

TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN
AĞIR METAL VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet YAZICIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran - 2010

TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN
AĞIR METAL VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet YAZICIOĞLU

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Haziran - 2010

KABUL ve ONAY SAYFASI

Demet YAZICIOĞLU'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN AĞIR METAL VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ /2010

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK (Danışman)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cihan DARCAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Rahmi KASIMOĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun/...../2010 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN AĞIR METAL VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet YAZICIOĞLU

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2010

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

ÖZET

Bu çalışmada farklı toprak örneklerinden izole edilen endospor oluşturan *Bacillus sp.* izolatlarının ağır metal toleranslılığı ve antibiyotik direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ağır metallere olan toleranslılık düzeylerinin belirlenmesi için $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , HgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, metal tuzları kullanılmıştır. Üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu, Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MIK) değeri olarak kabul edilmiştir. Referans suş olarak *B. subtilis* NRRL B-209 suşu kullanılmıştır. Referans suş ile kıyaslandığında, farklı toprak örneklerinden izole edilen 161 suşun % 98.13'ü kurşun, % 89.44'ü bakır, % 55.27'si nikel, % 50.93'ü çinko, % 29.8'i kadmiyum ve % 4.34'ü civa ağır metale dirençli olmasına rağmen, izolatların tümünün mangan ağır metale referans ile aynı direnci gösterdiği bulunmuştur. İzolatların antibiyotik direnci, agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm izolatların %47.82'sinin sefotaksim'e, %21.11'nin amfisilin'e, %10.55'inin tetrasiklin'e, %8.07'sinin klindamisin'e, %7.45'inin vankomisin'e, , %6.83'ünün rifamisim'e, %4.96'sinin streptomisin'e, %3.72'sinin eritromisin'e, %2.48'inin kloronfenikol'e ve %0.62'sinin imipenem'e dirençli olduğu bulunmuştur. 161 izolattan kurşun ve cıvaya yüksek toleranslılık gösteren 4'ü, VITEK tanımlama testi ile T56 *B.pumilus*, T62 *B.subtilis*, T65 *B.cereus* ve T113 *Paenibacillus polymyxa* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen verilere göre izole edilen endospor oluşturan *Bacillus sp.* suşlarının ağır metal ve antibiyotik dirençliliği arasında bir ilişki görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler : Ağır Metal, Antibiyotik, *Bacillus sp.*

**DETERMINATION OF HEAVY METAL AND ANTIBIOTIC RESISTANCE
LEVELS OF ENDOSPORE-FORMING BACILLI ISOLATED FROM SOIL SAMPLES**

Demet YAZICIOGLU

Biology Department, M.S. Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferdag COLAK

SUMMARY

The aim of this study was to determine the heavy metal tolerance and antibiotic resistance of the endospore-forming *Bacillus sp.* strains isolated from different soil samples. For determining the tolerance of the isolated strains to heavy metals, CuSO₄·5H₂O, CdCl₂·H₂O, ZnCl₂, HgCl₂, MnCl₂·4H₂O, NiCl₂·6H₂O ve Pb(NO₃)₂ were used as the metal salts and the lowest metal concentration that inhibites the growth of the isolates was considered as the MIC value. *B. subtilis* NRRL B209 was used as the reference strain. Although, as compared with the reference strain, the metal tolerance percentages of 161 isolates obtained from different soil samples were 98.13 % for lead, 89.44 % for copper, 55.27 % nickel, 50.93 % zinc, 29.81 % cadmium, and 4.34 % mercury, all isolates exhibited same tolerance as the reference strain to manganese. Antibacterial resistance of each isolate was determined by using the agar disc diffusion method. The antibiotic resistance percentages of the isolates were 47.82 % for cefotaxime, 21.11 % for ampicilline, 10.55 % for tetracycline, 8.07 % for clindamycin, 7.45 % for vancomycin, , 6.83 % riphamycin, 4.96 % for streptomycin, 3.72 % for erythromycin, 2.48 % for chloramphenicol and 0.62 % for imipenem. Four strains showing high tolerance to lead and mercury from 161 isolates were identified as *B.pumilus* T56, *B.subtilis* T62, *B.cereus* T65 ve *Paenibacillus polymyxa* T133 with VITEK identification testing system. According to the results obtained, there was no relation between the heavy metal tolerance and antibiotic resistance of the endospore-forming *Bacillus sp.* strains isolated.

Keywords : Heavy Metal, Antibiotic, *Bacillus sp.*

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez konumun seçimimde ve yapım aşamasında her türlü desteği bana sağlayan ve her konuda sonsuz sabır gösteren sevgili danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Deneyisel çalışmalarımda bana yardımcı olan Yüksek lisans Öğrencileri ve arkadaşlarım Ferhan YEDİDAĞ’a, Öznur AKTOP’a, Ebru AYDIN’a ve Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji bölümünden Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ ‘e ve Araştırma Görevlisi Kadriye İNAN’ a çalışmamda göstermiş oldukları ilgi ve alakadan, ayrıca göstermiş oldukları misafirperverlikten dolayı teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği gösteren sevgili aileme ne kadar teşekkür etsem azdır. Her zaman beni destekleyen ve moral veren kardeşlerim Öznur, Atakan ve Gökhan’a ve sevgili annem ve babama teşekkür ederim.

Demet YAZICIOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Basillus Cinsi	1
1.1.1. Basillus hücre morfolojisi ve koloni özellikleri	1
1.1.2. Hücre çeperi ve zarı	2
1.1.3. Spor yapısı ve oluşumu	3
1.1.4. Ekoloji ve habitatlar	4
1.1.5. Basilluların önemi ve endüstriyel kullanımı	5
1.2. Basillus Cinsi Tanı Yöntemleri	5
1.2.1. Biyokimyasal özelliklere dayalı tanı (VITEK)	6
1.3. Ağır Metaller	6
1.3.1. Ağır metal tanımı	6
1.3.2. Bazı ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları.....	6
1.3.3. Ağır metaller ve çevre kirliliği	8
1.3.4. Ağır metallerin önemi	9
1.3.5. Ağır metallerin hücre içine alınımı	10
1.3.6. Ağır metallerin toksik etki mekanizmaları	12
1.3.7. Mikrobiyal ağır metal dirençlilik mekanizmaları.....	12
1.3.8. Plazmitler ve transpozoonlar	15
1.4. Antimikrobiyal Maddelerin Önemi	18
1.4.1. Antibiyotik direnç gelişim mekanizmaları	19
1.5. Çalışmanın Amacı	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2. MATERYAL ve METOD.....	21
2.1. Materyal.....	21
2.1.1. Biyolojik materyaller	21
2.1.1.1.Bakteri izolatları.....	21
2.1.2. Kimyasal materyaller	21
2.1.2.1.Ağır metal dirençlilik testinde kullanılan ağır metaller.....	21
2.1.2.2. Kullanılan antibiyotikler	22
2.1.3. Besiyerleri.....	22
2.1.4. Çözeltiler.....	23
2.1.5. Boyalar	24
2.2. Metod.....	25
2.2.1. Endospor oluşturan basillerin izolasyonu	25
2.2.1.1. Gram boyama	25
2.2.1.2. Katalaz aktivitesi	25
2.2.1.3. Endospor boyama.....	25
2.2.2. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi	26
2.2.3. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi.....	26
2.2.4. Çoklu antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi.....	27
2.2.5. Endospor oluşturan basillerin identifikasyonu	27
2.2.5.1.Biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon	27
3. BULGULAR.....	29
3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu	29
3.2. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri.....	30
3.3. İzole Edilen Basillus Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri	45
3.4. Ağır Metale Dirençli Olan Basillerin İdentifikasyonu	51
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
5. KAYNAKLAR DİZİNİ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Tüm Bölge İzolatlarındaki Civa Dirençlilik Yüzdeleri.....	40
3.2. Tüm Bölge İzolatlarındaki Bakır Dirençlilik Yüzdeleri	40
3.3. Tüm Bölge İzolatlarındaki Kurşun Dirençlilik Yüzdeleri.....	41
3.4. Tüm Bölge İzolatlarındaki Nikel Dirençlilik Yüzdeleri	42
3.5. Tüm Bölge İzolatlarındaki Çinko Dirençlilik Yüzdeleri.....	42
3.6. Tüm Bölge İzolatlarındaki Kadmiyum Dirençlilik Yüzdeleri	43
3.7. Tüm Bölge İzolatlarındaki Mangan Dirençlilik Yüzdeleri	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Endospor oluşturan Basiller'in İzolasyon yerleri ve izolat kodları	30
3.2. <i>B. subtilis</i> NRRL B209 'un Ağır Metal Dirençlilik Düzeyi.....	31
3.3. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri	32
3.4. Toprakтан izole elden Basillerin ağır metal toleranslılıklarının % 'lik dağılımı.....	44
3.5. Basillus suşlarının test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6mm)	46
3.6. Basillus izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları	50
3.7. Seçilen 4 izolatın biyokimyasal özellikleri ve VITEK sistemi ile identifikasyonu.....	51

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
μm	Mikrometre
mL	Mililitre
μg	Mikrogram
gr	Gram
cm^3	Santimetreküp
nm	Nanometre

1.GİRİŞ

1.1. *Bacillus* Cinsi

Endospor oluşturan *Bacillaceae* familyası gram negatif anaerob bakterilerden (*Desulfotomaculum* cinsi) gram pozitif aerob koklara (*Sporosarcina* cinsi) kadar uzanan ve farklı özellikler gösteren, çeşitli bakteri türleri içermektedir. *Bacillus* ve *Clostridium* bu familyanın temel cinslerini oluşturmaktadır [1].

Bacillus cinsi, gram pozitif olup vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya küt biten basillerdir. Tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülürler. Çubuklar yuvarlak veya köşeli uçlara sahip olabileceği gibi oldukça küçük (0.5-1.2µm) veya nispeten büyük (2.5-10µm) olabilir. Çoğu *Bacillus* türleri peritrik flagellaya sahiptir. *Bacillus* türlerinin hepsi ısıya karşı dayanıklıdır ve aerobik şartlarda spor üretme yeteneğindedirler. Endosporun şekli ve spor taşıyan hücrenin (sporangium) şekli *Bacillus* türlerinin karakteristik bir özelliğidir. *Bacillus* türleri genel olarak nonpatojen olmasına karşın *Bacillus anthracis* türü patojenik bir yeteneğe sahiptir. Genelde aerobiklerdir, fakat bazıları fakültatiftir [1, 2]. *Bacillus* cinsinin fizyolojik özellikleri çok farklılık gösterir genellikle mezofilik cinsler çoğunluğu oluştururken, zorunlu termofilik, psikrofilik, asidofilik ve alkalofilik özelliklere sahip türlerde görülmektedir. Bazı suşları tuza toleranslı iken bazıları tuz için spesifik gereksinimlere sahiptir. Katalaz çoğu tür tarafından oluşturulur. Oksidaz pozitif veya negatiftir [1].

Genellikle 35-37 °C’de ve pH 7 civarında üreme gösterirler. Bütün türler Nutrient agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Spor oluşturdıkları için çevreden alınan örnekler yaklaşık 80 °C’de 10 dakika ısıtılarak uygun besiyerinde geliştirilebilir ve spor oluşumu ile germinasyonu incelenebilir. Basiller karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren, nitrojen kaynağı olarak da amonyum içeren sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler [3, 4].

1.1.1. *Bacillus* hücre morfolojisi ve koloni özellikleri

Bacillus’lar bir ya da daha çok sayıda uzun zincirler oluşturabilirler. Hücreler parasporal cisimcikler veya protein kristalleri içerebilir. Ana hücredeki sporun biçimi ve sporangium’un bulunduğu yer *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik özelliği belirler. Endosporları genellikle silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak şekildedir. Sporlar, sporangium içinde merkezde merkeze

yakın, uca yakın, uçta ya da lateralde olacak şekillerde yer alırlar [5].

