem, metal iyonlarının hücre duvarı veya zar tarafından spesifik olarak bağlanmasıdır. Bu şekilde, metal bağlanma noktaları doygunluğa erişene kadar korunmaktadır (Beveridge ve Murray, 1976; Hoyle ve Beveridge, 1983). Bakterilerde, hücre dışı tabaka, canlılığı sürdürmek için gerekli olan metal iyonlarını tutar ve depolanmasına katkıda bulunur (Scott vd., 1988; Scott ve Palmer, 1990). Kadmiyum iyonlarının ekstraselüler birikimi genellikle bu sistemle gerçekleşir. *Klebsiella aerogenes*'de bulunan hücre dışı kapsül, kadmiyum iyonlarının hücre içine alınmasını engeller (Mergeay, 1991). *Pseudomonas sp.* periplazmik bağlantı sistemindeki bakır iyonlarına karşı, *copA*, *copB*, *copC* ve *copD*'nin oluşturduğu dört genden meydana gelen operon ile direnç

sağlar. *copA* ve *copB*, kısmi bakır direnci sağlarken, *copC* ve *copD*, tam bakır direncine katkıda bulunur (Silver ve Walderhaug, 1992; Silver ve Ji, 1994). Bu sistemler, metal iyonlarının hücrenin içine girmesini önlemek için oluşabilecek konformasyonel değişiklikleri gösterir. Bu sistem genelde düşük seviyelerde 0.01 ve 0.1 nM kadmiyuma maruz kalma durumunda oluşmaktadır (McEntee vd., 1986).

Cıva içeren organik bileşiklerin parçanmasını da içeren geniş spektrumlu cıva direncini sağlayan proteinleri (MerB, MerG) kodlayan genlerin dağılımı evrimsel olarak MerA proteinini kodlayan genlerin dağılımından farklılık gösterir. *merB* genleri *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* üyelerinde tespit edilmiştir. Fenilcıva molekülün hücresel geçirgenliğinin azaltılmasında etkili olan proteinleri kodlayan *merG* geni ise sadece, 5 farklı operonda saptanmıştır. Bunlardan üç tanesi pseudomonadlarda bulunurken iki tanesi topraktan izole edilen plazmitlerde belirlenmiştir. *merG* geni ya da bu genin homologunun bulunmadığı hiçbir operonda *merB* geni de saptanmamıştır. Bu durum bu iki gen arasında güçlü pozitif korelasyon bulunduğunu göstermektedir (Pearson R = 0.23, p = 0.01) (Boyd ve Barkay 2012).

2.3.2. Metal İyonlarının Hücre Dışına Taşınması

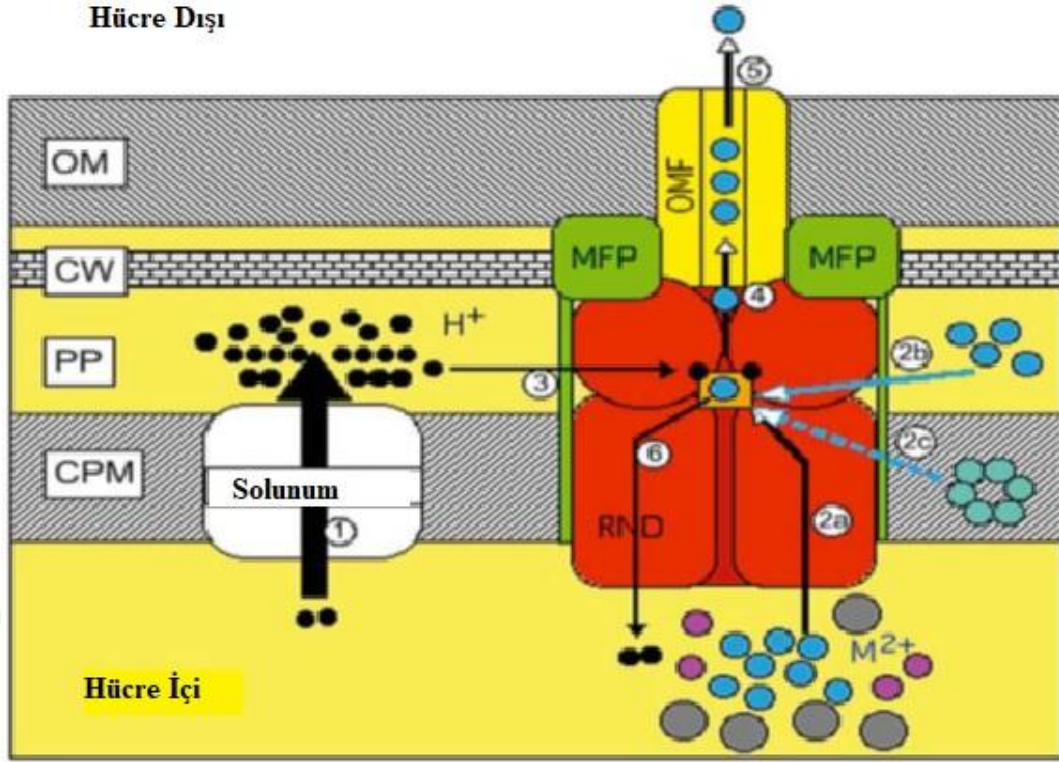
Aktif taşıma ya da efflux sistemler metal direnç sistemleri içinde en sık rastlanan sistemdir. Mikroorganizmalar hücre içine girmiş olan toksik metal iyonlarını aktif taşıma yolu ile sitoplazma dışına taşır. Bu sistemler kromozom veya plazmidler üzerinde kodlanmış olabilir. Sistemde mikroorganizma için gerekli olmayan metaller besin maddelerindeki gibi hücre içine alınır fakat hızlı bir şekilde sitoplazma dışına atılır (Silver ve Walderhaug, 1992). *E. coli* ve *S. aureus*'da plazmid kodlu *ars* operonu tarafından As(V) ve As (III) direnci, *S. aureus*, *Bacillus sp.* ve *Listeria sp.*'de *cad* operonu ve *Alcaligenes eutrophus*'da bulunan *czc* operonu tarafından sağlanan kadmiyum direnci ve *E. coli*'de bulunan *zntA* operonu ve *S.aureus*'da bulunan *cadA* direnç sistemleri örnek olarak verilebilir (Silver ve Walderhaug, 1992; Nies,1992; Ji ve Silver, 1995; Rensing vd. 1998).

Toksisitenin oluşması için metallerin hücrenin içine girmesi gerekir. Mikroorganizma membranda bulunan ve metallerin hücre içine taşınmasını sağlayan taşıyıcı proteinlerin miktarını azaltıp, hücre içine girmiş toksik ağır metallerin hücre dışına taşınmasını sağlayan proteinlerin miktarını ilgili genlerin regülasyonu ile arttırabilir. Membrandaki bu taşıyıcı proteinlerin toksik atık boşaltım pompası olarak kullanılması mikroorganizmalardaki en yaygın inorganik iyon direnci mekanizmalarındandır (Kowshik, 2013).

Protein aileleri arasında, ATP hidroliziyle yönlendirilen P-tipi ATPazlar, kimyasal asimetrik iyon-proton değiştirici olarak görev yapan katyon difüzyon kolaylaştırıcı aile taşıyıcıları ve proton tarafından yönlendirilen akışa aracılık eden taşıyıcıların dirençli nodülasyon bölümü (RND) ailesi bulunur. Genellikle, metal dirençli bakterilerde birden fazla efflux proteini bulunur. *czcCBA*, bir CBA taşıyıcılarıdır. Bu yapısal gen bölgesi direnç-nodülasyon hücre bölünme protein ailesinin dış zar faktörleri *czcC*, membran füzyon proteini *czcB* ve *czcA* proteinini kodlar. Bu ihraç eden genlerin transkripsiyonel yanıtları, *merR* aile regülatörleri, *arsR/smtB* ailesi ve iki bileşenli sistemler de dahil olmak üzere farklı düzenleyiciler tarafından kontrol edilir (Eghomwanre vd. 2016).

RND protein ailesi ilk olarak ağır metal direnci (*Ralstonia metallidurans*), nodülasyon (*Mesorhizobium loti*) ve hücre bölünmesi (*E. coli*) ile ilişkili bakteri transport proteinleri grubu olarak tanımlanmıştır. Bu protein ailesi yedi protein ailesini barındıran ve tüm organizma ana gruplarında bulunan büyük bir süper-protein ailesine dönuşmüştür. Bakteri ve arkeada bu süper ailenin üyeleri, ağır metallerin, hidrofobik bileşiklerin, amfibilerin, nodülasyon faktörlerinin proteinlerle taşınmasına SecDF ile katılırlar. Ökaryotların RND süper familyasına ait proteinler sterollerin taşınmasında reseptör olarak görev yaparlar. RND süper familyasına dahil olan ve ağır metal direnci ile ilişkili olan membran taşıma proteinleri (HME-RND) Milton Saier fonksiyonel filogenetik sınıflandırma sisteminde TC 2.A.6.1.1 numarası ile kayıtlıdır (Nies, 2003).

şekil 2.3'de RND proteinlerinin hücre fonksiyonu ve mekanizması gösterilmektedir. Bu model, AcrB, TolC'nin yapısal özelliklerine ve yayınlanmış biyokimyasal verilere bağlı olarak oluşturulmuştur. RND proteini (kırmızı), üç alt birimden oluşan, periplazmik substrat bağlama bölgesine sahip olan bir proteindir. MFP proteini yeşil, OMF sarı renkte gösterilmektedir. RND proteinlerinin aktivitesi için gerekli enerji, daha önce solunum zincirinde oluşan protonlar (siyah renkli noktalar) tarafından sağlanır. HME1 ve HME2 proteinleri (turuncu renkli, 2a) ise, periplazmik substrat bağlama noktasında bulunurlar ve iki değerlikli ağır metal iyonlarının (mavi, mor, gri renkli daireler olarak gösterilmiştir) geçtiği bir katyon kanalı olarak görev yaparlar.



Şekil 2.3. RND proteinlerinin hücre içi fonksiyonları.

2.3.3. Metallerin Hücre İçi Biriktirilmesi

Mikroorganizmanın sitoplazmasına giren ağır metalleri biriktirerek hücre bileşenlerini toksik etkilerden koruyan bir sistemdir. Hücrede depolanan metaller genellikle kadmium, bakır ve çinkodur. Bu sistemin iki önemli örneği dikkat çekmektedir; *Synechococcus* sp. ve *Pseudomonas* sp. Sistein zengin bir proteindir (Rouch vd., 1995; Silver ve Phung, 1996). *Synechococcus* sp. Direnç sistemi iki gruptan oluşur: *smtA* ve *smtB*. *smtA* kadmium, bakır ve çinko bağlayıcı metalotiyonin proteininin üretiminden sorumludur (Silver vd., 1989; Silver, 1992). Bu gen, kadmium, bakır ve çinko varlığında yüksek seviyelerde indüklenir ve *smtB* üretimini bastırır. *smtB* bastırıldığında, *smtA* gibi davranır ve metalothionin üretir (Silver vd., 1989). Bugüne kadar sadece *Synechococcus* sp. Siyanobakteri türleri, prokaryotik metallothionin üretimini göstermiştir (Silver vd., 1989). Bu tip sistein içeren metalotiyonin üretimi, ilk olarak bu türlerde hayvanlardan sonra gözlenmiştir (Silver vd., 1989). Hücre içi birikimini gösteren diğer organizma, kanalizasyondan izole edilen *Pseudomonas putida* türleri (Trevors vd., 1986) 'dir. Bu mikroorganizma metalothionuna benzer üç farklı düşük molekül ağırlıklı sistein zengin protein üretimi vardır. *Mycobacterium scrofulaceum*'da, bakır iyonlarının siyah bakır çöktelleri olarak çökeldiği gözlenmiştir (Mergeay, 1991).

İnorganik katyonların ve anyonların hücre içi konsantrasyonlarının düzenlenmesi için temel işlemler membran taşıma sistemleridir. Belirli koşullar altında metal iyonları yüksek substrat özgülüğü olan alım sistemleri ile biriktirebilir. Böylece, nikel beş protein alt biriminden oluşan çok-bileşenli sistemin yüksek afiniteli ABC-tipi iyon nakil prokaryotik hücreler tarafından alınır; NikA-E (Margaryan vd., 2013).

2.3.4. Metallerin Hücre Dışında Biriktirilmesi

Ekolojik ve pratik açıdan biyosorpsiyon en önemli süreçtir. Bakterilerdeki ekstraselüler tabaka yapısındaki anyonik fonksiyonel gruplar ile Cd, Pb, Fe ve Zn gibi çok sayıdaki katyonik metalleri immobilize eder. Bu biyoabsorpsiyon genellikle karbonhidratlar, polisakkaritler ve bazen nükleik ve yağ asitlerinden oluşan mukoz ekstraselüler tabakaların etkisi ile gerçekleştirilir. Metal iyonlarının hücre yüzeyine bağlanması çeşitli mekanizmalar ile gerçekleştirilir. Bunlar; elektrostatik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, kovalent bağlanma, redoks etkileşimleri ve ekstraselüler çöktürme veya bu işlemlerin bazı kombinasyonlarını içeren çeşitli mekanizmalardır. Aktivasyon halindeki fonksiyonel gruplar, kitin içindeki asidamido grupları, peptidoglikozitlerdeki amin grupları, proteinlerdeki sülfhidral ve karboksil grupları, fosfat, fosfodiester ve polisakkaritlerdeki hidroksil grupları biyosorpsiyon sürecinde yer alır. Bisorpsiyon prosesinde görev alan fonksiyonel gruplardan bazıları; kitinde asitamid grupları, peptidoglikozitlerdeki amin grupları, proteinlerdeki sülfidril ve karboksil grupları, polisakkaritlerdeki fosfat, fosfodiester ve hidroksil gruplarıdır. Bakteriler, yüksek yüzey hacim oranları ve potansiyel olarak aktif kemisorpsiyon sahalarının geniş olması nedeniyle mükemmel biyosorbentlerdir (Banik vd., 2014).

Metal iyonlarının hücre dışı birikimi, bazı küf ve mayalarda da görülen bir ağır metal direnç sistemidir (Joho vd., 1995). Maya içinde bir çeşit Nikel (II) direncinin bu sisteme dayandığı düşünülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* glutatyon yoluyla Nikelin adsorpsiyonunu azaltır (Murata, 1985). Glutatyon ağır metaller için yüksek afiniteye sahiptir. Metalce zengin ortamdaki mayaların, hücre dışı metallere bağlanan glutatyondan sorumlu olan metilglükokal dirençli geni taşıdıkları gözlemlenmiştir (Murata, 1985). Direnç metalleri hücrenin dışına bağlanarak hücrenin içine giremezler. Benzer bir mekanizma mantarlarda Bakır (II) direncinde de gözlemlenmiştir (Murphy ve Levy, 1983). Bu mantarlar, ağır metallerle oksalat kompleks oluştururlar. Mayalar ve *Citrobacter* sp. gibi bazı diğer organizmalar kadmiyum fosfat gibi çözünmez komplekslere ve ağır metallere karşı dirençlidir (McEntee vd., 1986). Mayalar ve *Citrobacter* sp. direnç için sülfid ve fost üretimini kullanırlar. *K. aerogenes* kadmiyum (II) iyonlarını, etrafına taşıyarak sülfid salınan suşun çevresine çöker.

Bu ulaşım çökelti oluşumu doymuş hale gelene kadar devam eder (Aiking vd., 1985, Scott ve Palmer, 1990).

Mikrobiyal ağır metal remediasyonunun bir başka mekanizması sideroforları içermektedir. Sideroforlar demir alımını kolaylaştırmak için bakteri, mantar ve bitkiler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı şelatlama maddeleri (200-2000 Da)'dir. Sideroforlar mikroorganizmaların demir ihtiyacı derecesinin değişimine bağlı olarak farklı afiniteleri olan birçok metali şelatlayabilir. Demir dışındaki metaller bakteriler tarafından siderofor üretimini harekete geçirebilir, bu nedenle sideroforları demir dışındaki metallerin homeostazında ve özellikle ağır metal toleransına neden olabilir. Sideroforların, demir dışında alüminyum, galyum ve krom alınımında da etkilidir (Banik vd. 2014).