Bacillus suşlarının yüzey kolonilerinin ortaya çıkması çevresel faktörlerle yakından ilgilidir [1]. Besiyeri içeriği, inkübasyon sıcaklığı, nem, vs. gibi faktörler yüzey kolonilerinin değişiklik göstermesini sağlar. Sadece küçük koloniler oluşturan suşlar dışında, koloni boyutları, petri kaplarına konan besiyeri miktarı ve besin faktörlerinin konsantrasyonuna kadar, agar plağında oluşan kolonilerin sayısına da büyük ölçüde bağlıdır [1].

Çoğu *Bacillus* türü pigmentsizdir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere rastlanır. *B. mycoides*'in kolonileri ise rizoid şeklindedir ve besiyeri üzerine yayılırlar [1]. Tek bir plakta saf kültür kolonileri bazen yarı saydamlık çok ya da az beyazımsı veya krem renklidir. Bu, kolonilerdeki sporulasyonun farklı derecelerine bağlıdır. Smith ve arkadaşlarına göre *B. firmus* (pembe), *B. licheniformis* (kahverengimsi kırmızı), *B. pumilus* (açık sarı), *B. pulvifaciens* (soluk sarıdan kırmızıya, turuncu), *B. sphaericus* (pembe) ve *B. subtilis* (pembe, sarı, turuncu, kahve)'te bazı pigmentli varyantlar gözlenmiştir. *B. subtilis sub. sp. atterimus* yalnızca kullanılabilir karbonhidrat varlığında mavi-siyah bir pigment oluşturur, seri transferler sonucu özellik kaybedilebilir [2].

Birçok *Bacillus* türü levan ve dekstran karbonhidrat kapsüllerini üretir. Örneğin *B. circulans* bir glukoz ve glukuronik asit ekstrasellüler polimeri oluşturur. Bu yapıların üretilmesi ve kimyasal yapıları, taksonomilerinin belirlenmesinde herhangi bir öneme sahip değildir.

1.1.2. Hücre çeperi ve zarı

Bacillus genusu suşlarında baskın olan murein tipi düz bağlanmış mezodiaminopimelik asittir (mezo-DAP) bununla birlikte 34 bilinen türün yalnızca 17 tip suşu peptidoglukan bileşimi bakımından çalışılmıştır. *Bacillus*ların hücre çeperi, hücre yüzeyini tamamen örten yüzey katmanı parakristalinden oluşur. *Bacillus* türlerinde hücre çeperindeki peptidoglukana ek olarak büyük miktarlarda anyonik polimer olan teikoikosit veya teikronik asit bulunur. Bu asitlerden hangisinin ortamda bulunacağı magnezyum ve fosfat seviyesine bağlıdır. Eğer ortamda fosfat yoksa teikoik asit yerine teikronik asit sentezlenir.

Hücre zarı yapısında ise uçta metil bağlı 12-17 karbona sahip iso ve antiiso yağ asitleri baskındır. En sık görülen yağ asitleri fosfolipitler, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilgliseroldür [1,6].

1.1.3. Spor yapısı ve oluşumu

Bacillus cinsinin bir özelliği de endospor oluşturmastır. Endosporlar, gama ışınları, UV ışınları, sıcaklık, kuraklık, oksidasyon ajanlarına karşı yapıları gereği canlı kalırlar [7]. Sporun şekli, sporangium içindeki pozisyonu taksonomik olarak önemlidir. İlâveten elektron mikroskobu ile incelendiğinde spor yüzeyinin durumu bazı türlerin özelliği olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte *B. megaterium*'un 10 suşunda 3 yüzey örneği tanımlanmış ve belirli bir taksonomiye yerleştirme için yüzey oluşumunun yeterli bir kaynak olmadığına karar verilmiştir [1].

Sporlar zor boyanırlar ve refraktirdirler. Sporulasyon, besin kaynaklarının (C, N, P) kullanılamaz hale gelmesi ile başlar. Sporulasyon süresinde vejetatif hücre yapılarının çoğu kaybolur. Spor içinde gerekli birçok yeni yapı, enzimler ve metabolitler oluşur. Sporulasyon oluşumunu belirleyen genler aktive olurken, vejetatif hücre fonksiyonunu sağlayanlar inaktive olurlar. Sporulasyon başlangıcında bakteri kromozomu uzun eksen boyunca düz bir çizgide yerleşir ve spor içinde yer alacak bölümü hücrenin bir ucuna doğru yoğunlaşır. Daha sonra sitoplazmik membran çift tabaka oluşturacak şekilde hücre içerisine uzanarak ön spor septumunu oluşturur. Spor içinde kalacak kromozom parçasını tamamen sarar ve bakteriyi asimetrik bir şekilde böler. Peptidoglikan içermeyen bu bölmeye spor bölmesi adı verilir. Spor, spor zarfı ve kor olmak üzere iki bölümden oluşur.

Ön sporu çevreleyen iki katlı membrandan spor zarfı gelişir. Spor hacminin yarısından fazlasını kapsayan spor zarfının içerdiği tabakalar sırasıyla şunlardır: **Germ hücre membranı** (iç membran): spor protoplazmasını (kor) çevirir, yani sporun en içte bulunan bölümüdür. Kromozom ve protoplastı içermekte olup germ hücre membranı ile çevrilmiştir. Büyük miktarda kalsiyum dipikolat içerir. Sporun ısıya direnci suyun azlığına ve kalsiyum dipikolat içermesine bağlıdır. **Korteks**, germ hücre membranının dışında yer alan kalın konsantrik lameller yapıdadır. Korteksin dış yüzeyi zayıf bağlarla bağlanmış peptidoglikan yapısında olup germinasyon sırasında çözülerek vejetatif hücrenin hücre çeperi sentezinde rol oynar. Germinasyon sırasında korteksin germ hücre membranına komşu olan iç yüzeyi, içerdiği güçlü çapraz bağlarla sıvı giriş çıkışına engel olarak spor protoplazmasının ozmotik kararlılığını korur. **Kılıf**; korteksin dışında yer alır ve disülfid bağlarından oluşmuş keratine benzer bir protein yapısındadır. Kılıf geçirgen olmaması sebebi ile sporları kimyasal maddelerin toksik etkilerinden korur. **Ekzospore**; gevşek bir lipoprotein yapısındadır. Bazı sporlarda bulunan ekzospore işlevi henüz anlaşılamamıştır.

Bakteri sporlarının vejetatif forma dönüşme sürecine germinasyon (çimlenme) denir. Bu süreç aktivasyon, başlangıç ve büyüme safhası olmak üzere 3 aşamada tamamlanır. **Aktivasyon safhası**, Bakteri sporları besin maddelerinden zengin ortamlarda çeşitli etkenlerle (asit, ısı, aşınma, serbest sülfid grubu içeren bileşikler) spor kabuğu tahrip olduğunda germinasyonu başlatır. **Başlangıç safhası**; germinasyona başlayan spor ortamında bulunan L-alanin, adenosin gibi aminoasitler spor otolizozimlerini aktive ederler. Otolizozimler peptidoglikan bağlarını bozarak kabuk yıkımını sağlar. Hidrolitik enzimlerle spora ait çeşitli yapılar parçalanır ve vejetatif form için gerekmeyen kalsiyum dipikolinat atılırken hücre içerisine su alınır. **Büyüme safhası**; protoplast ile kalan spor biyosentez periyoduna başlar ve bölünme işlevlerini başlatarak çoğalır [6].

1.1.4. Ekoloji ve habitatlar

Bacillus türlerinin çoğu, mesofilik sıcaklıklarda gelişebilirler. *B. stearothermophilus* gibi zorunlu termofilik türler genellikle 60 °C’de gelişir. *B. coagulans* gibi ılımlı termofiller ise 45- 50 °C’de gelişir. *B. larvae* ve *B. popilliae* gibi daha müşkülpesent böcek patojenlerinin gelişimi için ortama tiamin ilavesi gerekir ve genellikle 25- 30 °C’de gelişir. *B. pasteurii* ilave olarak % 0.5- 1 oranında üreye gereksinim duyarken, *B. stearothermophilus* besiyeri ortamına kalsiyum ve demir ilavesi gerektirir [1].

B. subtilis ve pek çok diğer tür, azot kaynağı olarak amonyak ya da aminoasitleri, karbon kaynağı olarak glukoz ya da diğer basit şekerleri içeren basit tuz ortamında gelişebilirler. *B. subtilis* çok sayıda aminoasiti (arjinin, glutamin, glutamat, asparajin gibi) azot kaynağı olarak kullanabilir. Çoğu *Bacillus* türü kolaylıkla spor oluşturmaya rağmen, etkin sporulasyon için protokoller ve özel ortamlar gereklidir. Sporulasyon logaritmik büyümeden sonra oluşan besin eksikliği (genellikle karbon, azot, ya da fosfat) ile indüklenebilir [8].

Havada kurutmaya, diğer stres koşullarına karşı endosporların dayanıklı olmalarından ve kötü koşullarda uzun süreli yaşama devam edebilmelerinden dolayı çoğu aerobik spor oluşturmalar her yerde bulunur ve çok çeşitli kaynaklardan izole edilebilirler [1]. Belli habitatlarda çok sayıda *Bacillus* türlerinin var olduklarına dair birçok kayıt vardır. Bununla birlikte, çoğu *Bacillus* izolatu havada kurutulmuş veya ısıtılmış örneklerden orjinlendiği ve metabolik olarak inaktif olan endosporlarından dolayı, habitat yaklaşımı yerinde olmayabilir. Başlıca *Bacillus* türlerinin, öncelikli habitatlarının, zimogen bakteriyal flora olarak düşünüldükleri yer olan toprakta olduğu kabul edilir. Kullanılabilir uygun bir substrat olduğunda, metabolik olarak aktif hale gelirler.

Bacillus türleri bir seri biyopolimeri etkili bir şekilde parçaladığından dolayı, karbon ve azotun biyolojik döngüsünde önemli rol oynadıkları düşünülür. Aeropik spor oluşturunucular topraktan, toz ve diğer yollarla herşeyi kontamine edebilirler. Bunun gibi ikincil habitatlarda, polimerleri ve diğer kimyasal bileşikleri parçalamada önemli bir rol oynayabilirler [1].

Bacillus genusunun aeropik endospor oluşturan türleri neredeyse tüm doğal habitatlardan ve çoğu diğer kaynaklardan izole edilebilir. Tatlı su, kirli deniz suyu, derin deniz sedimentleri, gıdalar, süt, farmosötik, vb. diğer habitatlar, bu organizmayı topraktan, yağışla, tozdan, enfekteli bitki materyalinden ve benzeri yollardan kazanabilmektedir. Bu gibi habitatlar, *Bacillus* türlerinin büyümesi için uygun şartları ve uzun zaman canlı kalabilen sporları koruyabilecek elverişli ortamı sağlar [1].

1.1.5. *Bacillus* türlerinin önemi ve endüstriyel kullanımı

Bacillus türlerinin ısıya, ışına ve dezenfektan maddelere dirençli sporlarının ameliyathanelere, cerrahi malzemelere, kozmetik ürünlere ve yiyeceklere bulaşması büyük sorunlara yol açmaktadır. Ameliyathane malzemelerinin sterilizasyonunun kontrolünde (*B. stearothermophilus* ve *B. subtilis*) basitrasın (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) polimiksin (*B. poyimyxa*), gramisidin (*B. brevis*) gibi antibiyotiklerin üretiminde *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Gramisidin S, tirosidin ve basitrasın gibi siklik peptidler ve iturin, basilomisin ve fengisin gibi lipopeptidler karakteristik sekonder metabolitler olup bu grup tarafından sentez edilir. Bu antibiyotikler fungusları, bakterileri ve insektaları inhibe ederler. *Bacillus* türleri endüstriyel enzimlerin, saf biyokimyasalların, antibiyotiklerin, insektisitlerin ve heterolog proteinlerin üretiminde güvenli bir şekilde kullanılan önemli bir kaynaktır [9, 10, 11, 12].

1.2. *Bacillus* Cinsi Tanı Yöntemleri

Bakterilerin identifikasyonunda morfolojik özelliklerden olan hücre şekli, hücre büyüklüğü, koloni morfolojisi, gram reaksiyonu, hareketlilik, endosporun şekli ve yeri, pigmentasyon özelliklerinden yararlanılır. Mikroorganizmaların fizyolojik ve metabolik özellikleri içerisine mikroorganizma enzimleri ve transport proteinlerinin yapı ve aktiviteleride girer. Bunun yanında, hücre çeperi yapısı, enerji kaynakları, fermentasyon ürünleri, oksijen istekleri, ikincil metabolitler, metabolik inhibitörler ve antibiyotik duyarlılık özellikleride önem taşır.

Norris ve ark. [12], *Bacillus* cinsi tanısında iki morfolojik karakterden bahsetmişlerdir. Bunlar sporangium içindeki parasporal cisimcik ve çubuğun genişliğidir. Bunun yanında katalaz üretimi, Voges-Prokavur reaksiyonu, Voges-Prokavur pH 'sı, anaerobik agarda gelişme, 50-65°C 'de gelişme, % '7'lik NaCl'de gelişme, glikozdan asit ve gaz üretimi, nitratın nitrite redüksiyonu, nişasta hidrolizi ve kazein parçalanması ile türler tanımlanmaya çalışılır [6].

1.2.1. Biyokimyasal özelliklere dayalı tanı (VITEK)

Çevresel ya da ticari açıdan önemli *Basillus* izolatlarının tayini için güvenli metodlar geliştirmek kolay değildir. Geleneksel yöntemler morfolojik özelliklere dayanır ve iki dallı anahtar kullanılır, ancak bu büyük oranda yerini bilgisayara dayalı sistemlere bırakmıştır. Bunlardan bir tanesi de VITEK'dir. VITEK aeropik şartlarda 31 klasik fenotipik testlerden oluşan alternatif bir sistemdir [8].

1.3. Ağır Metaller

1.3.1. Ağır metal tanımı

Ağır metal metalik özellikler gösteren elementlerden oluşan, açık ve tam bir tanımlaması yapılmamış olan grupta bulunan elementlere verilen addır. Fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm³'ten büyük olan ($\rho > 5 \text{ g/cm}^3$) metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmilyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak ve bakteriyel hücreye girebilenler katyon ve oksianyon (As, Cr, U) olarak bulunurlar [13].

1.3.2. Bazı ağır metallerin kullanıldığı endüstri dalları

Ağır metaller ve tuzları çevresel kirleticilerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkilerden dolayı çevreye daha çok yayılmaktadır. Sürekli ve kullanıma bağlı olarak kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı artmaktadır. Ağır metaller özellikle sucul ortamlara hem doğal kaynaklardan hem de evsel ve endüstriyel atıklar aracılığıyla ulaşmaktadır [14, 15,16].

Bugün sanayide 40'dan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir. Ağır metaller tarafından meydana getirilen kirlilik insan sağlığını tehdit eder bir seviyeye ulaşmıştır [16]. Ağır metallerin çevreye yayılımında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik fabrikaları, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Örneğin; kurşun dünya çapında çok fazla işlenip rafine edilen bir elementtir. Rafine edilen kurşunun %40'ı akümülatör yapımında kullanılmaktadır. Kadmiyum, mil yataklarında sürtünmeye karşı, boyacılıkta kurşun ve bakırla alaşım yapımında kullanılmaktadır [17].

Endüstriyel kaynaklı kirlenmeden dolayı veya toprağın jeolojik yapısında bulunan ağır metallerin su kaynaklarına geçişi, topraktaki ağır metallerin çözünerek doğadaki suyun hareketi ile ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla gerçekleşir. Bu özellik bakteriler gibi çok kısa üreme zamanlarına sahip organizmalar üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerin, ağır metallerin ve bazı organik bileşiklerin yaygın üretimi ve kullanımı; çeşitli organik bileşikler parçalayabilme yeteneği ile ağır metallerle karşı direnç içeren belirli genotipler için seçici olarak bakteriyel çevreyi değiştirir [18].

Ağır metaller, metabolik reaksiyonları yavaşlatır ve canlı organizmalar için aşırı derecede zehir etkisi yapar. Dünyada, endüstriyel gelişmeye bağlı olarak zehirli ağır metaller ve boyar maddelerle çevre kirlenmesi artmaktadır. Mikroorganizmaları kullanarak ağır metallerin biyolojik yolla giderilmesi (bioremediation) ve renk giderimi, sadece bilimsel yenilik açısından değil, sanayideki potansiyel uygulanırlığı açısından da son yıllarda büyük ilgi görmeye başlamıştır. Endüstriyel atık sulardan ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılan çökeltme, çamur ayırma, kimyasal oksidasyon, iyon değişimi, ters ozmos, elektro-kimyasal uygulama ve buharlaşma gibi klasik metotlar genelde ekonomik değildir. Bu işlem için mikroorganizmaların kullanılmasıyla, ilk olarak radyoaktif elementlerin sulu ortamdan giderildiği tespit edilmiştir [18].

Ölü veya canlı hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırıldığında, çoğu kez ölü mikroorganizmaların daha yüksek giderme kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Ölü mikroorganizmalarla yapılan giderme işlemine biyosorpsiyon adı verilir. Biyosorpsiyon yöntemi, ağır metal giderimi için en uygun alternatiftir. Biyosorpsiyon; biyolojik materyallerin, sulu çözeltilerdeki atık maddeleri hücre yüzeyi veya içine alarak gidermesidir. Bu biyolojik materyaller; mantarlar, bakteriler ve algler gibi canlılardır [19].

1.3.3. Ağır metaller ve çevre kirliliği

Son yıllarda nüfustaki hızlı artış, enerji ve besin yetersizliği, düzensiz kentleşme, insanların aşırı tüketim isteği ve baş döndürücü hızla gelişen teknolojik ilerlemeler, çevre kirliliği sorunun önemini iyice hissettirir hale getirmiştir. Söz konusu sorunların çözülmesinde önemli rol oynayan teknolojik gelişmeler, insanlığın yararına birçok yeni ve alternatif ürünler sunarken küçümsenmeyecek oranda ve nitel-nicel yönden oldukça farklı atıklar oluşmaktadır.

Bu tür katı ve sıvı atıkların arıtmaları mevcut konvansiyonel arıtım süreçleri ile yeterli düzeyde yapılamamaktadır. Bunu yanında etkili bir arıtım ise, ilgili endüstri kuruluşlarına oldukça pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenle, günümüzde birçok endüstri kuruluşlarının önemli sorunu olan bu tür atıkların arıtımında; ekonomik yönden ucuz, pratik uygulamalar da kolaylık sağlayacak arıtım süreçlerine yönelik geniş bilimsel araştırmalar yapılmaktadır.

Çevre kirliliğini artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan endüstri kuruluşlarının başında atık sularında ağır metal içeren kuruluşlar gelmektedir. İlgili endüstri kuruluşları, süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını içermektedir.

Etkili bir arıtımın yapılmaması durumunda bu tür atıkların göl, nehir, deniz, okyanus gibi alıcı ortamlarda deşarj edilmesi, suda ve toprakta yaşayan ve bu suyu kullanan canlı sistemleri ve çevresi için oldukça toksik olmaktadır. Ayrıca, arıtım sistemlerinde hiçbir zaman parçalanamayan bu tür rekalsitrant maddeler, temel arıtımda etkin olan; özellikle biyolojik arıtım süreçlerinde önemli rolü bulunan mikroorganizmalar (aktif çamur vb.) içinde çok büyük miktarlarda bile toksik etki yaptığı için arıtımın gerçekleşmediği görülmektedir.

Bu metaller içerisinde kurşun, çinko, bakır, kobalt, kadmiyum, krom, nikel, arsenik, civa ve gümüş gibi metal iyonları, kalıcı etkilerinden dolayı canlı sistemleri ve çevre sağlığı yönünden önem taşımakta olup belirli bir sınırı aşınca da son derece toksik etki göstermektedir [20, 21,22].

Metal kirliliği içeren atık suları; başlıca maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum eldesine yönelik süreçler sonucunda), metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom vb.) ve diğer metal kaplama, kurşun, batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomatik endüstrileri oluşturmaktadır [23].

Bu karakterdeki atık suların arıtımında başarı ile kullanılabilen fiziksel-kimyasal yöntemler (presipitasyon, aktif karbon adsorpsiyonu, ters ozmoz, iyon değişimi vb.) bulunmakla birlikte gerek arıtım süreçlerinin zorluklar içermesi, komplike oluşu, gerekse ekonomik açıdan pahalı ve arıtım verimliliğinin düşük olması nedeniyle endüstriyel uygulamalarda arzu edilmektedir [23].

Biyolojik süreçlerde metal arıtımı, özellikle mikrobiyal hücrelerle yapılan metal biyosorpsiyonu etkili ve alternatif bir teknoloji oluşturacak güçtedir. Metallerle biyosorpsiyon sürecinin temelde iki hedefi vardır. Birincisi altın, gümüş ve platin gibi ticari değere sahip paslanmaz metallerin geri kazanımını; ikincisi ise canlı sistemleri ve çevresi için çok küçük derişimlerde bile son derece toksik olan civa, bakır, demir, kurşun, krom, kadmilyum, nikel ve çinko gibi ağır metallerin kirlı su ve topraklardan uzaklaştırılmasıdır [24]. Arıtım sistemlerinde, özellikle biyolojik arıtım süreçlerinde mikroorganizmaların kullanılması arıtımın daha etkili ve verimli yapılmasını da sağlayacaktır.

1.3.4. Ağır metallerin önemi

Elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal olarak rol yaparlar. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, böylece katalitik olarak rol alırlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin, sentezinde pek çok element gereklidir ve element son ürünün vazgeçilmez bileşenidir.

Metallerin indirgenmesini; önemli düşük toksisiteli iz elementler (demir, molibden, mangan), orta önemlilikteki toksik iz elementler (çinko, nikel, bakır, vanadyum, krom, kobalt, tungsten) ve sınırlı faydası olan toksik elementler (gümüş, kadmilyum, civa, kurşun, arsenik, stibium, uranyum) olmak üzere 3 grupta inceleyebiliriz.

Ağır metallerin biyolojik proselere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyon da bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinlerle alınmaları zorunludur. Örneğin, bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [25]. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile yapıyı

etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır [26].

Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metobolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine bağlıdır. Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin; nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunmaktadır. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması derişime bağlı olarak değişir. Örneğin krom başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine ve oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metalin derişimi göz önüne alınmalıdır. Kalsiyum, kobalt, krom, bakır, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi metaller ihtiyaç duyulan besinler olduğu için gereklidir. Bunların dışında kalanların (gümüş, aliminyum, kadminyum, civa, kurşun) herhangi bir biyolojik fonksiyonu bulunmamaktadır.

Hücre için en önemli metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli biyojik reaksiyonların katalizlenmesinde rol alır. Bazıları protein yapısına katılır, bazısı bakteri hücre duvarında yer alarak ozmatik balansın korunmasında görev alır [27, 28]. Demir, bakır ve nikel gibi metaller redoks prosesinde görev alır. Bunun dışında magnezyum ve çinko gibileri çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize eder. Demir, magnezyum, nikel ve kobalt çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. Sodyum ve potasyum, intrasellüler ozmotik basıncın düzenlenmesinde görev alır [13].