2.3.5. Enzimatik Detoksifikasyon

Cıva direnç sistemi enzimatik detoksifikasyona sahip organizmalarda en çok çalışılmış olan ve en iyi bilinen direnç sistemidir. Gram pozitif (*S. aureus*, *Bacillus* sp.) ve negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve *Thiobacillus ferrooxidans*) mikroorganizmalarda belirlenmiştir (Misra, 1992). Cıva hücre içine alındığında proteinlerde ve enzimlerde bulunan tiol gruplarına bağlanarak, proteinin aktivitesini engeller. Cıva direnci bir grup geni içeren *mer* operonu ile sağlanmaktadır. Bu operon sadece cıvanın detoksifiye edilmesini değil aynı zamanda taşınma ve hücrel direnç mekanizmalarını da düzenler (Misra, 1992; Ji ve Silver, 1995). Dirençten sorumlu proteinler cıvanın hücre içine alınması ile sentezlenmeye başlar. Ekstrasüller cıva bağlayıcı proteinler, transport proteinleri sentezlenir. Sentezlenen periplazmik proteinler cıvaya bağlanarak hücre içine alınmasını sağlar, detoksifikasyon hücre içinde gerçekleşir. Organomerküriyel liyaz ve cıvaiyon redüktaz direnç genleri tarafından salgılanan ve cıva direncinde önemli olan enzimlerdir (Weiss vd., 1997; Misra, 1992). Dar spektrumlu cıva dirençli mikroorganizmalar sınırlı organomerküriyel liyaz genlerine sahiptir ve organik cıva bileşiklerine çok fazla direnç göstermezler. Geniş spektrumlu cıva dirençli mikroorganizmalar ise her iki enzimi kodlayan genlere de sahiptirler ve organik ve inorganik cıva bileşiklerine karşı etkin dirence sahiptirler. Cıva direncini sağlayan *mer* operonu çok sayıda mikroorganizmada plazmitlerde incelenmiştir. Bu operonun beş-altı geni yaygın olarak içerdiği saptanmıştır (Misra, 1992). Bu genler, *merA* (cıva redüktaz enzimi için kodlar), *merB* (organomerküriyel redüktaz enzimi için kodlar), *merC* (*mer* proteinleri kodları), *merD* (*mer* genlerinin düzgün şekilde ekspresyonunu sağlar), *merR* (aktivatör protein kodları), *merP* (taşıma proteini kodlar, Taşıyan proteini kodlar). *mer* genleri *Shigella flexneri*'de Transposon Tn21, *S. marcescens*'de plasmid pDU 1358 ve *P. aeruginosa*'da Transposon Tn501 gibi farklı

bakterilerdeki farklı bölgelerde kodlanır. Bununla birlikte, gen ve farklı *mer* operonların fonksiyonel yapıları arasındaki benzerlik %80'in üzerinde bulunmuştur (Misra, 1992).

Arkea ve bakterilerdeki cıva direnci, Hg (II) 'nın saptanması, düzenlenmesi, taşınması ve indirgenmesinde yer alan *mer* operon tarafından sağlanır. *Archaea*'da en iyi çalışılan cıva direnci operonlarından biri termoasidofilik *Sulfolobus solfataricus*'un *merRHAI* operonudur. Operon, Hg(II) 'nın yokluğunda operatörü baskılayan ve varlığında transkripsiyonu gerçekleştiren regülatör MerR proteini ile kontrolü edilmektedir. MerH, Hg(II) 'yı bağlayan bir TRASH (taşınım, direnç ve algılama) alanına sahip metaloşaperondur. MerA Hg(II)'yı uçucu cıvaya indirgeyen ve detoksifiye eden için merkürük redüktazdır. Bazı *mer* operonları ilave *mer* genleri taşırlar. Bunlardan en dikkat çekicilerden biri *merB*'dir. Bu gen C-Hg bağlarını kopararak Hg(II)'yi, Hg(0)'a indirgeyen organomerküriyel liyaz enzimini kodlar. Bugüne kadar açıklanmış olan tüm haloarkaeal genomlar arasında sadece *Halobacterium sp.* NRC-1 ve *Haloterrigena turkmenica*'da cıva direnci sırasıyla *merA* ve *merB* genleriyle açıklanmıştır (Kowshik, 2013).

2.3.6. Hücre Hassasiyetinin Düşürülmesi

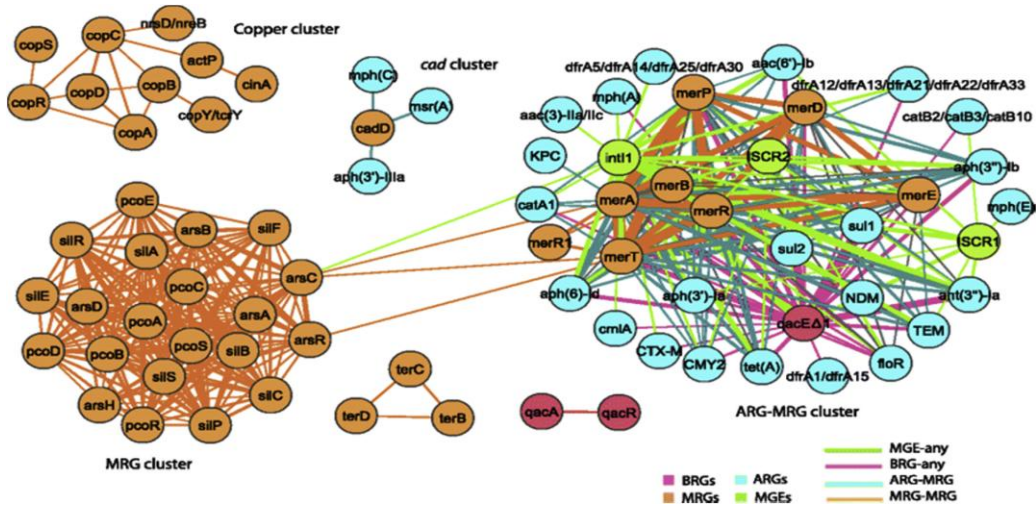
Uygun olmayan büyüme koşulları altında, tüm organizmalar stresin üstesinden gelmek için kendi bünyelerinde bazı değişiklikler yaparlar. Çevrelerindeki ağır metallerin varlığında mikroorganizmalar bunların hücre içine alınmasını engelleyici ya da hücre içinde toksik olmayan forma dönüşmelerini sağlayan transkripsiyonel düzenlemeler gerçekleştirirler (Rouch vd., 1995; Kowshik 2013). Bu değişiklikler mutasyonları içerir, oluşan mutasyonlar hücre bileşenlerinin duyarlılığını azaltır, ancak temel fonksiyonlarını etkilemez. DNA tamir mekanizması, genomik DNA ve plasmidlerin korunmasıyla sınırlıdır. Mikroorganizmalar genellikle metal dirençli bileşenlerin hassas hücre bileşenlerini sentezlediği ve koruduğu metabolik yollar geliştirir. Bu adaptasyon *E. coli*'de de gözlemlenmiştir. Kadmiyuma maruz bırakılan bir *E. coli*'de daha yüksek DNA hasarı görülürken, aynı *E. coli* yeniden kültürlendiğinde kadmiyumun direnci tespit edilmiştir (Mergeay, 1991). Mikroorganizmaların doğal yapıları ve fonksiyonları, onlara temel düzeyde tolerans ve direnç kazandırmaktadır (Rouch vd., 1995). Örneğin glutatyon, gümüş(I), bakır (I, II), kadmiyum (II), cıva (II) ve demir (II) gibi bazı metallere karşı koruma sağlar (Ni'bhriain vd., 1995). Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmaların bazı metal iyonlarını tolere etme kabiliyeti arasında bir fark vardır (Morozzi vd., 1986). Gram negatif bakteriler, kadmiyum (II) varlığında protein sentezini Gram pozitif bakterilerden daha iyi korurlar. Öte yandan, Gram pozitif

mikroorganizmalar, *E. coli*'ye göre 28-30 kat daha fazla bakır (II) bağlayabilir (Beveridge ve Fyfe, 1985).

2.4. Ağır Metal ve Antibiyotik Direnç Arasındaki İlişki

Birçok araştırmacı, metal maruziyetinin metallere direnç sağlamasının yanında başka toksik maddelere, özellikle antibiyotiklere karşı da direnç sağladığını belirtmiştir. Bu nedenle ağır metal dirençliliği toplumundaki antibiyotik direnci çalışmaları için de çok önemlidir (El-Sayed 2016).

1978 yılı başlarında yapılan bir çalışmada, kanalizasyon atık alanından izole edilen *Bacillus* izolatları ile kirlenmemiş topraktan izole edilen *Bacillus* izolatları ampisilin dirençliliği yönünden karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ağır metal yönünden zengin alanlardan izole edilen *Bacillus* izolatlarındaki ampisilin dirençliliğinin kirlenmemiş alandan izole edilenlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ağır metallerin bu etkisinin spesifik olduğu düşünülmektedir. Yüksek cıva konsantrasyonları ise streptomisin dirençli popülasyonlarda ters etkiye neden olmaktadır. Bu tip bağlantıya bir başka örnek, tarımsal toprak / gübre içindeki ağır metallerin varlığı ile antibiyotik direnç genleri arasında güçlü bir korelasyon olduğunu belirleyen ve Çin'de yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada ortamdaki antibiyotiklerin varlığı ile bunlara tekabül eden antibiyotik direnç genleri arasındaki bağlantı zayıf bulunmuştur. Ancak ortamda nispeten düşük seviyelerde bakır, krom, nikel, kurşun ve demirin bulunmasının toprak mikroorganizmalarındaki antibiyotik direnç genleriyle ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (Yu vd. 2017). Plazmid tabanlı ağır metal ve antibiyotik direnç genleri Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



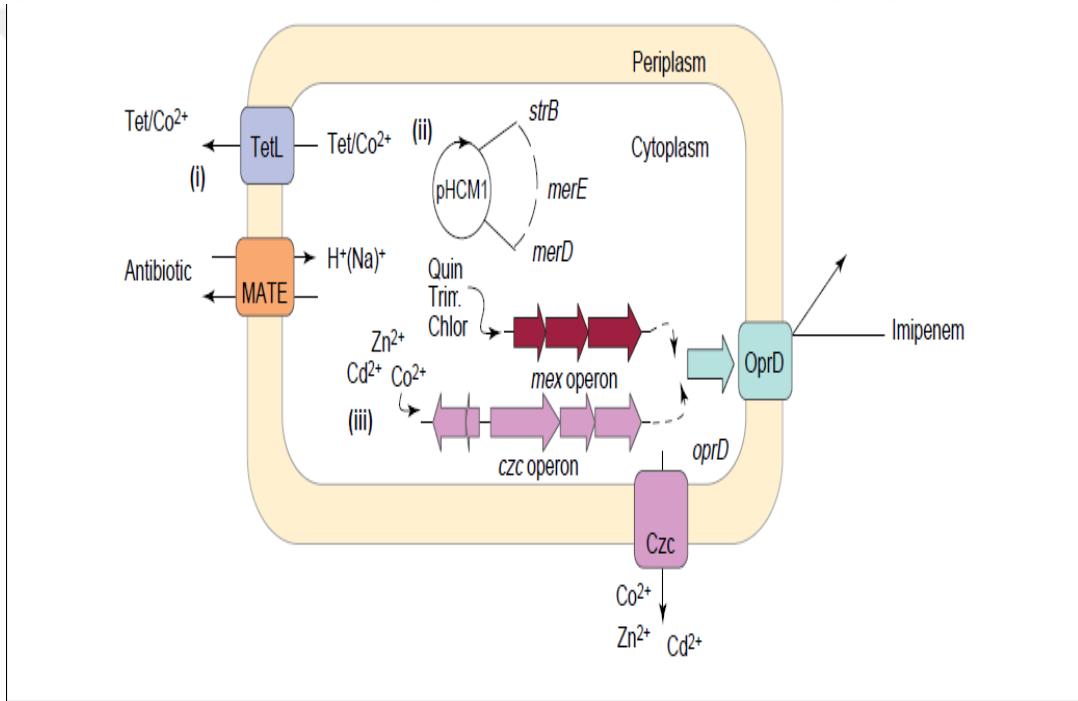
Şekil 2.4. 4582 plazmid dizisine dayanan antibiyotik direnç genleri (ARG'ler), metal direnç genleri (MRG'ler) ve biyosit direnci genleri (BRG'ler) birlikte görülmesi. Bu çizgilerin kalınlığı, bu birlikteliklerin frekansı ile ilgilidir (Yu vd. 2017).

Antimikrobiyal ajanların yanlış kullanılması, direncin yayılmasının arkasındaki büyük bir itici güç olarak kabul edilmesine rağmen, bu ilişkinin doğası karmaşıktır. Antibiyotik direnci, bazen bir bakterinin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerle elde edilir ve bu da genetik bir mutasyon ya da çevredeki bakteriler arasında antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasıyla ortaya çıkabilir (Eghomwanre vd., 2016).

Hem antibiyotik hem de biyosit/metaller için direnç genleri fiziksel olarak aynı plazmidde bulunuyorsa, metal/biyosid maruziyeti antibiyotik direncinin yatay gen transferini (HGT) de teşvik edebilir. Günümüzde, ARG taşıyan konjugatif plazmidler, klinik ortamlarda önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çevresel mikrobiyolojik flora HGT yoluyla patojen bakterilere mobilize olabilecek çeşitli direnç genleri taşırlar. Bu nedenle plazmid hareketliliği ile eş seçilim potansiyelleri arasındaki ilişkileri daha geniş ölçekte anlamak, potansiyel riskleri belirleme kabiliyetimizi arttırmak için değerli olacaktır (Pal vd., 2015).

Çapraz direnç, aynı mekanizmayı kullanarak yapısal olarak birbirine benzemeyen bileşiklerin hücre dışına atılmasını sağlaması ile gerçekleşebilir. Örneğin, *Listeria monocytogenes*'de çoklu ilaç direnci (MDR) pompası antibiyotiklere ek olarak metalleri de hücre dışına atabilir. *Pseudomonas aeruginosa*'da karakterize edilen MexGHI-OpmD pompası eğer taşımada görev alan bu pompanın tamamını içeren operona sahipse, mikroorganizmanın vanadyum, tükarsilin ve klavulanik aside de dirençli olduğu saptanmıştır. Bu çalışma MexGHI-OpmD pompasına sahip *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile bu MexGHI-OpmD pompası operonunu içermeyen mutant *Pseudomonas aeruginosa* suşunun

karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Benzer çalışma *Burkholderia cepacia*'da membrana DsbA-DsbB disülfid bağ oluşum sisteminin mutasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda bu sistemin varlığının metallerin hücre dışına atılmasının yanında çoklu ilaç direnci de sağladığı belirlenmiştir (Pal vd., 2015). TetL proteini hem tetrasiklin hem de kobalt dirençliliğini sağlayabilir (Baker-Austin vd., 2006). İlgili direnç sistemi Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Metal ve antibiyotik direncini oluşturan sistemlere örnekler.

2.5. Ağır Metal Direncinin Tespit Edilmesi

Mikroorganizmalarda ağır metal direncini tespit etmek için kültürel yöntemler, genomik dizi, PZR, DNA problemleri, protein elektroforezi ve Western blotlama yöntemleri kullanılmaktadır. Kültürel yöntemler çoğunlukla farklı metallerin büyüme koşullarının gözlenmesi ve mikroorganizmaların ağır metal tuzları içeren ortam ile izole edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu deneylerde, her ağır metal ayrı ortamlarda karıştırılarak test edilebilir veya aynı metale birden fazla metal ekleyerek çoklu direnç deneyleri ile yapılabilir. Katı veya sıvı

ortamlar iş için kullanılabilir. Ağır metal direncinin belirlenmesine ilaveten, MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) da belirlenmelidir. MİK; Mikroorganizmaların geri dönüşümünü önleyen asgari ağır metal konsantrasyonudur. MİK ağır metal içeren katı veya sıvı ortam kullanılarak farklı oranlarda yapılabilir (Hassen vd., 1998). Ağır metal direncini tespit etmek için kullanılan bir başka yöntem moleküler yöntemlerdir. Moleküler yöntemlerde ağır metal direnç genlerinin PZR tarafından tespiti sıklıkla kullanılır. Buna ek olarak, DNA probları, poliakrilamid jel elektroforezi ve Western blotlama gibi yöntemlerde genomik sekanslar kullanılır. PZR yöntemine bakarsak, ağır metal direnci sağlayan genlere özgü primerler seçer ve PZR ile amplifikasyon ve görselleştirme işlemine devam ederiz. Hem kültürel hem de moleküler yöntemler aynı anda gerçekleştirilebilir ve sonuçlar direnç varlığı, sorumluluk sahibi genin bu dirençteki derecesi ve ifadesi olarak ifade edilebilir. Araştırmalar, su ortamlarından ve ağır metal kirliliğine maruz kalmış sedimanlardan ve atık sudan izole edilen mikroorganizmaların, krom, kobalt, çinko, kadmiyum, kurşun, cıva, bakır, arsenik, magnezyum, manganez ve selenyum gibi metallere dirençli olduğunu göstermiştir. *Bacillus thuringiensis*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Bacillus arsenicus*, *B. pumilis*, *B. indicus*, *B. clausii*, *Planococcus maritimus*, *Staphylococcus pasturia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus* sp. Birçok Gram negatif ve pozitif türde (Hassen vd., 1998; Filali vd., 2000, Nithya vd., 2011) tespit edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu 0.02-400 mM/L arasındaydı (Hassen vd., 1998, Li ve Ramakrishna, 2011). MİK değerini belirlemek için katı ve sıvı ortam kullanılmış ve sonucun benzer olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, birçok türde çoklu ağır metallere karşı direnç bulunmuştur (Filali vd., 2000). Bazı ağır metal direnç genleri Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. Ağır metal direnci, sorumlu gen bölgeleri çarpılarak ve görüntülenerek belirlenebilir. Arsenik, *arsA*, *arsB*, *arsC*, *arsB*, *arsR*, *copA* için *copA*, *copB*, *copY* için *copZ pco*, kadmiyum için *cadA*, *cadC* direnci için *cadB*, akor direnci için *chrB*, *merR* için *chrB* için *merB*, *merB*, *merC*, *merD* , *merP*, *mer* kobalt-çinko-kadmiyum çoklu direnci için *czcA*, *czcB*, *czcC*, *czcD*, nikel-kobalt-kadmiyum çoklu direnç için *nccA* gen bölgeleri amplifiye edildi ve uygun primerler kullanılarak tespit edilmiştir (Rouch vd., 1995; Bruins vd., 2000; Abou-Shanab vd., 2007; Roosa vd., 2014).

Çizelge 2.4. Ağır metal direncinden sorumlu bazı genler (Yavuz ve Sarıgül 2016).

AĞIR METAL	DİRENCİ KODLAYAN GEN	BULUNDUĞU KONUM
Bakır	<i>copA, copB, copC, copD</i>	Kromozomal veya Plazmid
Kurşun	<i>pbrA, pbrD, pbrT</i>	Plazmid
Kadmiyum	<i>cadD, cadX</i>	Plazmid
Çinko	<i>czrA, czrB, czrC</i>	NC
Cıva	<i>merA, merB, merC, merD, merE, merR</i>	NC, Plazmid
Arsenik	<i>arsD, arsR</i>	Plazmid
Kobalt-Çinko- Kadmiyum	<i>czcA, czcB, czcC</i>	Kromozom NC
Nikel-Kobalt	<i>cnrA, rcnA, cnrT</i>	Plazmid NC

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Burdur Gölü

Çalışma alanı olarak Burdur Gölü seçilmiştir. Gölden örnekleme yapılan 5 noktanın koordinatları tabloda verilmiştir. Bu noktalardan göl suyu ve sediment örnekleri alınmıştır. Örnekleme koordinatları Çizelge 3.1’de ve noktaları Şekil 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örnekleme Noktalarının Koordinatları.

Örnekleme Noktaları	Koordinatları
1	37°44'13.82"K 30°14'32.14"D
2	37°41'32.93"K 30°11'15.20"D
3	37°40'25.65"K 30° 4'18.20"D
4	37°44'6.46"K 30° 6'51.76"D
5	37°46'37.54"K 30°10'54.95"D



Şekil 3.1. Örnekleme Noktaları Harita Üzerinde İşaretlenmiştir(1, 2, 3, 4, 5).

3.2.2. Kültür Besiyerleri

3.2.2.1. 6mM Na₂HAsO₄ içeren 0,5 X Nutrient Agar

Mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılmıştır.

Nutrient agar içeriği (1 L);

Et peptonu 2,5 g/L

Et ekstraktı 1,5 g/L

Agar-agar 12,0 g/L

Na₂HAsO₄ 6 mM

Çalışmamız kapsamında dehidre Nutrient sıvı besiyeri 0,5X konsantrasyonda hazırlanıp agar-agar eklenmiştir. 121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra steril tek kullanımlık Petri kutularına dökülerek kullanılmıştır (Chang vd., 2008).

3.2.2.2. Nutrient Broth ve %40 Giserol İçeren Nutrient Broth

Saflaştırılmış suşların geliştirilmesi ve canlandırılması amacı ile Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Nutrient broth besiyeri içeriği (1 L);

Et peptonu 5,0 g/L

Et ekstraktı 3,0 g/L

Mikroorganizmaların stoklanması için son konsantrasyonu %20 gliserol içerecek şekilde eppendorf tüplerine kültürler aktarılarak -80 °C' de saklanmıştır.

3.2.2.3. Mueller Hinton Agar II

Ağır metal ve antibiyotiklere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu testlerinde kullanılmıştır.

Mueller Hinton Agar II besiyeri içeriği (1 L) ;

Sığır Eti Ekstraktı 2,0 g/L

Kazein Asit Hidrolizatı 17,5 g/L

Nişasta 1,5 g/L

Agar 17,0 g/L

Mueller Hinton Broth II besiyerine %1,7 oranını sağlayacak miktarda agar-agar eklenerek 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır ve steril Petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.2.2.4. Lipaz Test Ortamı

Lipaz testi için kullanılan Tw80 Agar içeriği;

Nutrient Broth	8 g/L
CaCl ₂ H ₂ O	0,5 g/L
Tween 80	10 mL/L
Agar-agar	15 g/L

121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra steril Petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.2.2.5. Amilaz Test Ortamı

Amilaz testi için kullanılan Starch Agar ortamının içeriği;

Beef Ekstraktı	3 g/L
Çözünebilir nişasta	10 g/L
Agar-agar	15 g/L

pH 7,5 seviyesine ayarlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır ve steril Petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.2.2.6. Proteaz Test Ortamı

Proteaz testi için kullanılan Skim Milk Agar ortamının içeriği;

Solüsyon A;

Nutrient Broth	8 g/L
Agar-agar	15 g/L

500 ml de 1 L değerlerine göre hazırlanır 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır.

Solüsyon B;

Skim milk (yağsız süt tozu) 10 g/L

500 ml de 1 L değerlerine göre hazırlanır 110 °C' de 5 dakika otoklavlanmıştır.

Otoklav sonucu 2 solüsyon aseptik şartlar altında karıştırılır ve steril Petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.2.2.7. Jelatinaz Test Ortamı

Jelatinaz testi için kullanılan Jelatinaz Agar ortamının içeriği;

Jelatinaz Test Ortamı (1 L);

Pepton	5 g/L
Sığır Ekstraktı	3 g/L
Jelatin	120 g/L

Homojen olarak karıştırılıp 5'er ml test tüplerine dağıtılmıştır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

3.2.2.8. Üreaz Testi Ortamı

Üreaz testi için kullanılan Christensen's Urea Agar ortamının içeriği;

Pepton	1 g/L
Dekstroz	1 g/L
Sodyum Klorid	5 g/L
Potassium Phosphate Monobasic	2 g/L
Üre	20 g/L
Fenol Kırmızısı	0,012 g/L

Bileşenler 100 ml de çözülüp 0,45 µ filtre ile steril edilir.

1L ye göre tartılmış agar 900 ml suda çözülmüştür. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası 2 solüsyon karıştırılarak deney tüplerine yatık agar olarak dökülüp kullanılmıştır.

3.2.3. Boyalar ve solüsyonlar

3.2.3.1. % 0,9 Sodyum Klorür Solüsyonu

9 gr NaCl 500 ml saf suda çözülerek 1 litreye tamamlanır ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

3.2.3.2. Kristal Viyolet Solüsyonu

Kristal viyolet solüsyonu içeriği (100 mL için);

Solüsyon A

Kristal viyolet (%90 boya içeren)	2 g
Etanol (%96 v/v)	20 mL

Solüsyon B

Amonyum okzalat	0,8 g
Deiyonize su	80 mL

A ve B solüsyonları ayrı ayrı hazırlanıp karıştırılıp filtre edildikten sonra kullanılır.

3.2.3.3. Gram İyodür Solüsyonu

Gram iyodür solüsyonu içeriği (300 mL için);

Potasyum iyodür	2g
İyot	1 g

Potasyum iyodür ve iyot bir kap içerisinde iyice ezilir ve üzerine yavaş yavaş su eklenerek 300 mL ye tamamlanır. Hazırlanan solüsyon amber renkli şişede muhafaza edilir.

3.2.3.4. Safranin Solüsyonu

Safranin solüsyonunun içeriği (110 mL için);

Safranin O	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 mL
Deiyonize su	100 mL

Safranin O etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine su eklenir. Birkaç gün dinlenen solüsyon filtre edilerek kullanılır.

3.2.3.5. %33 Asetik Asit Solüsyonu

%33 Asetik asit solüsyonu içeriği;

Asetik asit (Glacial, >%99,5 saflıkta)	330 mL
Deiyonize su	670 mL

Asit bir kaba pipet ile alındıktan sonra üzerine 1 L ye tamamlayacak kadar deiyonize su eklenir. Hazırlanan solüsyon amber renkli şişede saklanır.

3.2.3.6. Ağır Metal Stok Solüsyonları

MİK denemeleri için $ZnSO_4$, $CdCl_2$, $HgCl_2$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ ve $NaAsO_2$ metal tuzları kullanılmıştır. $HgCl_2$ 0,1M diğer metallerde 0,5 M olarak stok solüsyon hazırlanmış ve 0,45 lik filtre ile steril edilmiştir. Metallerin moleküler ağırlığı ve tartılan gramlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ağır metal tuzlarının moleküler ağırlıkları ve 50 mL için tartılan gramlar;

Ağır Metal	Moleküler Ağırlığı (g/Mol)	Tartılan Gram (50 mL için)
ZnSO ₄	287,56	7,17
CdCl ₂	183,32	4,58
HgCl ₂	271,50	1,35
CuSO ₄	159,61	3,99
Pb(NO ₃) ₂	331,21	8,28
NaAsO ₂	129,91	3,24

Metaller yukarıda verilen moleküler ağırlık değerlerine göre hesaplanarak tartılmış ve steril ultra saf suda çözülmüştür. Çözünmüş solüsyon 0,45 mikron filtre edilerek steril kaplara alınmış ve bu kaplarda saklanmıştır.

3.2.4. Moleküler Yöntemler İçin Kullanılan Malzemeler.

Taq DNA Polymeraz: Thermo EP0402

dNTP's: Thermo R0181

1X TAE Tamponu, Agaroz: SIGMA-ALDRICH A4718

Jel Boyası: BIOTIUM GelRed™

3.3. Aletler ve Cihazlar

Soğutmalı inkübatör: NÜVE S120

İnkübatör: Memmert IN160

Çalkalamalı İnkübatör: IKA KS 4000

Soğutmalı Santrifüj: BECKMAN COULTER Allegra X-22R

Uv/Görünür Alan Mikroplaka Spektrofotometresi: BioTek, Epoch

PZR cihazı (Thermal Cycler): AB Veriti

Elektroforez Cihazı: Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis System

Jel Görüntüleme: Vilber Lourmat Tansilluminatör

3.4. Yöntem

3.4.1. Örneklerin Toplanması ve Ağır Metal Analizleri

Örnekler Burdur Gölü etrafında yer alan 5 noktadan göl suyu ve sediment olarak alınmıştır. Örnekler steril 50 ml hacminde kaplara alınmıştır. Aynı gün içerisinde MAKÜ Biyoloji Bölümünde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarına taşınmıştır.

Örnek alınan noktalardan toplanan sediment örneklerinde bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, cıva ve arsenik miktar tayini MAKÜ Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Ağır metal analizleri İndüklenmiş Çift Plazma Optik Emisyon Sistemi (ICP/OES) cihazında yapılmıştır. Çizilen kalibrasyon grafiklerine göre örneklerin okumaları yapılmıştır.

3.4.2. Mikroorganizmaların Saflaştırılması ve Stoklanması

Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL' ün "Burdur Gölünde zor koşullara dayanıklı mikroorganizmaların araştırılması" projesi kapsamında yapılan arazi çalışmalarında bu tez için örnekleme yapılmıştır. Elde edilen suşların bir kopyası plazmidlerini kaybetmemesi için -20 °C' de 6mM NaAsO₂ içeren besi ortamlarında izole edilmiş ve saklanmıştır. İzolatlar saflık kontrolü için 6mM NaAsO₂ içeren 0,5X Nutrient Agar' a çizgi plaka yöntemi ile inoküle edilmiş ve 25 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler tekrarlı çizimlerle sa suşları stoklanmış, karışık görünüme sahip izolatlar çizilerek saf koloniler elde edilene kadar ekimlere devam edilmiş ve bu işlemler sonunda tamamen saflaşan tüm suşlar stoklanmıştır.

Saflaştırılan suşlardan tek koloni alınıp 6mM NaAsO₂ içeren 0,5X Nutrient Broth'a inoküle edilmiş ve 25 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizma büyümesi gözlemlenen kültürler %20 gliserolde stok olarak saklanmıştır.

3.4.3. Gram Boyama

İzolatlar 6mM NaAsO₂ içeren 0,5X Nutrient Agar' a çizgi ekim yöntemi ile inoküle edilmiş ve 25 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. Lam üzerine 25 µL %0,09 NaCl solüsyonu damlatılır ve büyüyen kolonilerden alınarak lama yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Lam üzerindeki sıvı tamamen kuruduktan sonra fiksasyon için lamlar 5 defa alevden geçirilir. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra lamlar 1 dakika Kristal Viyolet Solüsyonunda tutulmuştur ve süre bitiminde bol su ile yıkanıp fazla boya uzaklaştırılmıştır. Lamlar 1 dakika Gram iyodür solüsyonunda tutulmuştur ve bol su ile yıkanmıştır. Yıkama tamamlanınca 15

saniye %70 Etanol ile muamele edilmiş ve tekrar bol su ile yıkanmıştır. Son olarak karşıt boyama için Safranin O solüsyonunda 30 saniye tutulmuş ve bol su ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda lamalar bir kurulama kağıdı ile bastırmadan kurulanmıştır.

Hazırlanan preparatlar mikroskop altında 100X büyütme değerinde incelenmiştir. Koloni morfolojileri de fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

3.4.4. Ekstrasellüler Enzim Testleri

3.4.4.1. Katalaz Testi

Gram boyanma için büyütülen kültürlerden bir öze ucu kadar alınarak bir boş bir Petri kabı üzerine koyulmuş ve üzerine %3 H₂O₂ (Hidrojen Per Oksit) damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz testi için pozitif sonuç kabul edilmiştir.

3.4.4.2. Lipaz Testi

Lipaz testi için Tween 80 Agar kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş kültürlerden Tween 80 Agar'a spotlama tekniği ile inokülasyon yapılmıştır ve 25°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda spotlanan mikroorganizma kültürü etrafında oluşan beyaz çökelek yapıda görünüm lipaz testi için pozitif sonuç kabul edilmiştir (Sudagıdan ve Aydın 2009).

3.4.4.3. Amilaz Testi

Amilaz testi için Starch Agar hazırlanır. Aktifleştirilmiş kültürden Starch Agar üzerine spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve 25°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Agar plakalar üzerine yüzeyi kaplayacak kadar İyodine Mordant Solüsyonu eklenmiş 1 dakika kadar çalkalayarak beklenmiştir. Mikroorganizmanın büyüdüğü alan etrafında oluşan şeffaf zon amilaz testi için pozitif sonuç kabul edilmiştir (Sánchez-Porro vd. 2003).

3.4.4.4. Proteaz Testi

Proteaz testi için Skim Milk Agar kullanılmıştır. Aktif kültürden Skim Milk Agar'a üzerine spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve 25°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroorganizma kültürü etrafında oluşan şeffaf zon proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sudagıdan ve Aydın 2009).

3.4.4.5. Jelatinaz Testi

Jelatin içeren besi ortamı hazırlanır ve sıvı ortamda aktifleştirilmiş kültürler ile jelatinaz test tüpleri inoküle edilmiştir. 25 °C' de 48 saat inkübasyon sonucu test tüpleri 1 saat

buzdolabında (+4 °C) tutulmuştur. Buzdolabından çıkarılan tüplerde katılaşma jelatinaz testi için negatif, sıvı görünüm ise pozitif sonuç kabul edilmiştir (Muhsin vd., 1997).

3.4.4.6. Üreaz Testi

Üreaz testi için Christensen's Urea Agar kullanılmıştır. Aktif kültürlerden Christensen's Urea Agar'a öze ile çizerek ekim yapılmış ve 25°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda turuncu renkte olan ortam kırmızıya dönerse pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Christensen, 1946).

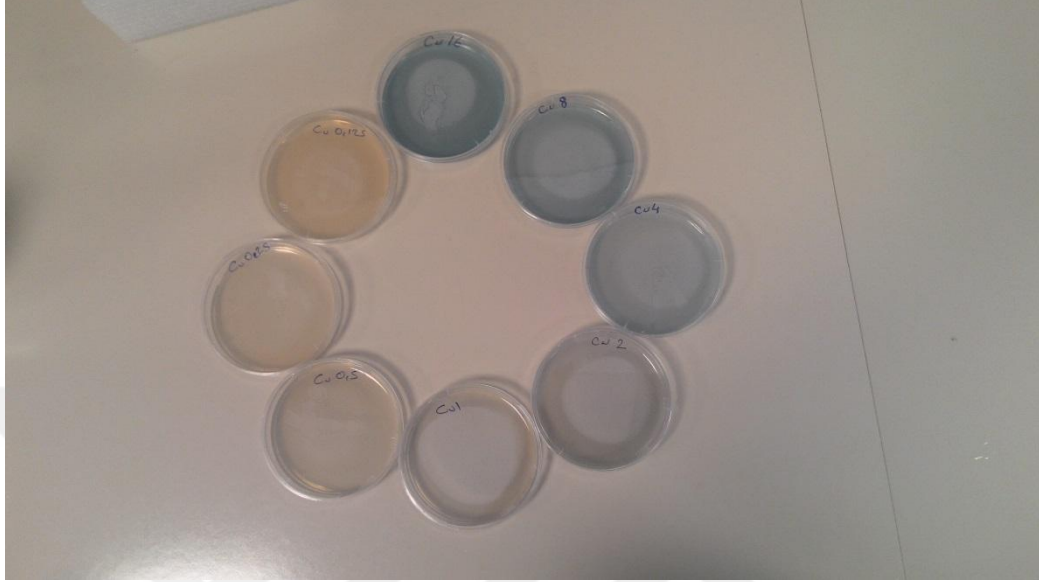
3.4.5. Biyofilm Testi

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasiteleri 96 kuyucuklu mikro-plaka (Corning Costar 3599 96 well cell culture plate) kullanılarak tespit edilmiştir. 180 µL Nutrient broth plakanın her bir kuyucuğuna dağıtılmıştır. Katı besi ortamında bir gece büyütülen suşlar %0,9 NaCl içerisinde 0,5 McFarland değerinde süspansiyon hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonundan 20 µL plakadaki besiyeriler üzerine her bakteriden iki kontrollü olarak inoküle edilmiştir. Plaka 25°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alınmış mikroorganizma üremesi kontrol edilmiştir. Mikroorganizma üremesi gerçekleşmiş ise plaka boşaltılmıştır. Plaka 3 defa % 0,9 NaCl ile yıkanmış ve kuruması beklenmiştir. Fiksasyon amacı ile her bir kuyucuğa 200 µL metanol eklenmiş 15 dakika oda ısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda metanol boşaltılır ve plakanın kuruması beklenir. Plaka kurduğunda 200 µL Kristal-Viyolet solüsyonu eklenmiş ve 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda boya dökülmüş, plaka çeşme suyunda iyice yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Plaka kurduktan sonra üzerine % 33 Asetik asit solüsyonu eklenmiş ve güzelce karıştırılmıştır. 590 nm dalga boyunda okuma yapılmış ve absorbans değeri 0,5 den büyük olan örnekler pozitif sonuç olarak rapor edilmiştir (Sudagıdan ve Aydın 2009).