Metallerin yüksek derişimleri mikroorganizmalar ve diğer organizmalara toksik etki yapar. Toksisite gerekli metallerin kendi doğal bağlanma yerlerinin değiştirilmesi sonucu gerçekleştirilir. Gerekli olmayan metaller tiol taşıyan gruplara ve oksijen bulunan bölgelere, gerekli olan metaller yerine yüksek bir affinite ile bağlanırlar. Nükleik asitlerin ve proteinlerin konformasyonlarının bozulması sonucu hücrede toksisite görülür [27].

1.3.5. Ağır metallerin hücre içine alınımı

Katyonların çoğu benzer büyüklükte olduğu için hücreler genelde alım boyunca, fizyolojik istekleri ile toksik metaller arasında ayırım yapmazlar. Metal katyonların çoğu, hücre membranlarından içeriye özgül olmayan ve hızlı kemoosmatik alım sistemleri veya magnezyum alım sistemleri aracılığı ile taşınır. Bunlar spesifik olmayan taşıyıcılarla olur. Bir toksik metalin

ekstrasellüler konsantrasyonu yüksek olduğundan dolayı o metal yüksek konsantrasyonlarda biriktirilebilir. Bunun nedeni ağır metalin toksisitesindendir [29, 30, 31,32].

Ağır metallerin biyolojik moleküllerle alımı bazı aşamalar içermektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar ağır metallerin metal bağlama verimliliğinin ilk aşama da çok hızlı bir şekilde cereyan etmekte olduğunu ve bu olayda metal iyonlarının hücre duvarlarına temas eder etmez hemen yüzey adsorpsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Yüzey adsorpsiyonun fiziko-kimyasal bir olay olduğu, birçok biyolojik moleküllerin; örneğin hücre duvarı bileşenleri olan polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipidlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile gerçekleştiği belirtilmiştir [22, 33]. Bu fonksiyonel gruplar amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve thiol grupları olup metalleri bağlama özellikleri farklı affinite ve özgüllüğe sahiptir [22]. Her iki özellik yardımıyla hücre yüzeyine bağlı olan metal türlerinin tayini yapılabilmektedir.

Yine metallerin hücre yüzeyine alınımının, hücre yüzeyindeki negatif yüklü metal bağlayıcı moleküllere bağlanarak gerçekleştiğini belirten araştırmaların varlığı yukarıdaki yüzey alım mekanizmasının doğruluğunu kanıtlamaktadır. Diğer yandan hücre duvarı içeriği olan proteinler, metalleri bağlamak için aktif bölgeler oluşturmakta ve metale karşı affinitelerini artırmaktadır. Yüzey alımında bazı mikroorganizmalar, yüzeylerinde yüksek moleküler ağırlıklı polifosfatlara benzeyen grupları ile metallerle kompleks oluşturarak metali bağlayabilmektedirler [22, 33, 34].

Yüzey alınımını takiben ikinci metal bağlama aşaması gerçekleştirmektedir. Bu aşama yavaş cereyan etmekte ve metaller hücre membranının transport özelliğine bağlı olarak sitoplazmaya geçmektedirler. Sitoplazmadaki metaller ise çözünmez formda (mikrodepositler) şeklinde tutulmaktadır. Bu bağlanma sürecinde de polisakkaritlerin önemli rolü vardır. Neticede metaller; inter ve intrafibriller, parakristalin bölgeler, proteinler, RNA ve polifosfatlar, vakuoller gibi formlarda ve hücre yapılarında alınımına uğramaktadır. Genelde hücre duvarlarına metal bağlanması hızlı ve yüksek verimlilik gösterirken hücrenin sitoplazmasındaki bölgelerde çok yavaş ve düşük verimliliktedir [33, 35].

Metallerin alımın sürecinde birçok mikroorganizmanın metal bağlayıcı proteinler sentezledikleri rapor edilmektedir [36, 37]. Bu sentezin, ağır metallerin detoksifikasyon mekanizması gereği yapıldığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalar metal derişimlerinin artışına paralel olarak metal bağlayıcı proteinlerin arttığını göstermektedir. Metallerin her iki tip alınımında bu özgül düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin önemi büyüktür. Özellikle sisteince zengin, metal bağlayıcı

özelliğe sahip bu moleküler ağırlıklı proteinlere metallothioneinler (MTs) adı verilmekte ve ağır metallerin detoksifikasyonunda yer almaktadırlar. Böyle proteinlerin çeşitli ökaryotik ve prokaryotik canlılardan izolesi mümkündür [38, 39, 40].

Metallerin sorbsiyon verimliliğinde, ortamda bulunan metal çeşidine ve sayısına, bu metallerin kendine has özelliklerine bağlı olarak sinerjik ve antagonistik etki görülmektedir. Diğer bir deyişle bir metal diğer bir metalin birikim miktarını sinerjik ve ya antagonistik şekilde etkileyebilmektedir. (Örneğin bazı alg türlerinde kadmiyum ve çinkonun antagonistik etkisi ya da metallerin membran transportunda nikel ve bakırın sinerjik etkisi gibi) [41, 42].

1.3.6. Ağır metallerin toksik etki mekanizması

Metal katyonlar aminoasitlerin içinde bulunan –SH gruplarını bağlayarak enzimleri inhibe eder. Bir diğer eğilimde, çeşitli metal katyonların toksisitesinin metasülfit çözünürlüğünün ürünü olduğu sonucudur. Katyonik metal, fizyolojik iyonlarla etkileşime girerek toksisiteye etki yapabilir. Cd^{+2} - Zn^{+2} veya Ca^{+2} ile Ni^{+2} ve Co^{+2} ise Fe^{+2} ile Zn^{+2} de Mg^{+2} ile inhibisyona girerek uygun fizyolojik katyonun fonksiyonunu durdurabilir. Oksianyonlar, krom ve arsenat, sülfat ve fosfat ile etkileşime girebilir [29, 30, 31, 32].

1.3.7. Mikrobiyal ağır metal dirençlilik mekanizmaları

Esansiyal ve esansiyal olmayan metallerin, çevredeki konsantrasyonlarının, toksik seviyeye ulaşması durumunda insan ve hayvan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir. Aynı zamanda birçok mikroorganizmanın çeşitli metallerin varlığında gelişimlerini devam ettirebildikleri de bilinmektedir [43, 44]. Yapılan araştırmalarda bazı metallere dirençli mikroorganizmalar teşhis edilmiştir. Bu çalışmalar, çoğunlukla, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus sp.* gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-negatif ve Gram-pozitif aerobik bakterileri içermektedir. Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerine yarattığı strestir [45]. Bu direnç mekanizmalarının çoğunda plazmid kökenlidir.

Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir [46, 47]. Çünkü her iki tip dirençte organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik dirençliliğinden

önce rapor edilmiştir [48]. Mikroorganizmalarda metal dirençlilik mekanizmaları; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışına bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücrel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir [43, 49]. Doğal direnç metaller veya hücre membran bileşenlerinde değişiklikler ile etkileşimi önlemek için, hücrel bileşenlerde mutasyonel formlar alabilirler [50]. Mikroorganizmalar bir veya birkaç direnç mekanizmasının bir kombinasyonuna sahip olabilmektedirler. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün ve ya son ürünün toksisitesine bağlıdır [51]. Normalde bugün bilinenlerden daha fazla direnç mekanizması olduğu savunulmakta fakat bu mekanizmalara sahip mikroorganizmalar henüz izole edilmediğinden ispatlanamadığı ileri sürülmektedir [43]. Ayrıca toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının oluşturulmasında mikroorganizmalarda bulunan plazmid DNA'nın kromozomal DNA'dan daha etkili olduğu belirtilmektedir [49]. Geçirgen bariyer sayesinde, metallerin hücre dışında bırakılması; mikroorganizmanın hücre duvarında, membranında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücrel komponentlerini korumaktadır. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada bakterinin membran kanal proteini olan porinlerinin sayısını azaltmak suretiyle gümüş iyonlarının hücre içine girişinin engellendiğini bildirmiştir [52].

Hücre içine metal konsantrasyonunu düzenlemek için ana yol membran taşıma mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Normal şartlarda, gerekli olan ve olmayan metal iyonlarının her ikisinde bir organizmanın içine spesifik olmayan alım sistemleri aracılığı ile taşınabilir. Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle non- spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu bağlanma, dış membranda yer alan $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-SO_3H$, $-COOH$ ve PO_3H grupları ile metal iyonları arasındaki spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir [53]. Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal iyonlarını biyosorblama yeteneğine sahiptir ve bu sayede bu iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı metale karşı sınırlı bir koruma sağlamaktadır [54]. Ortamda metal iyonları fazla olduğu durumda gerekli olmayan metallerin, hücre içine alınması spesifik iyon akış (efflux) sistemler aracılığı engellenir. Gerekli olan fosfatların alınımı sırasında, zehirli metal olan arsenatın dışarı bırakılması buna bir örnektir. Hücre, normal mekanizmalardan yüz kat daha büyük

bir spesifite ile fosfat alırken, daha spesifik bir sistemin aracılığı ile arsenatı ayırt edebilir. Metal iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir [55].

Yapılan bir çalışmada, koruyucu ekzopolisakkarit tabakası içeren *Arthrobacter viscosus*'un bu tabakaya sahip olmayan *Arthrobacter globiformis* suşuna göre daha fazla Cd(II) bağlayabildiği gösterilmiştir [56]. -40 °C'den -50 °C'ye kadar soğutularak inaktive hale getirilen *Pseudomonas putida*'nın Cd (II), Cu (II), Pb (II) ve Zn (II)'yi bağlayabildiği gösterilmiştir [58].

Tam olarak kanıtlanamamakla birlikte, bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmaya dayandığı sanılmaktadır. Cu (II) dirençliliği operonda yer alan copA, copB, copC ve copD olarak adlandırılan genler tarafından sağlanmaktadır. Bu genlerden, copA ve copB kısmi dirençlilik sağlarken copC ve copD genleri Cu (II)'ya karşı tam dirençlilik sağlamaktadır. copA ve copC proteinleri iç ve dış membran arasında, copB proteinleri ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, dirençliliğin ya periplazmik bağlanmadan veya ekstrasellüler ayırmadan kaynaklandığını desteklemektedir [51].

Metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transportu kullanırlar. Non-esansiyel metaller normal olarak besin taşıma sistemleri ile hücre içine girmektedir. Fakat hızlı bir şekilde hücre dışına taşınmaktadır. ATPaz bağımlı veya ATPaz bağımlı olmayan bu taşıma sistemleri katyon veya anyonlara karşı oldukça spesifiktir [59].

Bir metalin yükünün veya değerliğinin oksidoredüksiyon aracılığı ile değişimi, düzenlenme ve direnç için gereklidir. Bu, hücre dış yüzeyinde elektron taşıma sistemleri ve indirgeyici enzim sistemleri aracılığı ile başanlır. Bakterilerde metal iyonlarının hareketini ayarlamaya ve detoksifiye etmeye izin vermeye yarar. Kromun $[Cr^{+6}]$ indirgenmesi buna bir örnektir. Bakteriler Cr^{+6} 'yi aeropik ve anaeropik şartlar altında, elektron taşıma sistemleri aracılığı ile sitokromlarda tutarak indirgeyebilirler. Bu direnç, plazmid veya kromozomun her ikisinden birinde şifrenlenmekte ve genelde fakültatif anaeroplarda bulunmaktadır.

Kromozomal ve plazmid dayalı temel metal dirençlilik sistemleri arasında bazı farklar vardır. Temel metal dirençlilik sistemleri genelde kromozom kökenlidir ve plazmid sistemlerinden daha komplekstir. Diğer organizmalara hızlı bir şekilde taşındıklarından ve gen üzerinde ki taşıma

yükünü azalttukları için iyon akış mekanizmalarının plazmidler üzerinde taşınmaları çok büyük bir olasılıktır.