3.4.6. Ağır Metal Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

MİK denemeleri için Broth II besiyerine agar-agar eklenerek katılaştırılmıştır. Hazırlanan besiyerine 16 mM olacak şekilde arsenik, bakır, çinko, cıva, kadmiyum ve kurşun metallerini içeren stok solüsyonundan eklenmiş iyice karıştırdıktan sonra besiyerinin yarısı petri kaplarına 25 ml yani 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülmüştür. Kalan yarısına dökülen hacim kadar besiyeri eklenerek metal konsantrasyonu yarıya düşürülmüş ve petri kablarna dökülmüştür. Bu dilüsyon işlemi 0,125 mM konsantrasyonda besiyerine ulaşana

kadar tekrarlanmıştır. Sonuç olarak MİK testi için kadmiyum, kurşun, bakır, cıva, çinko ve arsenik içeren 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 ve 0.125 mM; cıva için ise 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.012, 0.006, 0.003 ve 0.001 mM ağır metal içeren 2 cm kalınlığında Mueller Hinton Agar kullanılmıştır. Bakır için hazırlanan besiyeri örneği Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonda bakır içeren besiyeriler.

25 °C’ de 48 saat Nutrient Agar’da inkübe edilen mikroorganizmalardan swap ile alınıp %0,09 NaCl içeren ortamda 0,5 McFarland olacak şekilde süspansiyon hazırlanır. McFarland ayarlaması yapıldıktan sonra mikroorganizmalar tüm konsantrasyonlara swap ile inoküle edilir. 25 °C’ de 48 saat inkübasyon sonucunda mikroorganizma üremesinin durduğu konsantrasyon o mikroorganizma için MİK değeri kabul edilir (Hassen vd. 1998).

3.4.7. Antibiyotik Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (A-MİK) Testi

A-MİK testi için ampisilin, gentamisin, penisillin, klindamisin, rifampisin, sefpodoksim, oflaksasin, enrofloksasin ve vankomisin antibiyotikleri yüksek düzeyde ağır metal direnci gösteren 7 suş ve düşük düzeyde ağır metal direnci gösteren 5 suş üzerinde denenmiştir.

Bunlardan, ampisilin, penisilin ve sefodoksin hücre duvarı yapısı üzerinde, gentamisin ve klindamisin protein sentezi üzerinde, enrofloksasin, rifampisin ve oflaksasin nükleik asit sentezi üzerinde etkilidir. Vankomisin ise hem hücre duvarı hem de nükleik asit yapısı üzerinde etkili bir antibiyotiktir. A-MİK denemeleri için 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/ml antibiyotik içeren Mueller Hinton Agar kullanılmıştır.

Penisilin 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 U/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Aktif kültürlerden swap ile alınıp %0,9 NaCl içeren ortamda 0,5 MacFarland olacak şekilde süspansiyon hazırlanır ve swap ile agar yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde inoküle edilir. 25 °C’ de 48 saat inkübasyon sonucunda mikroorganizma üremesinin durduğu konsantrasyon o mikroorganizma için A-MİK değeri kabul edilir (Hassen vd. 1998).

3.4.8. Ağır Metal Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemi ile Belirlenmesi

PZR çalışmaları için bakterilerden DNA izolasyonu Thermo genomic DNA ekstraksiyon kit ile üretici firma prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmaları AB Veriti 96 well thermal cyclers’ da gerçekleştirilmiştir.

Üretici firma talimatına göre PZR solüsyonu (50µl);

Kalıp DNA	5 µl
KCl PZR buffer	5 µl
dNTP mix	5 µl
MgCl ₂	3 µl
F Primer	1 µl
R Primer	1 µl
Ultra Pure Deiyonize su	30 µl
Taq Polimeraz	1,5 U

PZR reaksiyonu koşulları;

95 °C 5 dk

95 °C 1 dk

45-60 °C 1 dk *

72 °C 1 dk

35 tekrar

72 °C 10 dk

*: Primerin uzunluğu ve yapısına göre sıcaklık değeri değişkenlik gösterir.

PZR reaksiyonu sonrası ürünler %1,5 hazırlanan agaroz jelde 85V sabit akımda 1 saat yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir. İstenilen boyutta bant oluşturan örneklerin o geni taşıdığı raporlara kaydedilmiştir. PZR deneylerinde kullanılan primerler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR deneylerinde kullanılan primerler;

Primerin Adı	Forward (İleri)	Reverse (Geri)	Amplikon boyutu (Baz Çifti)	Tm (°C)	Referans
<i>arsB</i>	ATG GCA ACC GAA AGG TTT AG	GTT GGC ATG TTG TTC ATA AT	100	55	Anderson ve Cook, 2004
<i>arsC</i>	AAC AGT TGC CGC AGC ATT CT	ATG CGC TCC AGC TCA CGC TT	100	55	Anderson ve Cook, 2004
<i>pcoR</i>	CAG GTC GTT ACC TGC AGC AG	CTC TGA TCT CCA GGA CAT ATC	640	57	Dell'Amico vd., 2008
<i>pcoA</i>	CGT CTC GAC GAA CTT TCC TG	GGA CTT CAC GAA ACA TTC CC	1791	55	Trajanovska vd., 1997
<i>czeB</i>	CTA TTT CGA ACA AAC AAA AGG	CTT CAG AAC AAA ACT GTT GG	1520	50	Trajanovska vd., 1997
<i>czeD</i>	CAG GTC ACT GAC ACG ACC AT	CAT GCT GAT GAG ATT GAT GAT C	398	53	Trajanovska vd., 1997
<i>pbrT</i>	AGC GCG CCC AGG AGC GCA GCG TCT T	GGC TCG AAG CCG TCG AGR TA	448	55	Roosa vd., 2014
<i>czeA</i>	TCG ACG GBG CCG TGG TSM TBG TCG AGA A	GTV AWS GCC AKC GGV BGG AAC A	232	57	Roosa vd., 2014
<i>cadD</i>	TGC TAG AGC AAA GAC TAG GAA AGA	AGC CAT AAT CCA ACG ACC AA	460	54	Gómez-Sanz vd., 2013
<i>cadX</i>	TGC TTG TGA TGT GAT CTG TGT	TGA TGT GAA GTT GAA GCA ACA C	213	55	Gómez-Sanz vd., 2013
<i>copA</i>	CAT GCT TTA GGC TTG GCA AT	TCT TCT GGC ATG AGT TGT GC	662	52	Gómez-Sanz vd., 2013
<i>mco</i>	TCCCTCCCCAAATACAGCTA	GTTCCGTGGATATGGAATGG	699	54	Gómez-Sanz vd., 2013
<i>merT</i>	ATG TAC CTT AAC CAA AGA ATA	TTA TCT TGT CTC ATG TTT CCG	387	50	Soge vd., 2008
<i>merA</i>	ATG ACT CAA AAT TCA TAT AAA ATA C	TGT TCC GGA AAT CCC GGG AAT GAA	698	55	Soge vd., 2008
<i>merB</i>	ATG AAA AAT ATT TCA GAA TTC TC	ATT AAA TGT TAC AAC AGG ACC	652	50	Soge vd., 2008

3.4.9. Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı

Dirençli seçilen 7 adet suşun 16S rRNA gen bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve örneklerden çift yönlü DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçları “ApE” ve “Finch TV” programları kullanılarak düzeltilmiş ve NCBI üzerinden Blast edilerek tür tanıları gerçekleştirilmiştir (Janda ve Abbott, 2007).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Ağır Metal Analizi Sonuçları

Yapılan analizler sonucu sediment örneklerinde sadece çinko ve bakır bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer 4 metal ya hiç bulunamamış ya da dedeksiyon limitinin altında çıkmıştır. Ağır metal analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ağır metal analizi sonuçları.

Numune	Zn (µg/g)	Pb (µg/g)	Cd (µg/g)	As (µg/g)	Hg (µg/g)	Cu (µg/g)
1	41,96	-	-	-	-	22,37
2	28,51	-	-	-	-	13,82
3	35,78	-	-	-	-	15,13
4	49,63	-	-	-	-	27,15
5	19,91	-	-	-	-	7,25
K1	6,81	-	-	-	-	6,49
K2	6,83	-	-	-	-	6,77

-: Tespit Edilemedi

Akbulut vd. (2008) Kızılırmak nehrinde yaptıkları çalışmada sediment örneklerinden en yüksek 57 µg/g en düşük 7,11 µg/g düzeyinde bakır elementi tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada en yüksek 170,6 µg/g düzeyinde çinko elementi tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada kurşun ve cıva elementleri tespit edilemezken Akbulut vd. (2008) yaptığı çalışmada sırayla 27,9 ile 39,7 µg/g aralığında ve 4,1 ile 14,8 µg/g aralığında bu elementler rapor edilmiştir. He vd. (2016) yaptığı çalışmada Chaohu gölünden toplanan sediment örneklerinin ağır metal analizleri yapılmıştır. Bu çalışmaya göre çinko elementi en yüksek 213,2 mg/kg ve bakır elementi en yüksek 30.8 mg/kg düzeyinde rapor edilmiştir. Aynı çalışmada kurşun, kadmiyum ve cıva sırasıyla en az 9.8 mg/kg, 1.78 mg/kg ve 0.03 mg/kg düzeyinde tespit edilmiştir. Bölgeye yakın bir göl olan ışıklı gölünde Gülcü-Gür ve Tekin-Özan tarafından yapılan bir çalışmada çinko elementi en yüksek 24.4 mg/kg ve bakır elementi en yüksek 14.4 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca kurşun ve kadmiyum elementleri en düşük konsantrasyonlarda tespit edilen elementlerdir. Çalışmamızda toplanan 7 adet sediment örneği 6 adet standart (Zn, Pb, Cd, As, Hg ve Cu) tarafından analiz edilmiştir. Deneyler sonucunda 7 adet sediment örneğinin hepsinde Pb, Cd, As ve Hg elementlerine rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz çinko ve bakır konsantrasyonları yapılan çalışmalar içinde sadece Gülcü-Gür ve Tekin-Özan (2017) tarafından yapılan çalışmaya

kıyasla yüksek bulunmuştur. Diğer iki çalışmaya (Akbulut vd. 2008; He vd. 2016) ait çinko ve bakır konsantrasyonları elde ettiğimiz değerlerden yüksektir. Burdur gölü ile aynı bölgede bulunan Işıklı gölüne kıyasla daha yüksek bulduğumuz çinko ve bakır miktarları önem arz etmektedir. Kurşun, kadmiyum, arsenik ve cıva elementlerinin tespit edilememesinin örneklerin gölün kıyı ve yüzey kısmından alınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha büyük bir proje kapsamında göl tabanı ve daha derin sedimentler araştırılabilir. Metaller bulunmamasına rağmen mikroorganizmaların bu metallere direnç göstermesi dikkat çekicidir.

4.2. Gram Boyama, Hücre Morfolojisi ve Katalaz Testi Sonuçları

İzolasyon sonucu 15 Gram pozitif, 24 Gram negatif suş elde edilmiştir. Sucul bir ortamda Gram negatif organizma sayısının daha fazla olması beklenen bir sonuçtur. Bunun yanında hücre morfolojisi olarak genelde kok ve basil mikroorganizmalarla karşılaşılmıştır. Katalaz negatif hiçbir suşla karşılaşılmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 39 izolata ait sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Gram boyama, hücre morfolojisi ve katalaz testi sonuçları.

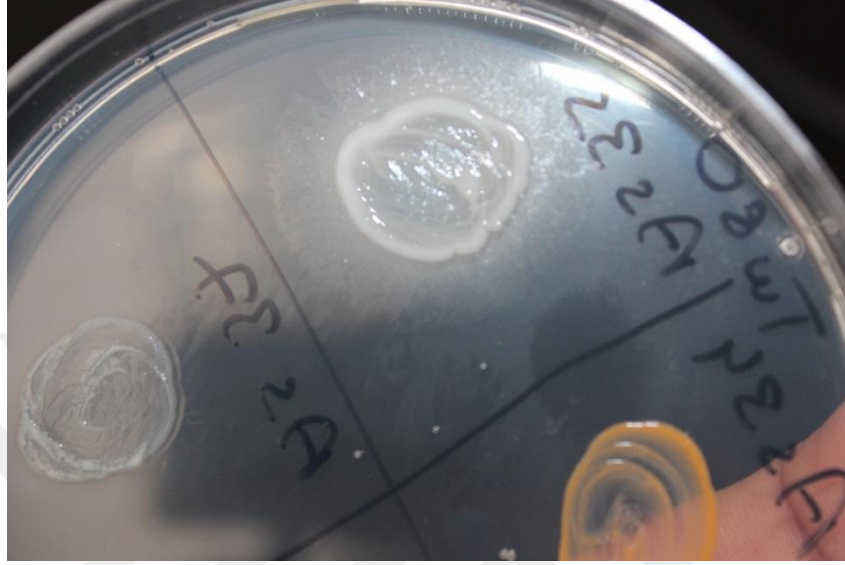
Suş Kodu	İzolasyon yeri	Gram	Hücre Morf.	Katalaz
As1	3. örneklem noktası kaynak 2	+	Kok	+
As2A	3. örneklem noktası kaynak 2	+	Kok	+
As3	3. örneklem noktası kaynak 2	-	Kok	+
As4	1. örneklem noktası kaynak 1	-	Kok	+
As5	1. örneklem noktası kaynak 1	+	Kok	+
As6	1. örneklem noktası kaynak 1	+	Kok	+
As6A	1. örneklem noktası kaynak 1	-	Kok	+
As7	1. örneklem noktası kaynak 1	-	Basil	+
As8	1. örneklem noktası sediment	+	Koko-Basil	+
As9	1. örneklem noktası sediment	-	Kok	+
As10	1. örneklem noktası sediment	+	Basil	+
As11	2. örneklem noktası sediment	-	Küçük Koloni	+
As12	2. örneklem noktası sediment	-	Basil	+
As13	2. örneklem noktası sediment	+	Basil Spor	+
As14	2. örneklem noktası sediment	-	Basil	+
As16	5. örneklem noktası kaynak sedimenti	-	Kok	+
As17	5. örneklem noktası kaynak sedimenti	-	Küçük Koloni	+
As18	5. örneklem noktası kaynak sedimenti	-	Kok	+
As19	2. örneklem noktası sediment	+	Basil	+
As20	1. örneklem noktası sediment	+	Basil	+
As21	1. örneklem noktası sediment	+	Kok	+
As22	1. örneklem noktası sediment	+	Kok	+
As23	3. örneklem noktası sediment	-	Küçük Koloni	+
As24	4. örneklem noktası sediment	-	Basil	+
As25	1. örneklem noktası sediment	+	Basil	+
As26	3. örneklem noktası sediment	+	Kok	+
As27	3. örneklem noktası sediment	+	Kok	+
As28	2. örneklem noktası sediment	-	Basil	+
As29	5. örneklem noktası göl suyu	+	Basil	+
As30	5. örneklem noktası göl suyu	-	Küçük Koloni	+
As31	3. Örneklem noktası sediment	-	Kok	+
As32	3. Örneklem noktası sediment	-	Kok	+
As33	5. Örneklem noktası kaynak sedimenti	-	Bacil	+
As34	3. örneklem noktası sediment	+	Kok	+
As35	4. Örneklem noktası göl suyu	-	Kok	+
As36	3. örneklem noktası 1. Kaynak sedimenti	-	Kok	+
As37	3. örneklem noktası 2. Kaynak sedimenti	-	Küçük Koloni	+
As38	3. örneklem noktası 3. Kaynak sedimenti	-	Kok	+
As39	5. Örneklem noktası göl suyu	-	Basil	+

4.3. Ekstrasellüler enzim testi sonuçları

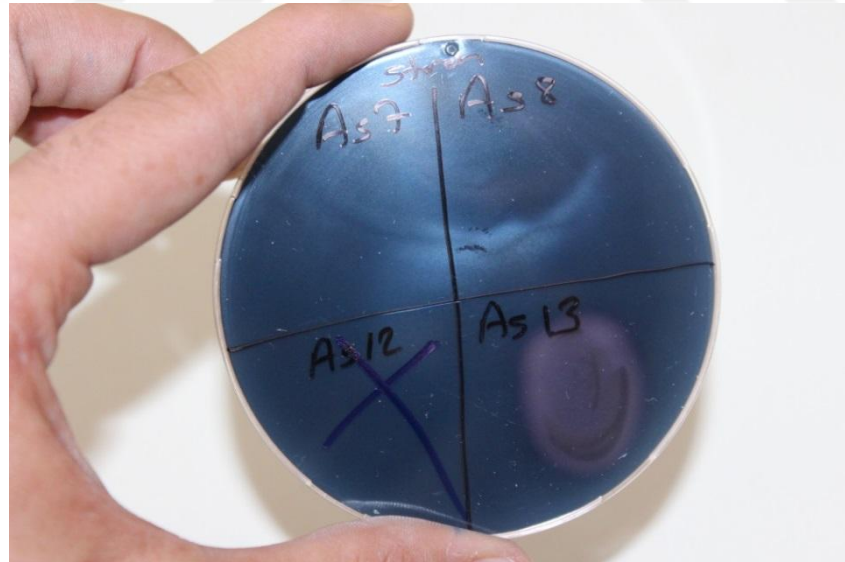
Çizelge 4.3. Ekstrasellüler enzim testleri sonuçları.