Bir hücre, hücrenel bileşenlere hassas korumalı metal direnç sistemini bir denemede geliştirebilir. Metal giriş sınırı veya hücrenel bileşenlerin değişimi hücrelerin metallere duyarlılığını azaltır. Bir mikroorganizmada direncin boyutunu birkaç faktör belirler. Bunlar; metal alımı için bazı mekanizmalar ve tipleri, her bir metalin normal metabolizmada oynadığı rol ve metal direncinin kontrolündeki plazmidler, kromozomlar veya transpozonlar üzerine yerleşmiş genlerin durumudur.

Düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösteren kadminyum nonesansiyel bir metaldir. Cd(II)'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik kadminyum formları oluşmaktadır. Bu nedenle, Cd(II) için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir [57]. K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , AsO_4^{-3} , AsO_2^- , CO^{+2} , Ag^+ ve Pb^{+2} iyonlarının da taşıma sistemleri ile hücreden uzaklaştırıldığı bildirilmektedir [59]. İntrasellüler ayrımında; toksik bazı metaller mikroorganizmalar tarafından üretilen sisteince zengin küçük proteinlere (metalloprotein) bağlanarak, stoplazmada biriktirilmektedir. Bu sayede önemli hücre bileşenleri toksik metalin etkisinden korunmaktadır. Genellikle Cd(II), Cu (II) ve Zn (II) 'ye karşı dirençlilikte bazı mikroorganizmalar bu yolu seçmektedir [59]. Gram- negatif ve Gram-pozitif bakterilerin metal iyonlarını tolere etme yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada *B. thuringiensis* 'in Hg, Cu, Cr ve Cd 'ye *Pseudomonas aeruginosa*'dan daha az dirençli olduğu tespit edilmiştir [60].

1.3.8. Plazmidler ve transpozonlar

Plazmidler ilk kez bakteri hücrelerinde esas DNA molekülünün dışında, stoplazmada çok daha küçük ve sayıları değişken olabilen DNA moleküllerinin varlıklarının ortaya çıkması ile bulunmuştur [61]. Plazmidler genel olarak; bakteri hücrelerinde ve bazı ökaryotik hücrelerde bağımsız olarak var olan ve sirküler DNA molekülü olarak tanımlanmıştır [62].

Plazmidler her zaman bir veya daha fazla sayıda gen taşırlar ve bu genler konak hücre tarafından gösterilen önemli bazı özelliklerden sorumludurlar. Örneğin kloromfenikol ya da ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik konsantrasyonlarında canlı kalma yeteneği, bakterilerin sahip olduğu plazmidler tarafından taşınan antibiyotik dirençlilik genlerine bağlı bir durumdur [62].

Bütün plazmidler replikasyon orjini olarak görev yapan en az bir DNA sekansına sahiptirler. Böylece plazmidler hücre içinde bakteri kromozomundan bağımsız olarak replikasyon yapabilmektedir. Bazı tip plazmidler, bakteri kromozomuna girerek kendini replike etme yeteneğine sahiptirler. Bu tip plazmidlere integratif plazmidler veya epizomlar denir. Böylece DNA molekülleri çok sayıda hücre bölünmeleri boyunca stabil biçimde korunurlar fakat bazı durumlarda bağımsız hale geçebilirler [62].

Plazmidler: konjugatif plazmidler, konjugatif olmayan plazmidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Konjugatif plazmidler, bakteri hücreleri arasında meydana gelen konjugasyon olayı ile karakterize edilirler. Bu tip plazmidler konjugasyon olayı sırasında bir hücreden diğer hücreye geçebilirler. Konjugasyon ve plazmid transferi konjugatif plazmidler üzerinde bulunan transfer ya da *tra* genleri olarak bilinen bir dizi gen tarafından kontrol edilir. Bu genler konjugatif olmayan plazmidlerde bulunmazlar. Ancak konjugatif olmayan bir plazmid bazı koşullarda, eğer her ikisinde aynı hücre içinde bulunuyorsa, konjugatif bir plazmidle birlikte taşınabilir.

Farklı çeşitteki bazı plazmidler, aynı hücre içinde bulunabilirler. Birden fazla farklı konjugatif plazmid tek bir hücre içinde bulunabilir. Aslında *Escherichia coli* hücrelerinin bir defada yedi farklı plazmidi içerdiği bilinmektedir. Farklı plazmidlerin aynı hücre içinde birlikte bulunabilmesi kompatibilite ya da uyuşma olarak ifade edilir. Eğer iki plazmid birbiriyle uyuşmuyorsa (inkompabilite), plazmidlerden biri hızla kaybolur. Bu yüzden farklı plazmid tipleri birlikte bulunup bulunmama özelliklerine göre farklı uyumsuzluk gruplarını (inkompabilite grupları) oluşturmaktadır. Tek bir uyumsuzluk grubundaki plazmidler genellikle çeşitli şekillerde birbiriyle ilişkilidir [62].

Doğal oluşumlu plazmidler için en kullanışlı sınıflandırma, plazmid genleri tarafından kodlanan temel özelliklere dayanmaktadır. Bu tip sınıflandırmaya göre plazmidler 5 grupta toplanır [62]. Bunlar;

a) Fertilitite ya da F plazmidler: Bu plazmidler sadece *tra* genlerini taşırlar ve plazmidlerin konjugal transferini sağlamanın ötesinde herhangi bir özelliği yoktur (*E.coli*'de bulunan F plazmidi gibi).

b) Dirençlilik ya da R plazmidleri: Bu tip plazmidler bulunduğu bakteriye, kloromfenikol, ampisilin ve civa gibi bir ya da daha fazla antibakteriyel ajana karşı dirençlilik kazandırır. R plazmidleri klinik mikrobiyolojide çok önemlidir.

c) Col plazmidleri: Col plazmidleri kolisinler adı verilen ve diğer bakteriler üzerinde öldürücü etki yapan proteinleri kodlamaktadır (Örneğin: *E.coli*'de bulunan Col E1 plazmidi).

d) Parçalayıcı plazmidler: Bu plazmidler toluen ve salisilik asit gibi sıradan olmayan moleküllerin metabolize edilmesi için kullanılır (Örneğin: *Pseudomonas putida*'daki Tol plazmidi).

e) Virülans plazmidler: Bu tip plazmidler bulunduğu bakteriye patojenite kazandırır (Örneğin: *Agrobacterium tumefaciens*'in sahip olduğu Ti plazmidleri dikotiledon bitkilerde tümör oluşumuna neden olmaktadır).

Plazmidler genellikle bakteriler arasında yaygındır, ancak diğer bazı organizmalarda da plazmidler bulunmaktadır. En iyi bilinen ökaryotik plazmid *Saccharomyces cerevisiae* 'nin pek çok suşunda bulunan 2 mikron plazmidleri'dir [62].

Transpozonlar; bir bakteri içinde kromozomla veya plazmidle bağlanmış olarak, kromozom veya plazmid üzerinde aynı zamanda karşılıklı olarak yer değiştirebilen, çeşitli antibiyotiklere ve ilaçlara karşı dirençlilikte önemli fonksiyonları olan özel genler taşıyan, DNA karakterlerinde çift iplikli lineer genetik elementlerdir. Transpozonlar, antibiyotiklere direnç veya toksin üretimiyle ilişkili genler gibi, genetik işaretleri taşıdıklarından kolaylıkla tanımlanabilirler [18].

Antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin çoğunun karşılaştırılması genellikle bir operonda kümelenmiş, birlikte transkripte olabilen, işlevsel olarak bağlantılı birçok genlerle yapılmaktadır. Bunlar normalde metal bağlama, taşıma, çıkartma veya detoksifikasyon fonksiyonlarının belirlenmesinde olduğu gibi çok küçük bir düzenleyici gen içerirler. Karakterize edilmiş civa dirençlilik genlerinin çoğu (genelde mer genleri olarak adlandırılırlar) plazmid kökenlidir. Bununla birlikte, homolog kromozomal genlerin çoğunluğu gram-pozitif olan bazı bakterilerde bulunmuştur. Mer dirençlilik genlerinin birçoğu transpozonlar üzerinde de tespit edilmiştir [18].

Genlerin yapısı, seçici baskılar değiştiği zaman bu özelliklerin gelecekle için değişik anlamlara sahip olabilmektedir. Seçici baskının bulunmadığı durumlarda, önemli hücresel fonksiyonları yapan genlerin değişikliğe uğramış türleri olan dirençlilik özellikleri genomdan kaybolmuş olmazlar. Sadece plazmidler üzerindeki dirençlilik kodlu olan genler daha kolay bir şekilde kaybolabilmektedir [18].

1.4. Antimikrobiyal Maddelerin Önemi

Mantar veya benzeri birçok mikroorganizma tarafından oluşturulan, mikroorganizmalar ve diğer birçok canlının gelişimi üzerine etkisi olan ve hatta bunların ölümüne yol açan doğal veya kimyevi maddelere ‘antibiyotik’ denir [63].

Antimikrobiyal maddeler, çok az yoğunlukta bile mikroorganizma gelişimi üzerinde etkili olan, biyolojik kökenli, ikincil metabolitler olarak adlandırılırlar. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici ‘bakteriyostatik’ veya ‘fungustatik’ olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne neden olan ‘bakterisit’ ve ‘fungisit’ gibi maddelerde olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyaller seçici toksisiteye sahiptirler. Bu yüzden çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zarar verebilir, makroorganizmaya zarar veremezler [64, 65].

Antibiyotiklerin dünyada yaygın kullanımından dolayı, enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki en önemli sorun, antibiyotiklere dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıdır. Yapılan çalışmalarda, eski antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, birçok ikili antibiyotik dirençli mikroorganizma, klinik olarak izole edilmiş ve bunlarla tek yönlü etkili antibiyotiklerin mücadelesinin kolay olmadığı sonucuna varılmıştır [65]. Genelde tek veya birçok antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarına karşı direnç oluşumu; otonom olarak self replikasyonla ya da plazmid olarak adlandırılan ekstra kromozomal DNA yapıları aracılığı ile meydana gelmektedir [66].

Antibiyotiklere karşı gelişen dirençlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir [67].

Günümüzde bilinen 8000 antibiyotiğin kayıtlarda var olduğu belirtilmiş ve buna her yıl yüzlercesinin eklendiği bilinmektedir. Buna rağmen yeni antibiyotiklerin arayış ve keşfinin beklenildiği belirtilmiştir. Bu açıdan bakıldığında *Bacillus* genusu antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir [68].

Bacillus türlerinin biyolojik kontrol ajanı olarak cazip olmasının sebepleri, toprakta bol miktarda bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formlarını oluşturma yetenekleri olarak rapor edilmiştir [69].

1.4.1. Antibiyotik direnç gelişim mekanizmaları

Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik maddelere karşı er ya da geç karşı koyma gücü ile direnç kazanmaktadır. Oluşan bu direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek bir düzeyde, önemli bir sorundur. Günümüzde sadece hastane kökenli değil toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta, sorun ciddi boyutlara ulaşmaktadır [70].

Bir antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde, bu kemoterapotik maddeye yapıcı veya etki tarzı bakımından yakın diğer antibiyotiklere karşı da direnç gelişebilir, bu duruma çapraz direnç denir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise çok ilaca dirençlilik denir [70].

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotip, kalıtsal) direnç olmak üzere iki ana bölümde ele alınabilir [70].

Fenotipik (Doğal) direnç; Genellikle ilaçların etkili olabilmesi için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Bakteri sporları veya dormant haldeki mikrobakteriler gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar ilaçlara fenotipik olarak dirençli görülebilir, ama bunlardan oluşan yeni izolatlar ilaçlara duyarlıdır. Buna benzer şekilde bakterilerin hücre duvarsız L şekilleri hücre duvarı sentezini bozarak etkili olan antibiyotiklerden etkilenmezler. L şekilleri ana şekle dönüp hücre duvarını yeniden kazanınca antibiyotiklere duyarlı hale gelirler [70].