Suş Kodu	Lipaz	Proteaz	Amilaz	Üreaz	Jelatinaz
As1	-	+	+	+	-
As2A	-	+	-	+	-
As3	+	+	-	+	-
As4	+	+	-	+	-
As5	-	+	-	-	-
As6	-	+	-	-	-
As6A	-	+	-	-	-
As7	-	-	-	+	-
As8	-	+	-	-	-
As9	+	-	+	+	-
As10	+	-	+	+	-
As11	-	-	-	-	-
As12	+	-	-	+	-
As13	+	+	+	-	+
As14	+	-	+	-	-
As16	+	+	-	-	-
As17	+	-	-	+	-
As18	+	-	+	+	-
As19	-	-	-	+	-
As20	+	-	-	+	-
As21	-	+	-	-	-
As22	-	+	-	-	-
As23	+	-	-	-	-
As24	-	-	+	+	-
As25	+	-	-	+	-
As26	-	+	-	+	-
As27	-	+	-	+	-
As28	-	-	-	-	-
As29	-	+	+	+	-
As30	+	-	-	-	-
As31	+	+	-	-	-
As32	+	+	-	+	-
As33	-	+	-	+	-
As34	-	+	-	+	-
As35	+	+	-	-	-
As36	+	+	-	-	-
As37	-	-	-	+/-	-
As38	+	+	-	-	-
As39	-	+	+/-	+/-	-

Mikroorganizmaların ekstrasellüler enzim üretimleri test edilmiştir. 17 suş üreaz, 15 suş proteaz, 14 suş lipaz, 8 suş amilaz ve sadece 1 suş jelatinaz enzimlerini üretmektedir. Ekstrasellüler enzim testlerine ait sonuçlar çizelge 4.3’de ve fotoğraflar Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.



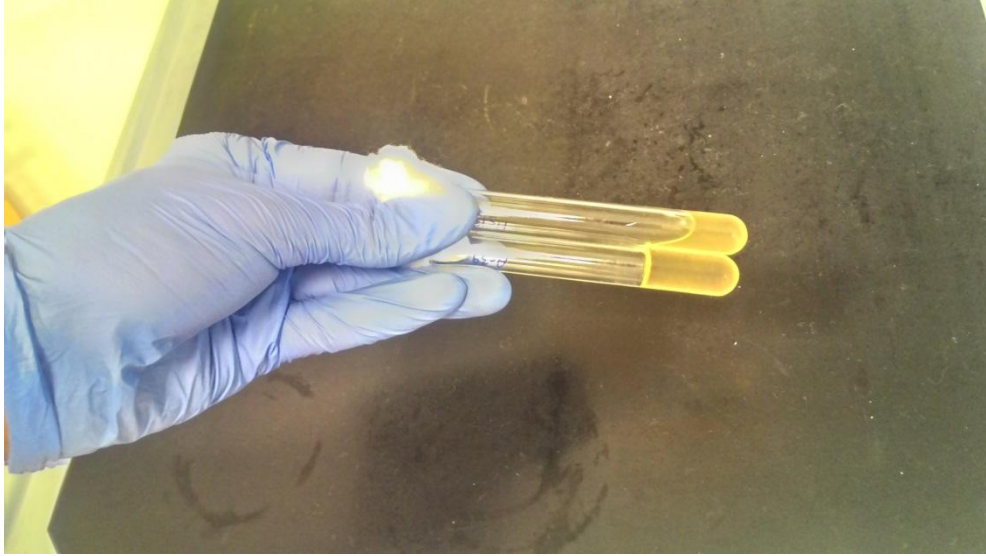
Şekil 4.1. Lipaz pozitif suşa ait fotoğraf.



Şekil 4.2. Amilaz pozitif bir deney fotoğrafı.



Şekil 4.3. Proteaz pozitif bir deney fotoğrafı.



Şekil 4.4. Jelatinaz pozitif bir deney fotoğrafı.



Şekil 4.5. Üreaz deneyi sonuçları.

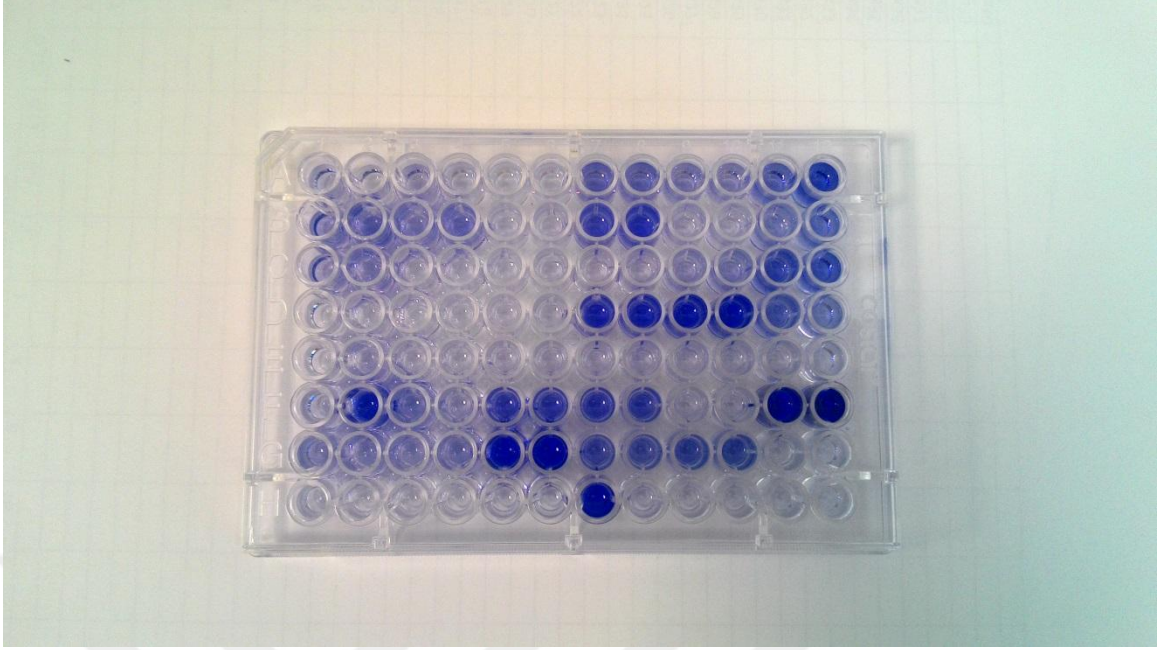
Extrasellüler enzim üretimleri incelendiğinde dikkat çekici olan üreaz salgılayan suş sayısının çok olmasıdır. Bu salgılanma gölün kirli yapısından dolayı mikroorganizmaların geliştirdiği bir adaptasyon olabilme ihtimali yüksektir. Jelatinaz enzimi üreten suş sayısının az olması ise hayvansal bir protein olan jelatinin çevresel mikroorganizmalar tarafından tanınmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu enzimlerden proteinaz ve lipaz endüstriyel olarak en önemli enzimlerdir. Ekstrem şartlarda yaşayan mikroorganizmaların bu enzimi ürettiği olması o mikroorganizmaları endüstriyel üretim için olumlu hale getirmektedir. Bu suşlarla yapılacak daha detaylı enzim çalışmaları ile bu suşlar endüstriyel üretime kazandırılabilirler.

4.4. Biyofilm Testi Sonuçları

Biyofilm testi sonuçları çizelge 4.4’de verilmiştir. Biyofilm testine ait fotoğraf Şekil 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.4. Biyofilm testi sonuçları.

Suş Kodu	Biyofilm	Suş kodu	Biyofilm
As1	-	As21	+
As2A	-	As22	+
As3	+	As23	+
As4	+	As24	-
As5	+	As25	-
As6	+	As26	-
As6A	-	As27	-
As7	+	As28	-
As8	-	As29	+
As9	+	As30	-
As10	-	As31	+
As11	+	As32	+
As12	-	As33	-
As13	-	As34	+
As14	-	As35	-
As16	-	As36	-
As17	+	As37	+
As18	-	As38	+
As19	-	As39	+
As20	-		



Şekil 4.6. Biyofilm testi yapılan mikrolakanın fotoğrafı.

Sucul mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasiteleri bilinen bir durumdur. Biyofilm oluşumu mikroorganizmalara yaşadığı ortama sabitlenme ve korunma özelliği sağlamaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında yüksek ağır metal dirençli bulduğumuz 7 suştan 4' ü yer almaktadır. Biyofilm oluşturma sırasında ağır metal ve antibiyotiklere karşı dirençte etkili bir sistem olduğu söylenebilir. Bunun yanında biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmalar diğer canlılar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

4.5. Ağır Metal MİK Testi Sonuçları

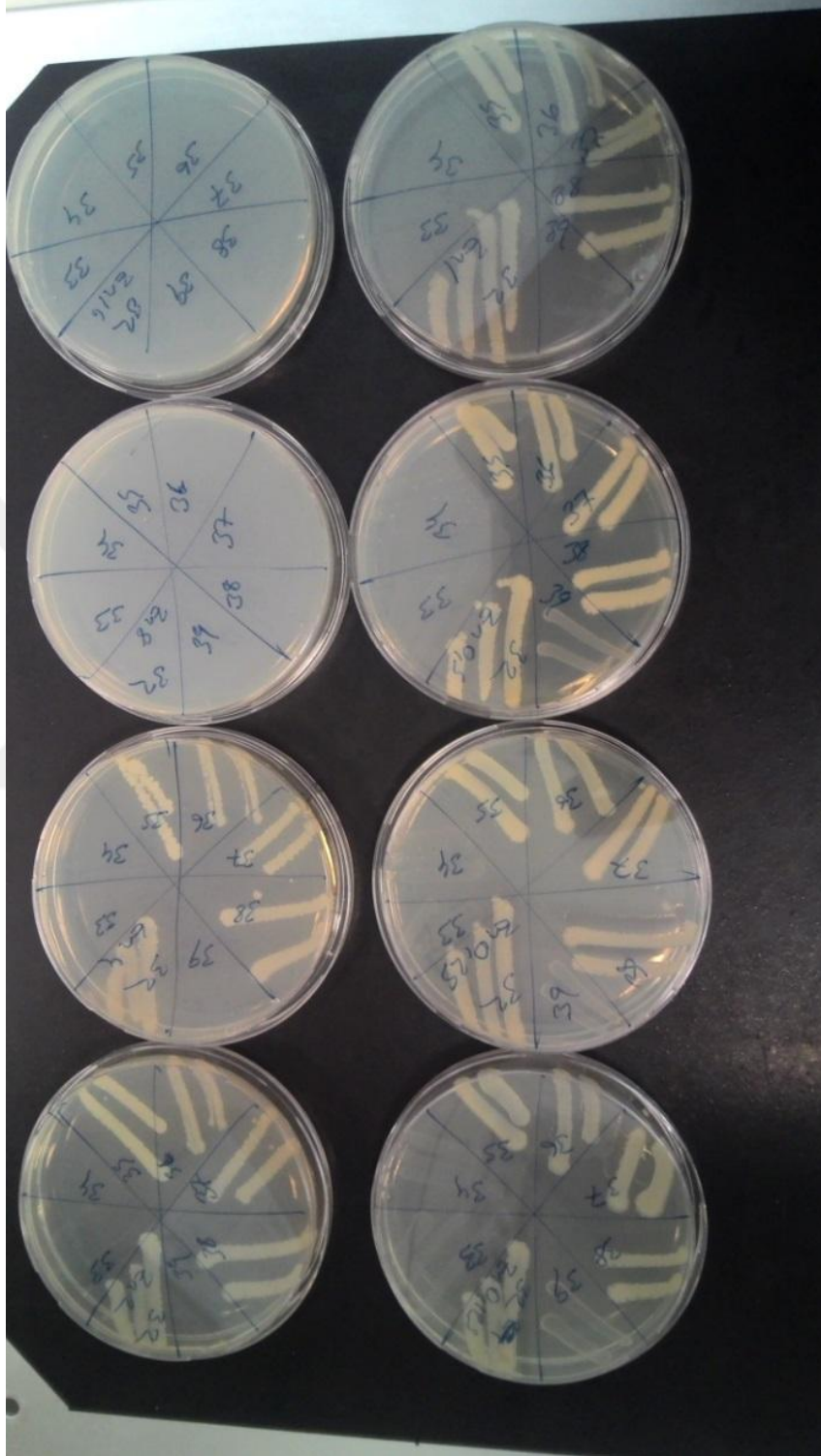
Ağır metallerle ilgili MİK testi sonuçları Çizelge 4.5' de, fotoğrafları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Ağır Metal MİK testi sonuçları.

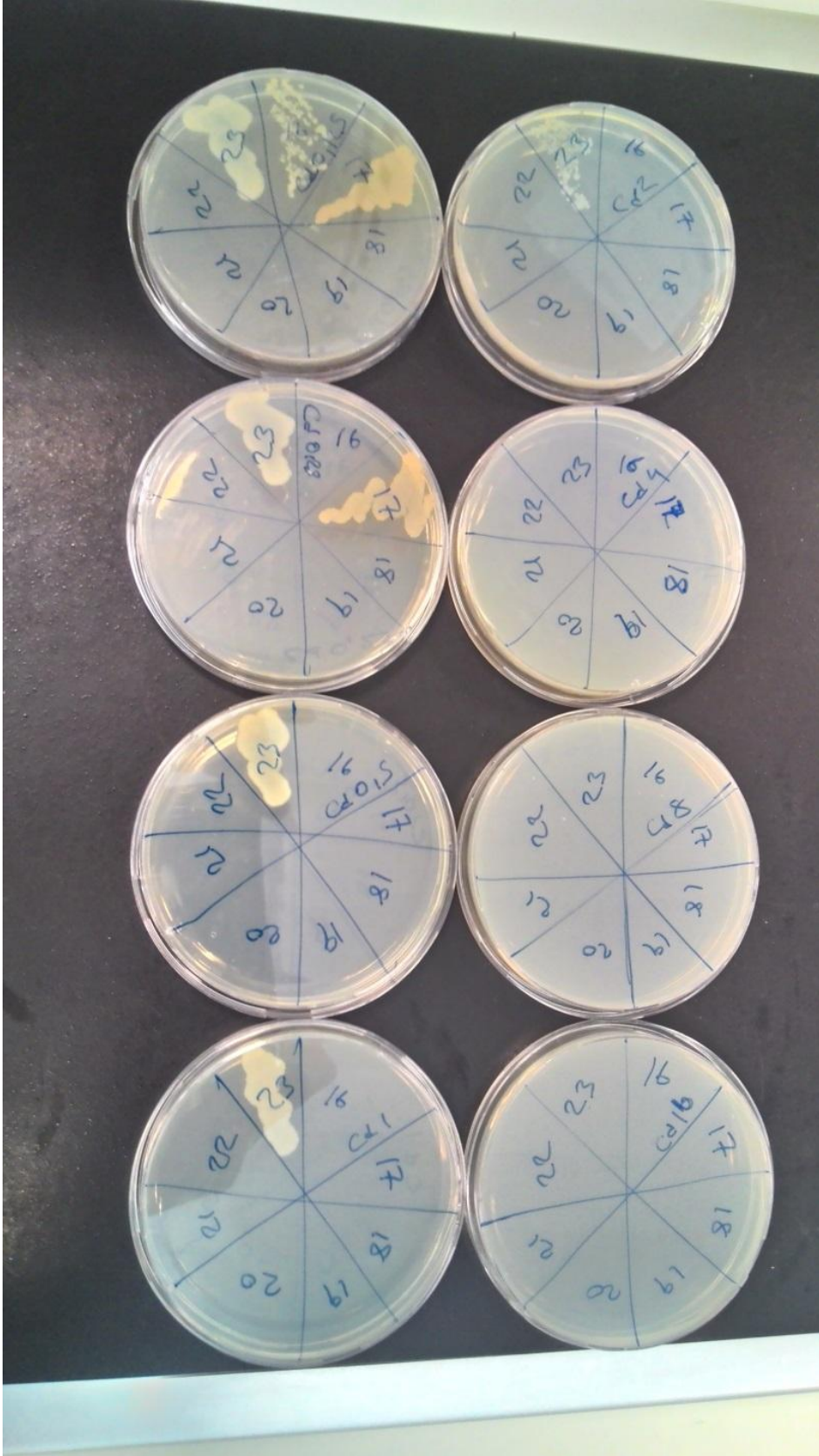
AĞIR METAL MİK (mM)						
Suş Kodu	Cu	Cd	Pb	Zn	Hg	As
As1	2	0,125	4	1	0,012	16
As2A	2	0,125	8	1	0,012	8
As3	4	0,5	8	8	0,012	16
As4	4	0,25	8	8	0,012	16
As5	4	0,5	8	4	0,012	8
As6	4	0,5	8	8	0,012	8
As6A	2	0,125	8	4	0,025	8
As7*	8	0,5	16	16	0,012	16
As8	1	0,125	8	2	0,012	8
As9	4	0,25	8	8	0,006	16
As10	4	0,25	8	8	0,012	16
As11	4	0,25	8	8	0,012	8
As12	2	0,125	8	0,5	0,012	8
As13*	4	1	16	8	0,025	16
As14	4	0,125	16	8	0,012	16
As16	4	0,25	8	8	0,012	16
As17	4	0,5	8	4	0,012	8
As18	2	0,125	8	4	0,006	2
As19	4	0,125	8	0,25	0,012	8
As20	4	0,25	8	4	0,012	16
As21	4	0,125	8	1	0,012	8
As22	4	0,125	8	1	0,012	8
As23*	4	4	16	8	0,012	16
As24	2	0,125	8	0,5	0,025	16
As25	4	0,125	8	4	0,012	16
As26	2	0,125	4	0,5	0,012	8
As27	2	0,125	4	0,5	0,012	8
As28	4	0,125	8	0,25	0,012	8
As29	2	0,125	8	1	0,012	8
As30*	4	0,5	16	2	0,012	2
As31	1	0,125	8	2	0,025	16
As32*	4	0,25	8	8	0,025	16
As33*	4	0,25	16	8	0,012	4
As34	2	0,125	8	2	0,025	16
As35	4	0,5	8	8	0,006	16
As36	4	0,5	8	8	0,025	16
As37*	4	4	16	8	0,025	16
As38	4	0,5	8	8	0,025	8
As39	2	0,125	8	2	0,025	8

*: Yüksek dirençli olarak belirlenen grup.

Ağır metallere direnç gösteren suşlar arasında 7 suş diğerlerine göre daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu 7 suş As7, As13, As23, As30, As32, As33 ve As 37 suşlarıdır.



şekil 4.7. Çinko için yapılan MİK deneyi fotoğrafı.



Şekil 4.8. Kadmiyum için yapılan MİK deneyi fotoğrafı.

Li ve Ramakrishna (2011) Torch gölünden izole ettiği bakterilere ait MİK testinde bakır için 5mM, Çinko için 6mM, kurşun için 5 mM ve cıva için 0.4 mM değerlerini belirlemişlerdir. Matyar vd. (2008) İskenderun Körfezi'nde yaptığı çalışmada su örneklerinden izole edilen 49 adet bakterinin %69.4'ü kadmiyuma, %36.7'si bakıra ve %8,2 si kurşuna dirençli olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sediment örneklerinden izole edilen 90 adet bakterinin %88.9'u kadmiyuma, %83.3'ü bakıra ve %15.6'sı kurşuna dirençli olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda yüzdelik dilim hesaplanmamış ve sadece metal direncine göre izolasyon gerçekleştirilmiştir. Matyar vd. (2008) en fazla 3200 ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) değerinde metale karşı direnç gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ise bakır için 8 mM (1276 $\mu\text{g}/\text{ml}$), çinko için 16 mM (4600 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kurşun için 16 mM (5299 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cıva için 0,025 mM (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kadmiyum için 4 mM (700 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve arsenik için 16 mM (2078 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bulunmuştur. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar iç sularda yapılan ağır metal direnç çalışmaları içinde daha yüksek değerler vermiştir. Fakat körfez çalışması ile kıyaslandığı zaman kadmiyum ve bakıra karşı bizim bulduğumuz direnç değerlerine göre daha yüksek direnç değerleri bulunmuştur. Kurşuna karşı direnç değerleri kıyaslandığı zaman çalışmamızda daha yüksek ağır metal değerlerine direnç gösteren suşlar tespit edilmiştir.

Jayaprakashvel vd. (2017) acı sulardan izole ettiği *Pseudomonas* türlerinden yaptığı çalışmada krom ve cıva direnci tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada bulunan sonuçlara göre her iki metale karşı en fazla 50 μM konsantrasyonda direnç gözlemlenmiştir. Çalışmamız kapsamında cıvaya karşı bulunan en yüksek direnç değeri 25 μM değerine tekabül etmektedir. Yine yapılan çalışma ile benzer sonuçlar bulunmuştur.

Zampieri vd. (2016) Brezilya Sao Paolo'da Araça körfezi'nden izole edilen bakteriler ile yaptığı çalışmada kadmiyum için 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bakır için 3200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve çinko için 3200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MİK testi sonuçları elde etmişlerdir. Çalışmamız ile karşılaştırıldığında kadmiyum ve çinko için çalışmamız verileri daha dirençli suşlar elde ettiğimizi göstermektedir. Kadmiyum için yine körfez çalışmasında daha yüksek MİK testi elde edilmiştir.

Cavalca vd. (2010) arsenikle kirlenmiş topraklardan yaptıkları çalışmada arseniğe karşı en fazla As(III) 50 μM ve As(V) 200 μM MİK değeri tespit etmiştir. Çalışmamız 16 mM arsenik için MİK sonucu bulunmuştur. Bu çalışmada arseniğin farklı formları incelenmiştir ve bu formlara karşı direncin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Arsenik çalışmalarında arsenit ya da arsenat olarak bulunan arsenik dikkate alınarak çalışılması daha uygun olacaktır. Çalışmada dirençli mikroorganizmalar fito-remediasyon uygulamalarında kullanılmıştır. Özellikle toprak kirliliğine karşı arsenik dirençli bakterilerin önemi bu çalışmada bir kez daha vurgulanmıştır.

Hassen vd. (1998) doğal ortamlardan (toprak süspansiyonları, kanalizasyon çamuru, atıksular ve komposto belediye katı atıkları) ağır metal direnci ile ilgili yaptıkları çalışmada; bakır için 1,8 mM, kadmiyum için 1,5 mM, çinko için 1,5 mM, cıva için 0,1 mM MİK sonuçları elde etmişlerdir. Çalışmamız ile kıyaslandığı zaman bakır, kadmiyum ve çinko için bu çalışmada bulunan değerler düşük iken cıva için yapılan çalışma bizim çalışmamıza göre daha yüksek direnç değerleri bulunmuştur.

Abou-Shanab vd. (2007) nikel zengin topraklardan izole ettiği bakteriler ile yaptığı MİK çalışmasında; arsenik için 20 mM, kadmiyum için 10 mM, bakır için 15 mM, cıva için 1mM, kurşun için 15 mM ve çinko için 20 mM ağır metal MİK sonuçları elde etmiştir. Çalışmamız sonuçları ile kıyaslandığında arsenik, kadmiyum, bakır, cıva ve çinko için bulunan değerler toprakta yapılan çalışmaya göre daha düşüktür. Sadece kurşun için bulunan direnç değeri yapılan çalışmadan yüksek çıkmıştır. Ortamın nikel bakımından zengin olması çalışmamıza göre daha dirençli suşlar elde etmelerinin nedeni olabilir. Cıva hariç diğer metallerde yüksek ve düşük değerler arasında çok fazla fark bulunmaz iken cıvada fark neredeyse 20 kat fazladır. Genel olarak bakıldığında yine cıva direncinin topraktan çalışılan örneklerde daha fazla olduğu belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Cıvanın sucul ortamlarda karasal ortamlara göre daha az bulunması ve bakterilerin cıva maruziyetinin daha düşük olması bu durumun nedenlerinden biri olarak gösterilebilir.

1978 yılında yapılan bir çalışma ise New York körfezinde Timoney vd. (1978) tarafından yapılan bir çalışmada; cıva için 50 µg/ml, kadmiyum için 84 µg/ml ve çinko için 488 µg/ml MİK değerleri tespit edilmiştir. Çalışmamız ile kıyaslandığı zaman cıva için çalışmamıza oranla daha yüksek bir direnç tespit edilirken kadmiyum ve çinko değerleri çalışmamıza oranla çok düşük kalmıştır. Yaklaşık 40 yıl önce yapılan bu çalışma ile olan fark sanayi ve endüstriyel faaliyetlerin artışı ve kirlenmenin artışı ile açıklanabilir. Zaman içerisinde doğaya karışan ağır metaller bakterilerin daha yüksek direnç sistemleri geliştirmesine neden olmuştur.

4.6. Antibiyotik MİK Testi Sonuçları

Ampisilin, gentamisin, penisilin, klindamisin ve vankomisin için yüksek metal dirençli ve düşük metal dirençli gruplar için antibiyotik MİK testi sonuçları Çizelge 4.6 ve 4.7'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Ampisilin, gentamisin, penisilin, klindamisin ve vankomisin için yüksek metal dirençli izolatlar için MİK sonuçları (µg/ml).

Suş Kodu	Gram Boyama	Ampisilin	Gentamisin	Penisilin	Klindamisin	Vankomisin
As7	-	32+	2	40+	32+	64+
As13	+	32+	1	40+	32+	1
As23	-	32+	32+	40+	32+	64+
As30	-	32+	0,5	40+	32+	64+
As32	-	4	2	40	32+	64+
As33	-	0,25	2	0,3	32+	8
As37	-	32+	32+	40+	32+	64+

Çizelge 4.7. Ampisilin, gentamisin, penisilin, klindamisin ve vankomisin için düşük metal dirençli izolatlar için MİK sonuçları (µg/ml).

Suş Kodu	Gram Boyama	Ampisilin	Gentamisin	Penisilin	Klindamisin	Vankomisin
As1	+	0,25	0,25	0,3	2	0,25
As2A	+	0,25	0,25	0,3	4	0,25
As26	+	0,25	0,25	0,3	4	0,25
As28	-	0,25	0,25	0,3	32+	0,25
As39	-	0,25	0,25	0,3	8	0,25

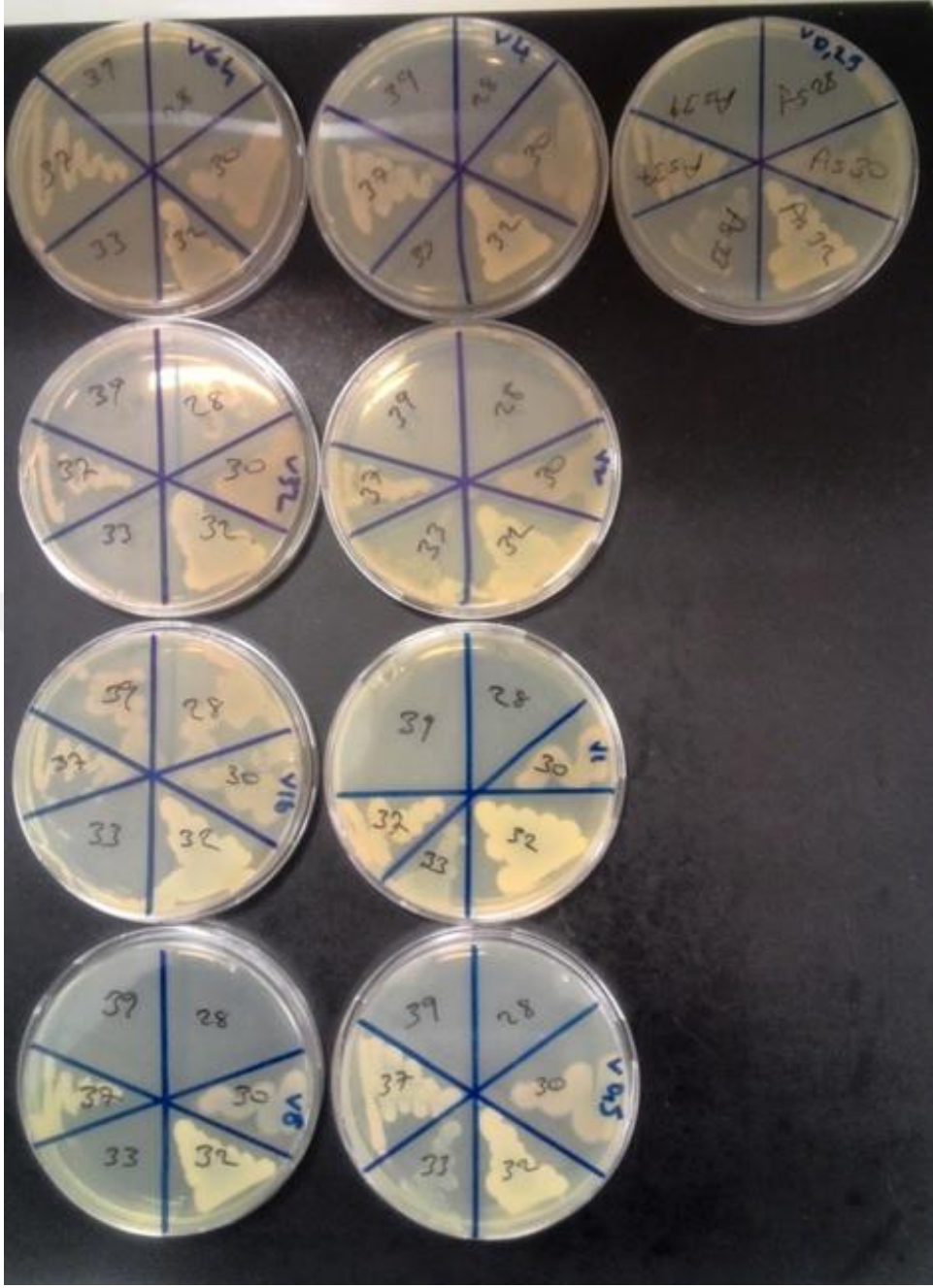
Rifampisin, sefpodoksim, ofloksasin ve enrofloksasin için yüksek metal dirençli ve düşük metal dirençli gruplar için antibiyotik MİK testi sonuçları Çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Rifampisin, sefpodoksim, ofloksasin ve enrofloksasin için yüksek metal dirençli izolatlarla ait MİK sonuçları (µg/ml).

Suş Kodu	Gram Boyama	Rifampisin	Sefpodoksim	Ofloksasin	Enrofloksasin
As7	-	1	32+	0,25	0,25
As13	+	0,5	32+	0,25	0,25
As23	-	32+	32+	0,25	0,25
As30	-	2	32+	0,25	0,25
As32	-	0,5	32+	0,25	0,25
As33	-	0,25	1	0,25	0,25
As37	-	32+	32+	0,25	0,25

Çizelge 4.9. Rifampisin, sefpodoksim, ofloksasin ve enrofloksasin için düşük metal dirençli izolatlarla ait MİK sonuçları (µg/ml).

Suş Kodu	Gram Boyama	Rifampisin	Sefpodoksim	Ofloksasin	Enrofloksasin
As1	+	0,25	8	0,25	0,25
As2A	+	0,25	4	0,25	0,25
As26	+	0,25	4	0,25	0,25
As28	-	0,25	2	1	0,5
As39	-	0,25	4	0,5	0,25



Şekil 4.9. Vankomisin için yapılan A-MİK deneyi fotoğrafı.

Antibiyotik direnci testi için 7 adet yüksek ağır metal MİK değerlerine sahip izolat ve 5 adet düşük ağır metal MİK değerlerine sahip izolat seçilmiştir. Sonuçlar ağır metal MİK sonuçlarına paralel olarak yüksek ve düşük çıkmıştır. Bunun sebebi olarak direnç mekanizmalarındaki benzerlik gösterilmektedir. Vankomisin MİK testine ait deney fotoğrafı Şekil 4.9'da verilmiştir.

Antibiyotik MİK testleri klinik patojenler için kullanılan Clinical and Laboratory Standarts Institute tarafından 2017 yılında yayınlanan “Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing” standardına göre değerlendirilmiştir.

Ampisilin için direnç noktası >32 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolattan 5 tanesi (As7, As13, As23, As30 ve As37) ampisilin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolatin tamamı ampisilin duyarlı tespit edilmiştir. Hücre duvarı yapısı üzerinde etkili olan ampisilin antibiyotiğine karşı; yüksek dirençli grubun direnç gösterip düşük dirençli grubun tamamının duyarlı olması izolatların hücre duvarı yapısı ile ilgili bir direnç geliştirdiğinin göstergesidir. Penisilin için direnç noktası >16 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolattan 6 tanesi (As7, As13, As23, As30, As32 ve As37) penisilin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolatin tamamı penisillin duyarlı tespit edilmiştir. Ampisilin sonuçlarına benzer olarak yine hücre duvarı üzerinde etkili olan penisillin antibiyotiğine direnç gösteren izolatların hücre duvarı yapısı ile ilgili direnç sistemi geliştirdiğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Sefpodoksım için direnç noktası >8 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolattan 6 tanesi (As7, As13, As23, As30, As32 ve As37) sefpodoksım dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolattan 1 tanesi (As1) sefpodoksım dirençli olarak tespit edilmiştir. Yine hücre duvarı yapısı üzerinde etkili bir antibiyotik olan sefpodoksime karşı yüksek dirençli grupta bulunan 6 izolat direnç göstermiştir. Diğer hücre duvarı yapısı üzerinde etkili antibiyotiklerin aksine bu defa düşük dirençli grupta bulunan As1 izolatu direnç göstermiştir.