Kalıtsal (Kazanılmış) direnç; Bakteri popülasyonu antibiyotik madde ile ilk temasa geçtiğinde ilaç mikroorganizma üzerinde etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobik maddeye karşı direnç gelişir. Antibiyotiklere karşı oluşan direnç esas bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli izolatlar ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç, kromozom, plazmid ve transpozonlar sayesinde olur.

Kromozomal direnç, kromozomda spontan mutasyon oluşması sonucu ortaya çıkar. Spontan mutasyonlar, bakteri hücresinin metabolik ara ürünleri ile bazı çevresel faktörler sonucu oluşur. Bunun sonucunda bakteri hücresinde yapısal farklılıklar oluşabilir ve hücrelerin ilaca karşı geçirgenliği azalabilir veya hücre içerisinde ilacın hedefinde değişiklik olabilir. Ortamda

antibiyotik bulunduğunda duyarlı organizmalar baskılanacağı için ilaca dirençli olanlar yararına bir seçim oluşur [71].

Plazmidlere bağlı direnç ise, kromozomda bağımsız olarak çoğalan, kromozom dışı genetik elementler olan plazmidler sayesinde olur. Plazmidler antimikrobiklere ve ağır metallere direnç genleri yanında değişik virülans faktörlerini de taşıyabilirler. Klinikte görülen direncin ana sorumlusu plazmide bağlı dirençtir. R-plazmidi denen direnç plazmidleri bir veya daha çok sayıda antibiyotik karşı direnç genleri taşımaktadır. Direnç plazmidleri diğer duyarlı bakterilere transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarıyla geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olur [70].

1.5. Çalışmanın Amacı

Toprak doğal kaynaklarımız içinde canlı hayatı için en önemli olanlarından bir tanesidir ve ağır metal gibi zararlı unsurlarla kirletilmesi canlıların sağlığını ve ekolojik dengeyi olumsuz etkilemektedir.

Çevredeki ağır metallerin toksik etki seviyelerinin varlığı bütün canlılar için olumsuz etki oluşturmaktadır. Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleri ile birlikte biyolojik sistemlerdeki yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine bağlıdır. Ağır metallerin bu zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için kimyasal çöktürme, oksidasyon, redüksiyon ve filtrasyon gibi fizikokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin etkinliği yeterli olmadığı için günümüzde ağır metalleri uzaklaştırmak için mikroorganizmalar kullanılarak yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Öte yandan ağır metallerin toksik etkisine karşı mikroorganizmaların göstermiş olduğu direnç mekanizmaları, antibiyotik dirençliliği ile de bağdaştırılmaktadır.

Bu yüzden çalışmamızda çeşitli bölgelerden elde ettiğimiz toprak örneklerinden aerop endosporlu Basil'lerin izolasyonu yapılmış ve elde edilen bu izolatların çeşitli ağır metallere ve antibiyotiklere olan dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi hedef alınmıştır.

2. MATERYAL-METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Biyolojik metaryaller

2.1.1.1. Bakteri izolatları

Bu çalışmada endospor oluşturan basiller'i izole etmek amacı ile çeşitli toprak örneklerinden 2008- 2010 yıllarında toplanan örnekler kullanılmıştır. Toprak örnekleri steril cam kavonozlar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarımıza getirilen örnekler hemen incelenmeye alınmıştır.

Metal toleranslılık testinde ve antibiyotik dirençlilik testlerinde pozitif kontrol için, *B. subtilis* NRRL B- 209 suşu kullanılmıştır.

2.1.2. Kimyasal metaryaller

2.1.2.1. Ağır metal dirençlilik testinde kullanılan ağır metaller

Toleranslılık testinde kullanılan ağır metallerin tuzları aşağıda verilmiştir.

- 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 2 $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 3 ZnCl_2
- 4 HgCl_2
- 5 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 6 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 7 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

2.1.2.2. Kullanılan antibiyotikler

- 1 Vankomisin (VA 30µg)
- 2 Amfisilin (AMP 10µg)
- 3 Eritromisin (E 30µg)
- 4 Sefotaksim (CTX 30µg)
- 5 Klindamisin (DA 10µg)
- 6 İmipenem (İPM 10µg)
- 7 Rifamisin (RD 30µg)
- 8 Streptomisin (S 25µg)
- 9 Kloromfenikol (C 30µg)
- 10 Tetrasiklin (TE 10µg)

2.1.3. Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Agar (Fluka)

Et ekstrakt	1.0 g
Yeast ekstrakt	2.0 g
Pepton	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Saf su	1000 mL

Endospor oluşturan basillerin izolasyon, metal toleranslılık, antimikrobiyal aktivite testinde ve muhafazasında kullanılmıştır.

Besiyeri 2. Nutrient Broth (Fluka)

Pepton	5.0 g
Et ekstrakt	3.0 g
Saf su	1000 mL

Aerop endospor oluşturan basillerin üretilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Triptik Soy Agar (Fluka)

Kazein pepton	15.0 g
Soya pepton	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Saf su	1000 mL

Aerop endospor oluşturan basillerin identifikasyonunda kullanılmıştır.

2.1.4. Çözeltiler**Çözelti 1. Fizyolojik Tuz Çözeltisi**

NaCl	8.5 g
Saf su	1000mL

Çözelti 2. Mc Farland Standardı

BaCl ₂ (% 1.175, 0.048 M)	0.5 mL
H ₂ SO ₄ (% 1, 0.18 M)	99.5 mL

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometre de 625 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu dalga boyunda absorbans değeri 0.08- 0.10 aralığına denk gelmiştir. Bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir. Standardın bulanıklılığı ile bakteri süspansiyonlarının bulanıklılığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland standardı mL'de 10⁸ bakteri varlığını göstermiştir [72].

Çözelti 3. Lügol Çözeltisi

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g
Saf su	300.0 mL

Bileşenler tartılarak distile suda çözülmüş, iyot ve potasyum iyodür'ün çözülmesi için 24 saat beklenmiştir [73].

Çözelti 4. %96'lık Etanol çözeltisi gram boyamada kullanılmıştır.

Çözelti 5. %30'lık H_2O_2 çözeltisi katalaz testinde kullanılmıştır.

2.1.5. Boyalar

Boya1. Kristal Viyole

Çözelti A

Kristal(Jansiyen) viyole	2.0 g
Etil alkol(% 95)	20.0 mL

Çözelti B

Amonyum oksalat	0.8 g
Saf su	80.0 mL

Çözelti A ve B karıştırılmış ve saf su ile 1: 10 oranında sulandırılmıştır ve filtre kağıdından süzölmüştür [73].

Boya 2. Safranin Boyası

Safranin (% 95 lik etanolde % 2.5'luk çözelti)	10 mL
Saf su	100 mL

Safranin saf su içerisinde iyice çözülmüştür [73].

Boya 3. Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili	5.0 g
Saf su	100.0 mL

Boya saf su içinde çözülmüş ve filtre kağıdın da süzölmüştür [73].

2.2. Metod

2.2.1. Endospor oluşturan Basillerin izolasyonu ve kültürü

10 gram toprak rneği aseptik bir şekilde 90 mL steril distile su ile karıştırılarak homojen duruma getirilmiştir. Homojen hale gelen rnekler 80 °C 'de 15-20 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra ana çözeltiden dilüsyonlar yapılmıştır. Örnekler Nutrient agar besiyeri üzerine 0.1 mL aktararak yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Plaklar aerobik olarak 30 °C 'de 1-2 gün süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda gelişen tek koloniler yatık Nutrient Agar besiyerine aktarılmıştır.

İzolasyon sonunda elde edilen izolatların +4 °C 'de yatık agarda ve -20 °C 'de % 20'lik gliserollü endorff tüplerinde stok oluşturarak muhafazası sağlanmıştır.

2.2.1.1. Gram boyama

Temiz bir lamın ortasına bir öze dolusu su konulmuştur. ze yardımı ile 24 saatlik kültürden bir miktar alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyal film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyal film üste kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Preperat önce kristal viyole ile 1 dakika muameleye bırakılmıştır. Srenin sonunda boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Daha sonra bakteriyal film tabakası üzerine lgol çözeltisi ilave edilerek 1 dakika bekletildikten sonra, suyla yıkanmıştır. 1-2 saniye alkol ile muamele edilen preperatın alkol, suyla uzaklaştırılmıştır. 30 saniye kadar safraninle muamele edildikten sonra boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Kurumaya bırakılan preperat immersiyan yağı damlatılarak immersiyan objektifi yardımıyla incelenmiştir. Kristal viyole boyasını tutup mor renkte gözüken basiller Gram pozitif olarak kaydedilmiştir [74].

2.2.1.2. Katalaz aktivitesi

Temiz bir lamın ortasına bir öze dolusu su konulmuştur. ze yardımı ile 24 saatlik kültürden bir miktar alınıp su damlası ile süspanse edilmiştir. Bunun zerine 1 ze dolusu kültürden alınıp üzerine % 30'luk H₂O₂ ilave edilip karıştırıldığında, hava kabarcıkların çıkışı, testin pozitif olduğunu göstermiştir [75].

2.2.1.3. Endospor boyama

Gram boyaması pozitif çıkan izolatlar yatık Nutrient Agar ortamına ekim yapılmıştır. 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra endospor boyama yapılmıştır. Temiz bir lamın

ortasına küçük bir su damlası bırakılmış ve öze yardımıyla bir miktar 72 saatlik kültürden alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyal film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyal film üstte kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Preparat kaynar su banyosu düzeneği üzerine yerleştirilerek 5 dakika malaşit yeşili ile muamele edilmiştir. Preparat su ile yıkandıktan sonra 30 saniye safranin ile muamele edilmiştir. Su ile tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı yardımıyla immersiyon objektifinde incelenmiştir. Uygulanan işlem sonucu sporlar yeşil renkli, vejetatif hücreler ise pembe renkli olarak görülmüştür [74].

2.2.2. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi

Her bakteri izolatu için yedi farklı ağır metalin ayrı ayrı minimal inhibisyon konsantrasyonları, agar dilusyon metodu ile belirlenmiştir [74, 75]. Cu^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Pb^{+2} ağır metallerinin Nutrient agar içerisine 12,5 µg /mL ‘den 3200 µg /mL ‘e kadar iki katlı seri dilusyonları hazırlanmıştır. Bunun için $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , HgCl_2 , $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ağır metallerinin tuzları kullanılmıştır. Otoklavdan çıkan besiyeri içerisine, hazırlanan ağır metal çözeltileri filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Steril petri kaplarına yaklaşık olarak 15 mL çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ağır metal içeren Nutrient Agar besiyeri dökülmüştür. Hazırlanan besiyerleri 2-3 gün oda sıcaklığında kurutulmuştur. Metal toleranslılığın belirlenmesinde elde edilen basil izolatları Nutrient Broth‘da aktifleştirilmiştir. Aktif bakteri süspansiyonu mL’de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0,5 bulanıklılığına göre ayarlanmıştır. Mc Farland’a göre ayarlanmış test bakterilerinden öze yardımı ile çizgi ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 24-48 saat 37 ‘ inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri olarak kabul edilmiştir. Kontrol olarak *B. subtilis* NRRL B-209 bakterisinin ekimide yapılmıştır. Denenen bakteri izolatları kontrol mikroorganizmanın MİK değerinden daha yüksek bir konsantrasyonda üreme gösteriyorsa, dirençli olarak kabul edilmiştir.

2.2.3. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

Antibakteriyal hassasiyet testi, agar disk difüzyon yöntemi [76] kullanılarak belirlenmiştir. Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde toplam 10 farklı antibiyotik disk kullanılmıştır.