Gentamisin için direnç noktası >16 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolattan 2 tanesi (As23 ve As37) ampisilin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolatin tamamı gentamisin duyarlı tespit edilmiştir. Protein sentezi üzerinde etkili olan gentamisin antibiyotiğine karşı direnç gösteren iki izolatin protein sentezi ile ilgili bir direnç geliştirdiğinin göstergesidir. Klindamisin için direnç noktası >4 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolatin tamamı klindamisin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolattan 4 tanesi klindamisin dirençli tespit edilmiştir. Gentamisin sonuçlarının aksine yine protein sentezi üzerinde etkili olan klindamisin antibiyotiğinde bir izolat hariç çalışılan tüm izolatlar direnç göstermiştir. Burada protein sentezi üzerinde üzerinde etkili iki farklı direnç sisteminden söz etmek mümkündür.

Rifampisin için direnç noktası >4 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 izolattan 2 tanesi (As23 ve As37) rifampisin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 izolatin tamamı rifampisin duyarlı tespit edilmiştir. Nükleik asit sentezini

engelleyerek çalışan rifampisin antibiyotiğine karşı direnç gösteren izolat sayısı diğer gruplara göre daha azdır. Ofloksasilin için direnç noktası $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli ve dirençsiz gruplarda yapılan tüm testlerde dirençli izolat tespit edilememiştir. Hücre duvarı yapısı üzerinde etkili olan ofloksasilin antibiyotiğine karşı direnç gösteren bir izolat tespit edilememiştir. Enrofloksasin CLSI 2017 standardında yer almamaktadır. Yapılan MİK testleri sonucu en düşük doz olan $0,25 \mu\text{g/ml}$ tüm bakteriler için MİK değeridir. Dirençli ve dirençsiz grupta yer alan tüm izolatlar enrofloksasin yönünden duyarlı tespit edilmiştir. Yine nükleik asit sentezi üzerinde etkili bir antibiyotiğe karşı direnç gözlemlenmemiştir. Enrofloksasin veteriner saha uygulamalarında ülkemizde en yaygın kullanılan antibiyotiklerden biridir ve dirençli izolatlar hayvan sağlığı açısından risk yaratmaktadır.

Vankomisin için direnç noktası $>32 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Dirençli grupta seçilen 7 suşdan 5 tanesi (As7, As23, As30, As32 ve As37) vankomisin dirençli olarak gözlemlenmiştir. Düşük dirençli grupta bulunan 5 suşun tamamı vankomisin duyarlı tespit edilmiştir. Vankomisin bilinen en etkili antibiyotiklerden biridir. Vankomisin hem hücre duvarı yapısı hem de nükleik asit sentezinde etkili olan bir antibiyotiktir. Vankomisine direnç gösteren suşlar toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir.

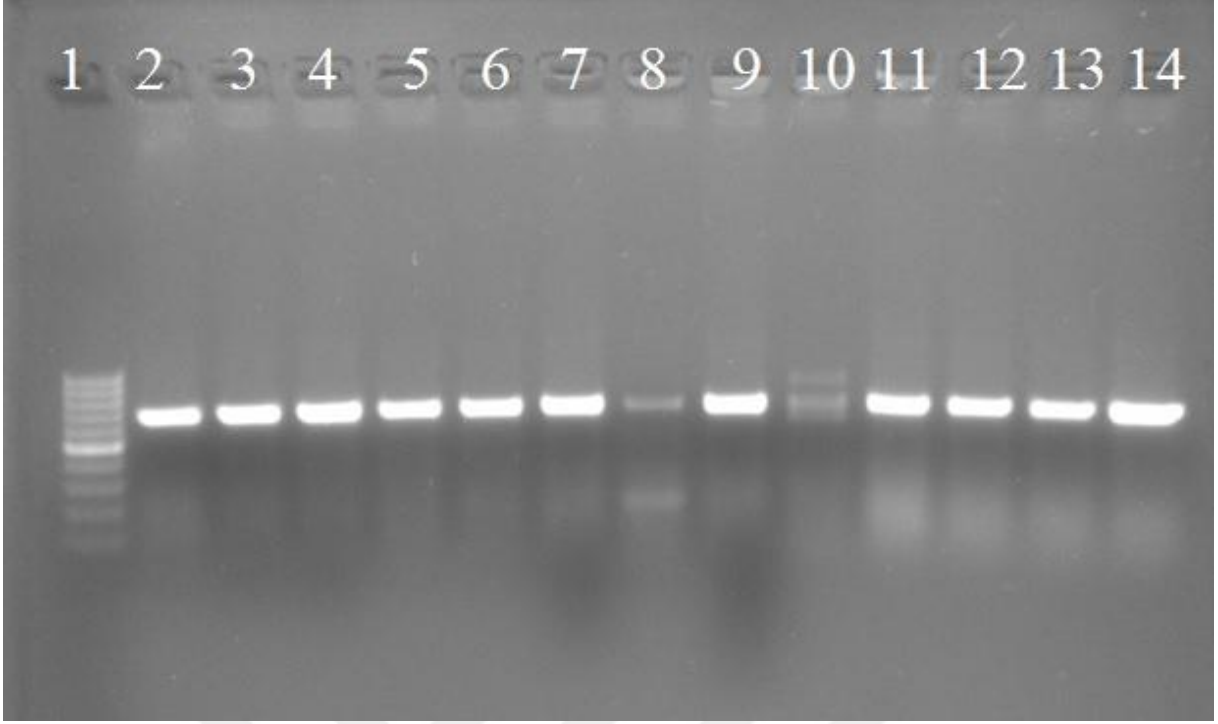
Antibiyotik MİK testi sonuçları genel olarak ele alındığı zaman daha çok hücre duvarı tabanlı direnç sistemleri gözlemlenmektedir. Birkaç örnekte protein sentezi tabanlı direnç gösteren suşlar var iken nükleik asit sentezi tabanlı bir direnç sistemi gösteren suş neredeyse yoktur. Ağır metallere ve antibiyotiklere karşı geliştirilen sistemlerin benzer ve ortak olduğu düşünülürse metal ve kirliliğe maruz kalan mikroorganizmalar hücre duvarı yapısı ve protein sentezi mekanizmalarında yaptıkları adaptasyonlar ile metallere direnç göstermektedir.

4.7. Tespit Edilen Ağır Metal Direnç Genleri

Yapılan PZR çalışmaları sonucunda ağır metal direncinden sorumlu bazı genler tespit edilmiştir. Tespit edilen genler Çizelge 4.10'da verilmiştir. Ağır metal direnç genlerine ait agaroz jel fotoğrafları şekil 4.10 ve 4.11'de belirtilmiştir.

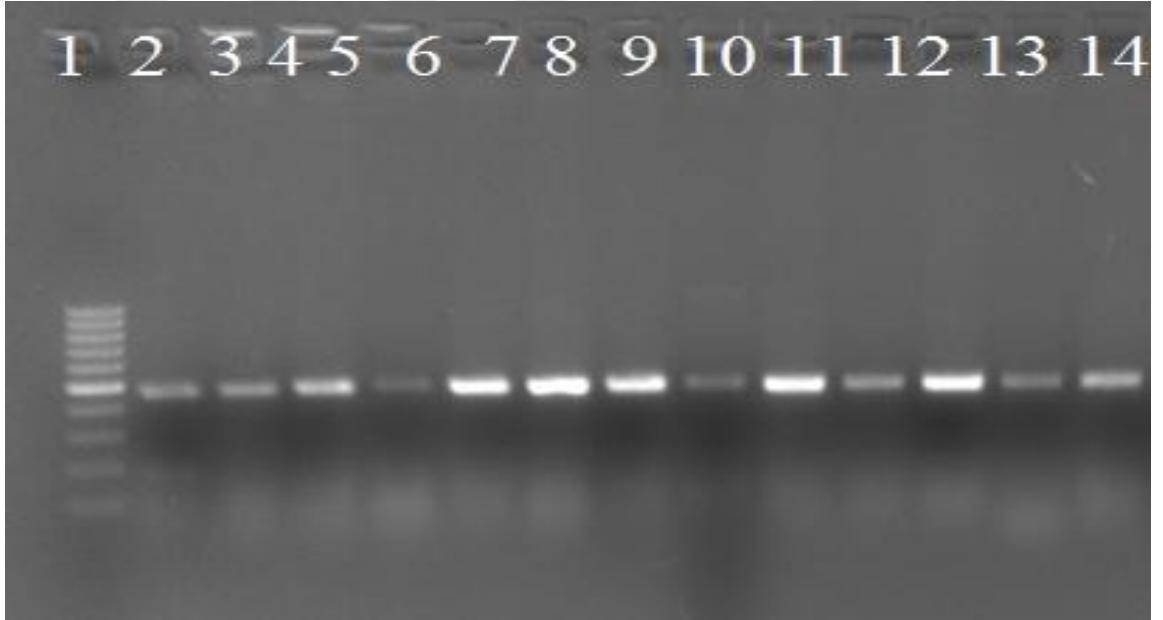
Çizelge 4.10. Ağır metal direnci tespit edilen izolatlar ve tespit edilen genler.

	cadD	copA	czcA	czcD
As 4	-	+	-	+
As 5	-	+	-	+
As 6	+	+	-	+
As 6A	+	-	-	-
As 8	+	+	-	+
As 9	+	+	+	+
As 10	+	+	+	+
As 11	+	-	+	+
As 12	+	-	-	-
As 18	+	-	+	-
As 21	+	-	-	-
As 23	-	-	+	-
As 24	-	+	-	-
As 30	-	-	-	+
As 31	-	+	+	-
As 32	-	+	+	-
As 35	-	+	-	-
As 36	-	-	-	+
As 38	+	-	-	+
As 39	+	+	-	-



Şekil 4.10. copA genine ait jel görüntüsü.

1.100 bp marker 2.As4 3.As5 4.As6 5.As8 6.As9 7.As10 8.As12 9.24 10.As30
11.As31 12.As32 13.As35 14.As39



Şekil 4.11. cadD genine ait jel görüntüsü.

1.100 bp marker 2. As21 3.As39 4.As23 5.As9 6.As10 7.As11 8.As38 9.As12 10.As35
11.As18 12.As6 13.As8 14.As6A

Tespit edilen ağır metal direnç genleri kadmiyum (11/40), bakır (11/40) ve kadmiyum-çinko-kobalt (czcA:7/40, czcD:10/40) çoklu direncini kodlayan genlerdir. Diğer direnç genlerinin tespit edilememesi türe spesifik genler olmasından kaynaklanmaktadır. Tespit edilen bakır ve kadmiyum genleri başka bir çalışmadan alınmış fakat plazmid kodlu genler olduğu için tespit edilebilmiştir. Yine çoklu direnç sağlayan czc genleride aynı şekilde plazmid kodlu ve birçok suş için tespit edilebilen genlerdir. As9 ve As10 izolatları 4 adet direnç geninin tamamını içermektedir. Bu durum çoklu dirence bir örnek teşkil etmektedir.

4.8. Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı

16 S rRNA bölgesinin DNA dizi analizleri BM Labosis firması aracılığıyla Macrogen firmasında yaptırılmıştır. Dirençli olarak tespit edilen 7 suş için tür tanısı yapılmıştır. NCBI üzerinden BLAST kullanılarak yapılan eşleme sonucu tür tanılarına ulaşılmıştır. Bulanan 16S bölgeleri NCBI Nucleotid veri tabanına kaydedilmiştir. Tür tanıları ve NCBI kayıt numaraları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Tür tanısı yapılan bakteriler ve NCBI kayıt numaraları

Suş Kodu	Bakteri Türü	NCBI Kayıt Numarası
As 7	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	KY741543
As 13	<i>Bacillus cereus</i>	MF353930
As 23	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	MF353931
As 30	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF353932
As 32	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	MF353934
As 33	<i>Paenibacillus sp.</i>	MF353933
As 37	<i>Delftia sp.</i>	MF353935

Ağır metallere yüksek direnç gösteren 7 suş üzerinde 16S rRNA tabanlı gerçekleştirdiğimiz tür tayininde ise *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Delftia tsuruhatensis*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Paenibacillus sp.*, *Delftia sp.* türleri tespit edilmiştir. Bu türlerden özellikle *Delftia* türleri dikkat çekmektedir. *Delftia* türleri ağır metal indirgenme deneylerinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Patogen özellik gösteren ve bitki köklerine yakın gelişen bu tür toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu suşlar daha detaylı araştırmalar ile biyoteknolojik önemi olan biyoremediasyon çalışmalarında kullanılma potansiyeline sahiptir (Shigematsu vd., 2003). Diğer dikkat çeken

ve sucul ortamlarda beklenen türlerden olan *Pseudomonas* sp. türüdür. Bu türün patojen suşları olması ve antibiyotik dirençli olması halk sağlığı açısından bir tehdit oluşturmaktadır (Van Peer vd., 1991). Yine aynı şekilde tespit ettiğimiz *Bacillus cereus* türünde patojen olarak bilinen bir suştur ve antibiyotik dirençli olması halk sağlığı açısından önem arz etmektedir (Drobniewski, 1993). Tespit edilen türlerden *Ochrabactrum anthropi* toprakta bulunan fırsatçı ve nozokomial enfeksiyonlara neden olan önemli bir suştur. Antibiyotik dirençli olması bölgede ciddi salgın enfeksiyonlara neden olabilir (Alnor vd., 1994). *Acinetobacter haemolyticus* olarak tespit edilen suşlar potansiyel patojen olarak adlandırılabilir. Ağır metal açısından dirençli ve ağır metal indirgenmesi reaksiyonlarında rol aldığı bilinir. Halk sağlığı ve biyoteknolojik olarak önem arz etmektedir (Pei vd., 2009). Tespit edilen *Paenibacillus* türü extrasellüler enzimleri ile tarım, biyoteknoloji ve medikal alanda önemlidir. Biyoteknolojik önemlerinden dolayı üzerinde çalışılıp detaylı incelemeler yapılması gereken bir suştur (Choi vd., 2004). Rapor etmiş olduğumuz türlerin tamamı Burdur Gölü'nde ilk defa rapor edilmiş türlerdir.

5. SONUÇ

Burdur Gölü alkali yapısı nedeni ile canlı yaşamı için ekstrem bir ortamdır. Bunun yanında yıllar boyu yapılan yanlış uygulamalar ve kirletici faaliyetler sonucu daha ekstrem bir hal almıştır. Çalışmamız kapsamında izole ettiğimiz bakterin ağır metaller ve antibiyotiklere gösterdiği direnç dikkate değer derecede yüksektir. Bu direnç ortamda ağır metal bulunmasının bir sonucu olarak gösterilebilir. Fakat yaptığımız analizlerde ağır metaller düşük derecede tespit edilmiş veya edilememiştir. Bu yeni analiz yöntemleri ve örnekleme tekniklerinin gerektiğini göstermektedir. Ağır metal direnci birçok çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da antibiyotik direnci ile paralel sonuç vermiştir. Bu durum halk ve hayvan sağlığı açısından bir tehdit oluşturmaktadır. Bulunan dirençli suşlar içerisinde patojen olduğu bilinen suşlar tespit edilmiştir. Hatta bu patojenite faktörlerine biyofilm oluşumunda dahil olacak olursa durum çok ciddi bir hal almaktadır.

Çalışmamızda gölden ağır metalleri indirgeme özelliğine sahip bakteri türleri izole edilmiştir. Bu türler birçok ülkede ağır metallere karşı “Biyoremediasyon” uygulamalarında kullanılmaktadır. Çalışmadan izole ettiğimiz türler biyoteknolojik olarak doğayı temizleme ihtimaline sahiptir. Bu suşlar üzerinde daha detaylı çalışmalar yaparak biyoteknolojik önemleri araştırılmalıdır.

İzole edilen bakterilerin ürettikleri enzimler için daha detaylı bir çalışma yapılması durumunda biyoteknolojik olarak değerli enzim kaynaklarının elde edileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abou-Shanab, R. A. I., Van Berkum, P., Angle, J. S., 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68(2), 360-367.
- Aiking, H., Kok, K., Heerikhuizen, H. V., Van't, R. J., 1982. Adaption to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 938-944.
- Akbulut, N., Akbulut, A., Atasagun, S., Arslan, N., 2014. The Evaluation of the Water Quality and Trace Metal Concentration Through the Kızılırmak River of Turkey. 7.nd Symposium for European Freshwater Sciences, Sayfa 0-0, 201.
- Akhand, A., Chanda, A., Das, S., Sanyal, P., & Hazra, S. (2016). High cadmium contamination at the gateway to Sundarban ecosystem driven by Kolkata metropolitan sewage in India. *Current Science*, 110(3), 386.
- Alnor, D., Frimodt-Møller, N., Espersen, F., & Frederiksen, W., 1994. Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*. *Clinical Infectious Diseases*, 18(6), 914-920.
- Anderson, C. R., Cook, G. M., 2004. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Current Microbiology*, 48(5), 341-347.
- Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O., 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 94.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., McArthur, J. V., 2006. Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trends in microbiology*, 14(4), 176-182.
- Banik, S., Das, K., Islam, M., Salimullah, M., 2014. Recent Advancements and Challenges in Microbial Bioremediation of Heavy Metals Contamination. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 2, 1035.
- Belliveau, B. H., Staradub, M. E., Trevor, J. T., 1991. Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(5), 13-520.
- Beveridge, T. J., Fyfe, W. S., 1985. Metal fixation by bacterial cell walls. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 22, 1893-1898.
- Beveridge, T. J., Murray, G. E., 1976. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 127, 1502-1518.
- Boyd, E., Barkay, T., 2012. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Frontiers in Microbiology*, 3, 349.

- Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198-207.
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., Andreoni, V., 2010. Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3), 154-164.
- Ceylan, Ö., Ugur, A., 2012. Bio-monitoring of Heavy Metal Resistance in non-aeruginosa *Pseudomonas* and *Pseudomonas* Related Species. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(18).
- Chang, J. S., Kim, Y. H., Kim, K. W., 2008. The ars genotype characterization of arsenic-resistant bacteria from arsenic-contaminated gold–silver mines in the Republic of Korea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 155-165.
- Choi, K. K., Park, C. H., Kim, S. Y., Lyoo, W. S., Lee, S. H., Lee, J. W., 2004. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 1009-1013.
- Christensen, W. B., 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*, 52(4), 461.
- CLSI, 2017. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dell'Amico, E., Mazzocchi, M., Cavalca, L., Allievi, L., Andreoni, V., 2008. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microbiological Research*, 163(6), 671-683.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Paul, D., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
- Drobniewski, F. A., 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 324-338.
- Eghomwanre, A. F., Obayagbona, N. O., Osarenotor, O., Enagbonma, B. J., 2016. Evaluation of antibiotic resistance patterns and heavy metals tolerance of some bacteria isolated from contaminated soils and sediments from Warri, Delta State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 20(2), 287-291.
- El-Sayed, M. H., 2016. Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF-13 Isolated from Industrial Effluents. *American Journal of Microbiological Research*, 4(1), 26-36.

- Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Blaghen, M., 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*, 41(3), 151-156.
- Gómez-Sanz, E., Kadlec, K., Feßler, A. T., Zarazaga, M., Torres, C., Schwarz, S., 2013. Novel erm (T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3275-3282.
- Gülcü-Gür, B., Tekin-Özan, S., 2017. The Investigation Of Heavy Metal Levels In Water And Sediment From Işıklı Lake (Turkey) In Relation To Seasons And Physico-Chemical Parameters. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 3 (2)
- Harnett, N. M., Gyles, C. L., 1984. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 930-945.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64(1), 7-15.
- Hayat, K., Menhas, S., Bundschuh, J., Chaudhary, H. J., 2017. Microbial biotechnology as an emerging industrial wastewater treatment process for arsenic mitigation: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 151, 427-438.
- He, W., Bai, Z. L., Liu, W. X., Kong, X. Z., Yang, B., Yang, C., Xu, F. L., 2016. Occurrence, spatial distribution, sources, and risks of polychlorinated biphenyls and heavy metals in surface sediments from a large eutrophic Chinese lake (Lake Chaohu). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 10335-10348.
- Hoyle, B., Beveridge, T. J., 1983. Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), 749-752.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Janowska, B., Szymański, K., Sidelko, R., Siebielska, I., Walendzik, B., 2017. Assessment of mobility and bioavailability of mercury compounds in sewage sludge and composts. *Environmental Research*, 156, 394-403.
- Jarosławiecka, A., Piotrowska-Seget, Z., 2014. Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology*, 160(1), 12-25.
- Jayaprakashvel, M., Bharathi, C. D., Muthezhilan, R., Hussain, A. J., 2017. Horizontal Transfer of Heavy Metal Resistance Plasmid from A Brahcish Waster Bacterium *Pseudomonas* Sp. AMET1221 to *Escherichia coli* DH5 α . *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(2), 1199-1206.
- Ji, G., Silver, S., 1995. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology* 14:61-75.

- Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., Murayama, T., 1995. Nickel resistance in yeast and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 164-168.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2003. Metallerin çevresel etkileri-I. *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
- Kowshik, M., 2013. Mechanisms of metal resistance and homeostasis in haloarchaea. *Archaea*, 2013.
- Lenart-Boroń, A., Boroń, P., 2014. The effect of industrial heavy metal pollution on microbial abundance and diversity in soils—a review. In *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. InTech.
- Li, K., Ramakrishna, W., 2011. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, 189, 531–539.
- Lima e Silva, A. A. D., Carvalho, M. A., de Souza, S. A., Dias, P. M. T., Silva Filho, R. G. D., Saramago, C. S., Hofer, E., 2012. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1620-1631.
- Liu, P., Chen, X., Huang, Q., Chen, W., 2015. The Role of CzcRS Two-component systems in the heavy metal resistance of *Pseudomonas putida* X4. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 17005-17017.
- Margaryan, A. A., Panosyan, H. H., Birkeland, N. K., Trchounian, A. H., 2013. Heavy metal accumulation and the expression of the *copA* and *nikA* genes in *Bacillus subtilis* AG4 isolated from the Sotk Gold Mine in Armenia. *Biological Journal of Armenia*, 65(3), 51-57
- Marques, A. M., Congregado, F., Simon-Pajol, D. M., 1979. Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *Journal of Applied Microbiology*, 47, 347-350.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., Chowdhury, A. M. A., 2017. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65-74.
- Matyar, F., Gülnaz, O., Guzeldag, G., Mercimek, H. A., Akturk, S., Arkut, A., Sumengen, M., 2014. Antibiotic and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from the Seyhan Dam Lake and Seyhan River in Turkey. *Annals of microbiology*, 64(3), 1033-1040.
- Matyar, F., Kaya, A., Dinçer, S., 2008. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407(1), 279-285.
- McEntee, J. D., Woodrow, J. R., Quirk, A. V., 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(3), 515-520.

- Mergeay, M., 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends Biotechnology*, 9, 17-24.
- Misra, T.K., 1992, Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, 27, 4-16.
- Morozzi, G., Ceni, G., Scardazza, F., Pitzurra, M., 1986. Cadmium uptake by growing of gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbios*, 48, 27-35.
- Muhsin, T. M., Aubaid, A. H., Al-Duboon, A. H., 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses*, 40(11-12), 465-469.
- Murata, K., 1985. Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *saccharomyces cerevisiae* : expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Applied Environmental Microbiology*, 50:1200-1207
- Murphy, R. J., Levy, J. F., 1983. Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81, 165-168.
- Nakahara, H., Ishikawa, T., Yasunaga, S., Kondo, I., Kozukue, H., Silver, S., 1977. Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 33, 975:976.
- Ni'bhriain, N. N., Silver, S., Foster, T. J. (1983). Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R100-1. *Journal of Bacteriology*, 155, 690-703.
- Nies, D. H., 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*, 27, 17-28.
- Nies, D. H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 313-339.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Karutha Pandian, S.K., 2011. Assessment and charecterization of heavy metal resistance in palk bay sediment bacteria. *Marine environmental research* 71, 283-294
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. J., 2015. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 964.
- Pei, Q. H., Shahir, S., Raj, A. S., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A., 2009. Chromium (VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 1085-1093.
- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B., Rosen, B. P., 1998. Pb(II) translocating p-type ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 32614-32617.
- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., Gillan, D. C., 2014. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental Pollution*, 189, 143-151.

- Rouch, D. A., Lee, B. T. D., Morby, A. P., 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 14, 132-141.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., & Ventosa, A., 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300.
- Schwarz, S. T., Hobel, H., 1989. Plasmid and resistance to antimicrobial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle. *Journal of Veterinary Medicine*, 36, 669-673.
- Scott, J. A., Palmer, S. J., 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 221-225.
- Scott, J. A., Sage, G. K., Palmer, S. J., 1988. Metal immobilization by microbial capsular coatings. *Biorecovery*, 1, 51-58.
- Sevgi, E., CORAL, G., Gizir, A. M., Sangün, M. K., 2010. Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. *Turkish Journal of Biology*, 34(4), 423-431.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., Kida, K., 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1479-1483.
- Silver, S., 1992. Plasmid-determined metal resistance mechanisms: Range and overview. *Plasmid*, 27, 1-3.
- Silver, S., Ji, G., 1994. Newer systems for bacterial resistance's to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspectives*, 102, 107-113.
- Silver, S., Nucifors, G., Chu, L., Misra, T. K., 1989. Bacterial resistance ATPases: Primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends in Biochemical Sciences*, 14, 76-80.
- Silver, S., Phung, L. T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology*, 50, 753-789.
- Silver, S., Walderhaug, M., 1992. Gene regulation and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 56:195-228.
- Sobolev, D., Begonia, M., (2008). Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(5), 450-456.

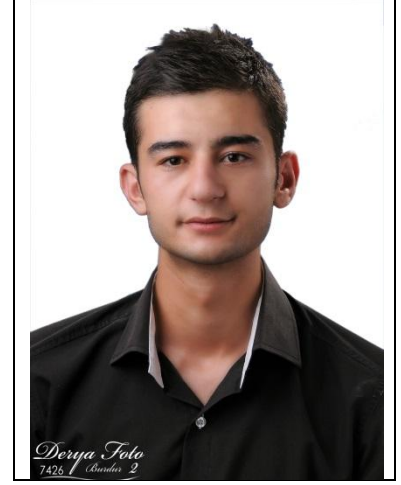
- Soge, O. O., Beck, N. K., White, T. M., No, D. B., Roberts, M. C., 2008. A novel transposon, Tn 6009, composed of a Tn 916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(4), 674-680.
- Sudagıdan, M., Aydın, A., 2009. Screening virulence properties of staphylococci isolated from meat and meat products. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 96(5/6), 128-134.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133-164.
- Trajanovska, S., Britz, M. L., Bhave, M., 1997. Detection of heavy metal ion resistance genes in lead-resistant bacteria. In *Global Environmental Biotechnology*, 9-25.
- Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 447-464.
- Turna, İ., Gülle, İ., Güçlü, S. S., 2005. Burdur Gölü'nün Su Kalitesi, Planktonu ve Verimlilik Düzeyi. I. Burdur Sempozyumu, 16-19.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., Schippers, B., 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
- Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R., 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*, 8(1), 121-135.
- Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D. D., Sorial, G. A., Timberlake, D., 2004. Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems—a literature review. *Environmental Pollution*, 131(2), 323-336.
- Wang, Y. T., Shen, H., 1995. Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 14, 159-163.
- Weiss, A., Murphy, S., Silver, S., 1977. Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 132, 197-208.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Isrn Ecology*.
- Yavuz, O., Sarıgul, N., 2016. Toprak Ve Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği Ve Ağır Metal Dirençli Mikroorganizmalar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 44-51.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., Fanning, S., 2017. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology*, 64, 23-32.

Zampieri, B. D. B., Pinto, A. B., Schultz, L., de Oliveira, M. A., de Oliveira, A. J. F. C., 2016. Diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in polluted sediments of the Araça Bay, São Sebastião (SP), and the relationship between heavy metals and organic matter concentrations. *Microbial Ecology*, 72(3), 582-594.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Orhan YAVUZ
Doğum Yeri ve Yılı : SÜTÇÜLER 1989
E-posta : orhan.yavuz.23@gmail.com



<u>Eğitim Durumu</u>		<u>Yıl</u>
Lise	: Isparta Anadolu Lisesi	2003-2007
Lisans	: Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.	2008-2013

<u>Çalıştığı Kurum / Kurumlar</u>	<u>Yıl</u>
1- Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi	2012 - Devam ediyor

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

- 1- Yavuz, O., & Sarıgül, N. (2016). Toprak Ve Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği ve Ağır Metal Dirençli Mikroorganizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1), 44-51.

Bilimsel Toplantı, Kongre ve Sempozyum Sunumları

1. Mert Sudağıdan, **Orhan Yavuz**, Ali Aydın (28-30 Nisan 2014). Biofilm formation and related gene contents of foodborne *Staphylococcus aureus* strains. VetİstanbulGroupCongress-2014, İstanbul (Poster sunumu).
2. **Orhan Yavuz**, Mert Sudağıdan, Ali Aydın (23-27 Haziran 2014). Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Dirençliğinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (poster sunumu).
3. Ali Aydın, Mert Sudağıdan, **Orhan Yavuz** (5-7 Eylül 2014). Genetic Relatedness of Oxytetracycline Resistant Foodborne *Staphylococcus aureus* Strains. 5th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine 2014, Ohrid-Macedonia (Sözlü sunum).
4. Mert Sudağıdan, **Orhan Yavuz**, Ali Aydın (7-9 Nisan 2015), Virulence Properties Of Panton-

- Valentine Leukocidin Positive Foodborne *Staphylococcus aureus* Strains. II International VETistanbul Group Congress 2015, Sain-Peterbburg, Russia (Poster Sunumu).
5. Ali Aydın, Mert Sudağıdan, **Orhan Yavuz** (7-9 Nisan 2015) Multidrug-Resistant Foodborne *Staphylococcus aureus* Strains and Related Gene Contents. II International VETistanbul Group Congress 2015, Sain-Peterbburg, Russia (Poster Sunumu).
 6. **Orhan Yavuz**, Mert Sudağıdan, Ali Aydın (28-30 Nisan 2015) Gıda Kaynaklı Stafilokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Araştırılması. İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi Nevşehir (Poster Sunumu)
 7. **Orhan Yavuz**, Nermin SARIGÜL, Mert SUDAĞIDAN (18-19 Aralık 2015) Kirletilmiş Sucul Ortamlardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Ağır Metal Dirençliliğinin Belirlenmesi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya (Poster Sunumu).
 8. **Orhan Yavuz**, Nermin SARIGÜL, Mert SUDAĞIDAN (18-19 Aralık 2015) Burdur Gölü'nden İzole Edilen Mikroorganizmaların Ekstrasellüler Enzim Aktivitesinin Tespit Edilmesi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya (Poster Sunumu).
 9. Ahu Demirtaş, Mert Sudağıdan, Erhan Keyvan, **Orhan Yavuz**, Özlem Yıldız Gülay, Hakan Öztürk (28 Eylül-1 Ekim 2016) . Determination Antibacterial Effects of Green Leaf Volatiles (Green Odour) on Gram-positive and Gram-negative Rumen Bacteria. 1st International Animal Nutrition Congress, Antalya (Sözlü Sunum).
 10. Orhan Yavuz, Mert Sudağıdan, Ali Aydın (4-8 Ekim 2017) Midye Dolma Örneklerinden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Araştırılması. 7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Aydın (Poster Sunumu).
 11. Ahu Demirtaş, Mert Sudağıdan, **Orhan Yavuz**, Erhan Keyvan, Özlem Yıldız-Gülay, Hakan Öztürk (16-18 Kasım 2017) Invitroalteration of rumen bacterial population by a green leaf volatile, cis-3-hexenal, determined using real-time PCR. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia-Bulgaristan (Sözlü Sunum).
 12. Ali Aydın, Mert Sudağıdan, Ayşen Çoban, Alparslan Kadir Devrim, Orhan Yavuz, Nermin Sarıgül (1-3 Aralık 2017) Gıda Kaynaklı Psikrofilik Pseudomonas Türlerinde Ekstrasellüler Lipaz Üretiminin Araştırılması. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir (Sözlü Sunum).

NCBI Gen Bankası Veri Tabanında İsmime Kayıtlı Gen Dizileri

1. *Staphylococcus epidermidis* strain GKY 8/1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1432 bp linear DNA Accession: KM236692
2. *Staphylococcus epidermidis* strain GKY 8/1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1453 bp linear DNA Accession: KM236691

3. *Staphylococcus epidermidis* strain P 3/2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1441 bp linear DNA Accession: KM217571
4. *Staphylococcus hominis* strain P 2/1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1435 bp linear DNA Accession: KM217570
5. *Staphylococcus epidermidis* strain P 1/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1437 bp linear DNA Accession: KM217569
6. *Staphylococcus aureus* strain IS 1/2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1431 bp linear DNA Accession: KM217568
7. *Staphylococcus epidermidis* strain GKY 4/1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1438 bp linear DNA Accession: KM209365
8. *Staphylococcus epidermidis* strain C6/2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1435 bp linear DNA Accession: KM209364
9. *Staphylococcus aureus* strain EGE-MRSA 50B Panton-Valentine leukocidin S (lukPV-S) and Panton-Valentine leukocidin F (lukPV-F) genes, complete cds, 1918 bp Linear DNA Accession: KM588922
10. *Staphylococcus epidermidis* strain Y43B/2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,437 bp linear DNA Accession: KF923963.1
11. *Staphylococcus sciuri* strain Y43A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,427 bp linear DNA Accession: KF923958.1
12. *Staphylococcus sciuri* strain Y43B/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,426 bp linear DNA Accession: KF803559.1
13. *Staphylococcus sciuri* strain Y29A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,421 bp linear DNA Accession: KF803558.1
14. *Staphylococcus aureus* strain Y26C panton-valentine leukocidin S (lukPV-S) and panton-valentine leukocidin F (lukPV-F) genes, complete cds 1,918 bp linear DNA Accession: KF773712.1
15. *Staphylococcus aureus* strain Y26C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,428 bp linear DNA Accession: KF575166.1
16. *Ochrobactrum anthropi* strain As-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1373 bp linear DNA Accession: KY741543
17. *Bacillus cereus* strain As-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1444 bp linear DNA Accession: MF353930
18. *Delftia tsuruhatensis* strain As-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1409 bp linear DNA, Accession: MF353931
19. *Pseudomonas* sp. strain As-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1440 bp linear DNA, Accession: MF353932

20. *Acinetobacter haemolyticus* strain As-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1417 bp linear DNA, Accession: MF353934
21. *Paenibacillus* sp. strain As-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1448 bp linear DNA, Accession: MF353933
22. *Delftia* sp. strain As-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 1411 bp linear DNA, Accession: MF353935