Kullanılan antibiyotikler; Vankomisin (30 µg/disk), Amfisilin (10µg/disk) ,Eritromisin (30 µg/disk), Sefotaksim (30 µg/disk), Klindamisin (10 µg/disk),İmipenem (10 µg/disk), Rifamisin

(30 µg/disk), Streptomisin (25 µg/disk), Kloromfenikol (30 µg/disk) ve Tetrasiklin (10µg/disk) kullanılmıştır. Steril petri kaplarına yaklaşık olarak 25 mL Nutrient Agar besiyerinden dökülmüş ve besiyerlerinin kuruması için 2-3 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen basil izolatları Nutrient Broth'da aktiveleştirilmiştir. Aktif bakteri süspansiyonu mL 'de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0,5 bulanıklılığına göre ayarlanmıştır. Test bakterileri steril eküvyon yardımı ile besiyerinin tüm yüzeyine sürülmüştür. Daha sonra antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. Petriler 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülmüştür.

2.2.4. Çoklu antibiyotik dirençlilik düzeyinin belirlenmesi

Çoklu antibiyotik direnç düzeyi (ÇAD) indeks değerleri (**a/b**; **a**; izolatın dirençli olduğu antibiyotik sayısını, **b**; izolata karşı denenen antibiyotik sayısını temsil etmektedir) her izolat için hesaplanmıştır. Eğer izolat insan ya da hayvan kaynaklı antibiyotiklere yoğun miktarda maruz kalmış ise, o zaman 0,2'den daha yüksek bir ÇAD indeks değeri ortaya çıkmaktadır. Eğer antibiyotik çok nadir kullanılmışsa ya da hiç kullanılmamışsa ÇAD indeks değeri 0,2'den küçük ya da 0,2'ye eşit olarak gözlemlenmektedir [79].

2.2.5. Endospor oluşturan Basillerin identifikasyonu

İdentifikasyonu yapılacak olan izolatlara gram boyama, endospor oluşumu, katalaz testi gibi *Bacillus* cinsi tanımlamasında kullanılan testler Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, esas alınarak yapılmıştır[1].

2.2.5.1. Biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon

İdentifikasyon işlemi, biyokimyasal özellikleri esas alan VITEK sisteme ait *Bacillus* biyokimyasal kartı (Biomeriux VITEK, Hazehvood, MO, USA) ile yapılmıştır. Bu identifikasyonla izolatlara çeşitli biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bu testler, negatif kontrol, galaktoz, amigdalin, sorbitol, oleandomycin, trehaloz, sukroz, arabinoz, inulin, N-asetil D-glukozamin, sodyum asetat, tetrazolyum kırmızısı, ksilol, riboz, amylopektin, arabitol, tagatose, mannitol, maltoz, potasyum thionat, polyamidohygro streptin, glukoz, rafinoz, trehaloz, % 7 NaCl, nalidixic asit, inositol, salisin, platinose, mandelik asit, eskulin olmak üzere 31 adetten oluşmaktadır. İdentifikasyonu yapılacak izolatların saf kültürlerini elde etmek amacıyla Triptik Soy Agar'a ekimleri yapılmıştır. Bu plaklar 30°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Saf kolonilerden 0,5 Mc Farland'a karşılık gelen

yoğunlukta hücre süspansiyonu hazırlanıp VITEK kartlarına inokülasyonu sağlanmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat sonunda optik okuyucu sayesinde alınan sonuçlar VITEK bakteri veri tabanındaki kayıtlara göre değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışmada 22 toprak örneğinden izole edilen 161 adet aerob şartlarda endospor oluşturan *Basillus* izole edilmiş ve bu izolatların ağır metal ve antibiyotik dirençlilik düzeyleri belirlenmiştir. Kurşun ve civa ağır metal dirençlilik düzeyleri esas alınarak 4 bakterinin identifikasyonu yapılmıştır.

3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan toprak örnekleri aralarında tarım arazisi, beton sanayi, su arıtma tesisi, demir çelik, azot, cam ve yağ fabrikası' da olmak üzere toplam 22 farklı yerden alınmıştır. Alınan toprak örneklerinden 161 izolat elde edilmiştir. İzolatların elde edildiği habitatlar esas alınarak yapılan izolat kodlaması ve habitatlar hakkındaki bilgiler Çizelge 3.1 de verilmiştir.

Elde edilen izolatların endospor oluşturan *Basillus* grubuna dahil edilmesi için aerob şartlarda endospor oluşumları değerlendirilmiş ve endospor oluşturan izolatların gram reaksiyonları ve katalaz aktivitesine bakılmıştır. Bütün izolatların mikroskopik inceleme sonucu gram reaksiyonlarının pozitif olduğu ve endospor oluşturdıkları görülmüştür. Gr (+) ve katalaz (+) olan endosporlu 161 izolat elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Endospor oluşturan Basiller'in İzolasyon yerleri ve izolat kodları

Örnek No	Toplandığı yer ve Tarih	İzolat kodu
1	İzmir, Ziraat ve Veterinerlik Araştırma Enstitüsü, 2008 -Eylül	T1,T2,T3,T4,T5,T6,T7,T8,T9,T10,T11
2	Afyon, Tarım Arazisi, 2008-Ekim	T12,T13,T14,T15,T16,T17,T18,T19,T20,T21,T22,T23,T24,T25
3	Afyon, Toprak Mahsülleri, 2008-Ekim	T26,T27,T28,T29,T30,T31,T32,T33,T34
4	Kütahya, Astaş Beton Sanayi, 2008-Aralık	T35,T36,T37,T38
5	Kütahya, Açık Arazi, 2008-Ekim	T39,T40,T41,T42,T43,T44
6	Kütahya, Türkmen Su Arıtma Tesisi, 2009-Kasım	T45,T46,T47
7	Kütahya, Frig Vadisi,2009-Kasım	T48,T49,T50,T51,T52
8	Kütahya Emet 2009-Ekim	T53,T54,T55,T56,T57,T58,T59,T60,T61,T62,T63,T64,T65,T66,T67,T68,T69,T70,T71
9	Konya, Tuz Gölü etrafı, 2009-Kasım	T72,T73,T74,T75
10	Konya, Açık Arazi, 2009-Kasım	T76,T77,T78,T79,T80,T81,T82,T83
11	Kütahya, Emet Açık Arazi, 2009-Ekim	T84,T85,T86,T87,T88,T89,T90,T91,T92,T93,T94,T95,T96,T97,T98,T99,T100,T101,T102,T103
12	Kütahya, Enne Barajı, 2009-Kasım	T104,T105,T106,T107
13	Balıkesir, Erdek, 2009-Mart	T108,T109,T110
14	Sivas, Divriği Demir-Çelik Fabrikası, 2009-Kasım	T111,T112,T113,T114,T115,T116,T117,T118,T119,T120,T121,T122,T123,T124,T125,T126,T127,T128,T129,T130,T131,T132,T133,T134,T135,T136
15	Kütahya, Azot Fabrikası, 2009-Kasım	T137,T138,T139
16	Gaziantep, Sanayi Bölgesi, 2009-Mart	T140,T141,T142,T143,T144
17	Balıkesir, Ayvalık Komili Yağ Fabrikası, 2009-Mayıs	T145
18	Elazığ, Açık Arazi, 2009-Mart	T146,T147
19	Nevşehir, Göreme, Açık Arazi, 2009-Kasım	T148,T149
20	Kütahya, Cam Fabrikası, 2009-Ekim	T150,T151,T152,T153 T154,T155,T156,T157,T158
21	Rize, Hat-Pek Beton Sanayi, 2009-Haziran	T159,T160
22	Rize, İnşaat alanı, 2009-Haziran	T161

3.2. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri

Çalışmamızda 22 farklı bölgeden izole edilen endosporlu bakterilerin ağır metal dirençlilik düzeyleri agar dilüsyon metodu ile tespit edilmiştir. Tüm bölgelerden izole edilen bakterilerin ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde referans suş olarak *B. subtilis* NRRL B-209 suşu kullanılmıştır. *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşunun sahip olduğu minimum inhibisyon katsayı değerleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *B.subtilis* NRRL B-209 'un Ağır Metal Dirençlilik Düzeyi (µg/mL)

Ağır Metal	MİK Değeri
Bakır	25
Kadmiyum	12.5
Çinko	25
Kurşun	12.5
Nikel	12.5
Civa	12.5
Mangan	1600

Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde 7 farklı ağır metal tuzları [Cu^{+2} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Cd^{+2} ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Zn^{+2} (ZnCl_2), Hg^{+2} (HgCl_2), Mn^{+2} ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Ni^{+2} ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve Pb^{+2} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)] kullanılmıştır. İzolatların ağır metal toleranslılık düzeylerinin belirlenmesinde agar dilüsyon metoduna göre gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Çizelgeye bakıldığında kullanılan tüm bu metaller içerisinde civa ağır metaline karşı toleranslılığın az olduğu görülmüştür. Buna karşın izolatların kurşun ve bakır ağır metaline karşı toleranslılıklarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. İzolatların ağır metal toleranslılıklarının MİK değerlerinin genel toplam içerisindeki sayısal dağılımı ise Çizelge 3.4.'de verilmiştir

Çizelge 3.3. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (µg/mL)

İzolat No	Nikel	Bakır	Kadmiyum	Çinko	Kurşun	Mangan	Civa
T1	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	50	1600	≤12.5
T2	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T3	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T4	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	50	1600	≤12.5
T5	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	50	1600	≤12.5
T6	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	50	400	≤12.5
T7	≤12.5	≤12.5	≤12.5	≤12.5	50	400	≤12.5
T8	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T9	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T10	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T11	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T12	≤12.5	25	≤12.5	≤12.5	25	400	≤12.5
T13	≤12.5	25	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T14	≤12.5	25	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T15	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T16	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T17	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T18	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T19	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	25
T20	≤12.5	100	≤12.5	25	25	25	≤12.5
T21	≤12.5	100	≤12.5	25	25	25	≤12.5
T22	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T23	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T24	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T25	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T26	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	400	≤12.5
T27	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T28	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T29	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T30	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T31	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T32	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T33	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T34	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T35	100	1600	≤12.5	25	100	400	≤12.5
T36	100	800	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T37	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T38	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T39	100	1600	≤12.5	50	100	1600	50
T40	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T41	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T42	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T43	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5

Çizelge 3.3. (Devam)

İzolat No	Nikel	Bakır	Kadmiyum	Çinko	Kurşun	Mangan	Civa
T44	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T45	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T46	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T47	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T48	100	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T49	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T50	100	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T51	50	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T52	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T53	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T54	100	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T55	100	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T56	100	1600	25	200	200	1600	≤12.5
T57	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T58	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T59	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T60	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T61	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T62	100	1600	25	100	100	1600	100
T63	100	1600	25	100	200	1600	50
T64	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T65	100	1600	25	100	200	1600	50
T66	100	3200	25	50	100	1600	≤12.5
T67	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T68	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T69	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T70	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T71	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T72	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T73	≤12.5	25	≤12.5	50	25	1600	≤12.5
T74	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T75	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T76	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T77	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T78	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T79	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T80	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T81	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T82	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T83	≤12.5	100	≤12.5	50	≤12.5	1600	≤12.5
T84	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T85	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T86	100	1600	25	200	100	400	≤12.5

Çizelge 3.3. (Devam)

İzolât No	Nikel	Bakır	Kadmiyum	Çinko	Kurşun	Mangan	Civa
T87	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T88	25	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T89	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T90	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T91	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T92	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T93	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T94	25	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T95	100	1600	25	100	100	1600	50
T96	25	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T97	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T98	100	1600	≤12.5	200	100	1600	≤12.5
T99	25	1600	≤12.5	200	100	1600	≤12.5
T100	25	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T101	25	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T102	25	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T103	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T104	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T105	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T106	100	1600	25	200	100	1600	≤12.5
T107	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T108	≤12.5	25	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T109	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T110	≤12.5	1600	25	≤12.5	25	1600	≤12.5
T111	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T112	100	1600	25	100	200	1600	≤12.5
T113	100	1600	25	50	100	1600	50
T114	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T115	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T116	100	1600	25	100	200	1600	≤12.5
T117	100	1600	25	200	50	1600	≤12.5
T118	100	1600	25	100	50	1600	≤12.5
T119	100	1600	≤12.5	100	100	1600	≤12.5
T120	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T121	100	1600	100	25	100	1600	≤12.5
T122	100	1600	25	100	100	1600	≤12.5
T123	100	1600	≤12.5	25	100	1600	≤12.5
T124	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T125	100	3200	25	50	100	1600	≤12.5
T126	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T127	100	1600	≤12.5	100	200	1600	≤12.5
T128	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T129	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5

Çizelge 3.3. (Devam)

İzolat No	Nikel	Bakır	Kadmiyum	Çinko	Kurşun	Mangan	Civa
T130	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T131	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T132	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T133	100	1600	1≤2.5	50	100	1600	≤12.5
T134	100	1600	25	50	100	1600	≤12.5
T135	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T136	100	800	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T137	100	1600	≤12.5	50	100	1600	≤12.5
T138	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T139	≤12.5	≤12.5	≤12.5	50	50	1600	≤12.5
T140	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	≤12.5	1600	≤12.5
T141	≤12.5	≤12.5	≤12.5	25	50	1600	≤12.5
T142	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T143	≤12.5	≤12.5	≤12.5	≤12.5	50	400	≤12.5
T144	≤12.5	≤12.5	≤12.5	25	50	1600	≤12.5
T145	≤12.5	≤12.5	≤12.5	≤12.5	50	400	≤12.5
T146	≤12.5	≤12.5	≤12.5	25	50	400	≤12.5
T147	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T148	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T149	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T150	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T151	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T152	≤12.5	100	≤12.5	25	25	400	≤12.5
T153	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	400	≤12.5
T154	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T155	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T156	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	400	≤12.5
T157	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T158	≤12.5	100	≤12.5	≤12.5	25	1600	≤12.5
T159	≤12.5	100	≤12.5	25	≤12.5	1600	≤12.5
T160	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5
T161	≤12.5	100	≤12.5	25	25	1600	≤12.5

1 nolu (İzmir Ziraat ve Veteriner Araştırma Enstitüsü) örnekten elde edilen 11 izolatın test edilen ağır metallerle karşı gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Elde edilen izolatların nikel, civa, kadmiyum ve mangan ağır metallerine gösterdikleri MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında yüksek değerde olmadığı bulunmuştur. İzolatların bakır ağır metaline karşı gösterdiği direnç T7 izolatı hariç hepsinde MİK 100 µg/mL olarak bulunmuştur. Kurşun ağır metalinin MİK değeri ise 25 ve 50 µg/mL değerlerinde bulunmuştur. Bu bölgede sadece bakır ve kurşun ağır metal sonuçları referansımıza göre yüksek bulunmuştur.

2 nolu (Afyon Tarım arazisi) örnekten 14 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların nikel, kadminyum, çinko ve mangan ağır metale gösterdikleri MİK değerlerinin referans suya göre daha düşük değerde olduğu bulunmuştur. İzolatların bakır ağır metale karşı gösterdikleri toleranslılığa bakıldığında 6 izolatın (T15, T20, T21, T23, T24, T25) MİK değerinin 100 µg/mL olduğu bulunmuştur. Tüm izolatların kurşun ağır metali ele alındığında referans suya göre 2 kat fazla toleranslılık gösterdiği tespit edilmiştir. Civada ise sadece tek bir izolatın (T19) referans suya göre MİK değeri (25 µg/mL) yüksek bulunmuştur.

3 nolu (Afyon Toprak Mahsülleri ofisi) örnekten elde edilen 9 izolatın bakır (100 µg/mL) ve kurşun (25 µg/mL) ağır metale toleranslılığı referans suya göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4 nolu (beton sanayi toprağı) örnekten 4 izolat elde edilmiştir. İzolatların kadminyum, mangan ve civa ağır metallerine karşı gösterdikleri dirençliliğin MİK değerlerine bakıldığında referans suştan yüksek olmadığı belirlenmiştir. İzolatların nikel, bakır ve kurşuna göre MİK değerlerine bakıldığında ise referansa göre yüksek değerde olduğu bulunmuştur. İzolatlardan sadece T35'in çinko ağır metale karşı toleranslılığı referans suş ile aynı MİK değerine sahip olurken diğer izolatların referansa göre MİK değeri yüksek bulunmuştur. İzolatların nikel ve kurşuna karşı gösterdikleri toleranslılık değerinin 100 µg/mL olduğu ve referans suya göre yüksek olduğu görülmüştür.

5 nolu (Kütahya toprağı) örnekten 6 izolat elde edilmiştir. İzolatların hepsinin nikel (100 µg/mL), bakır (1600 µg/mL), çinko (50 ve 100 µg/mL) ve kurşun (100 µg/mL) ağır metallerine karşı MİK değerleri referans suya göre yüksek çıkmıştır. Özellikle bakır'ın MİK değeri referans suya göre çok yüksektir. Elde edilen suşlar arasında sadece T39 'un civaya olan dirençliliği (50 µg/mL) referans suştan yüksek çıkmıştır. Kadminyum ağır metale karşı referans suştan dirençli olan izolatların ise sadece T41 ve T44 olduğu görülmüştür.

6 nolu (su arıtım tesisi) örnekten 3 izolat elde edilmiştir. İzolatların hepsinin nikel (100 µg/mL), bakır (1600 µg/mL), çinko (100 µg/mL) ve kurşun (100 µg/mL) MİK değerleri referans suya göre yüksek çıkmıştır. Kadminyuma karşı sadece T45'in MİK değeri (25 µg/mL) referans suya göre yüksek bulunmuştur.

7 nolu (Frig vadisi) örnekten 5 izolat elde edilmiştir. İzolatların hepsinin nikel, bakır ve kurşuna karşı gösterdikleri MİK değerleri referans suya göre yüksek çıkmıştır. T49, T51 ve T52

izolatlarının nikel, bakır ve kurşun değerleri dışında ayrıca çinko ağır metale karşıda referans suştan daha fazla direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

8 nolu (Kütahya Emet ilçesi) örnekten 19 izolat elde edilmiştir. İzole edilen suşlar'ın bakıra karşı gösterdikleri MİK değerleri referans suştan yüksek çıkmıştır. Özellikle T66 izolatının bakıra karşı gösterdiği MİK değeri 3200 µg/mL değerinde bulunmuştur. Bütün diğer izolatlarla karşılaştırdığımızda en yüksek MİK değerinin T66 suşuna ait olduğu görülmüştür. Nikel ağır metale karşı bütün izolatların MİK 100 µg/mL sonucunu verdiği ve referansa göre daha yüksek bir toleranslılığa sahip oldukları belirlenmiştir. Kurşun ağır metale karşı 3 izolat (T56, T63 ve T65)'in MİK değeri 200 µg/mL bulunurken diğer izolatların MİK değerinin 100 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar çinkoya karşı farklı toleranslılık değerleri göstermiştir. Özellikle T56 ve T70, 200 µg/mL MİK değeri ile diğer izolatlara göre çok yüksek bir toleranslılık göstermiştir. İzolatlardan civaya karşı 3 izolatın referans suşa göre MİK değeri yüksek bulunmuştur. T62 izolatının civaya karşı gösterdiği MİK değeri 100 µg/mL bulunmuştur. Bulunan bu değer test edilen diğer izolatlar arasında civaya karşı gösterilen en yüksek değer olarak tespit edilmiştir. T63 ve T65 izolatlarının ise civaya karşı 50 µg/mL'lik MİK değerine sahip oldukları bulunmuştur. Özellikle T62 ve T65 izolatları hem kurşun hemde civaya karşı MİK değerleri yüksek olduğundan dolayı öne çıkan izolatlar arasında bulunmuştur.

9 nolu (Konya Tuz Gölü çevresindeki toprak) örnekten 4 izolat elde edilmiştir. T72, T74 ve T75 izolatlarının bakır ağır metale karşı gösterdikleri toleranslılığın MİK değerine bakıldığında referansa göre yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle diğer metallerin MİK değerlerinde referans suşa göre yüksek bir değer gözlenmemiştir.

10 nolu (Konya ili toprağı) örnekten 8 izolat elde edilmiştir. T76 suşu hariç tüm izolatlarda bakır ağır metale karşı olan dirençliliğin referans suştan daha fazla olduğu, kurşun ağır metale karşı olan dirençliliğin ise T83 ve T76 suşu hariç 6 izolatta referans suştan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca T83 suşu bakır ağır metale karşı referans suştan daha fazla dirençlilik gösterirken çinko ağır metale karşıda referans suştan daha fazla dirençlilik göstermiştir. Bu bölgeden izole edilen T76 suşu ise hiçbir ağır metale karşı dirençlilik göstermemiştir.

11 nolu (Kütahya-Emet bölgesinde ki bir başka araziden) örnekten 20 izolat elde edilmiştir. Bakır 'ın bütün izolatlarda gösterdiği MİK değeri 1600 µg/mL değerinde bulunmuştur. Kurşun ağır metalinin bütün izolatlarda ki MİK değeri 100 µg/mL olup referans suşa göre yüksek olduğu

belirlenmiştir. Kadmiyum ağır metale karşı T88, T93, T96,T98, T99, T100, T101 ve T102 suşları hariç, diğer tüm suşların gösterdikleri direncin referans suştan fazla olduğu tespit edilmiştir. Çinko ağır metalinde T100 ve T102 suşları haricinde referans suştan daha yüksek bir dirençlilik değeri saptanmıştır. Cıvaya karşı sadece bir izolat T95 MİK 50 µg/mL değeri göstermiştir.

12 nolu (Kütahya ili sınırları içerisinde bulunan Enne Barajı) örnekten 4 izolat elde edilmiştir. Referans suşa göre nikel, bakır, çinko ve kurşun değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca T107 suşu hariç diğer 3 izolatın nikel, bakır, çinko ve kurşun ağır metalleri dışında kadmiyum ağır metale karşıda referans suştan daha dirençli oldukları tespit edilmiştir.

13 nolu (Balıkesir Erdek) örnekten 3 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlardan nikel ağır metale karşı sadece T109 nolu suşun MİK değeri 100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bakır ağır metale karşı sadece T109 ve T110 suşlarının referans suştan daha fazla direnç gösterdikleri tespit edilmiş ve MİK değerlerinin 1600 µg/mL olduğu görülmüştür. T109 suşunun ayrıca kurşun ağır metale karşı da referansa göre yüksek toleranslılık gösterdiği tespit edilmiştir.

14 nolu (Sivas-Divriği Demir Çelik Fabrikası) örnekten 26 izolat elde edilmiştir. Nikel, bakır, kurşun ağır metale karşı bütün izolatların referans suşa göre daha yüksek MİK değerine sahip olduğu saptanmıştır. Bütün izolatların nikel ağır metalindeki MİK değeri 100 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu değerin, referans suşun MİK değerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bakır ağır metalinin MİK değeri bütün izolatlarda 1600 µg/mL değerinde olduğu sadece bir izolatta ise 3200 µg/mL değerinde olduğu tespit edilmiş ve bu MİK değerlerinin referansa göre çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bölgeden elde edilen izolatlar arasında kadmiyuma karşı en yüksek MİK değerini T121 izolatı göstermiş ve MİK değeri 100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu bölgeden elde edilen izolatlar arasında referans suş ele alındığında kurşuna karşı toleranslılıkta yüksek çıkmıştır. Kurşuna karşı en yüksek MİK değeri 200 µg/mL olup 3 izolatta (T112, T116 ve T127) bu MİK değeri görülmüştür. Sadece T113 izolatı cıvaya karşı referans suşa göre yüksek toleranslılık göstermiştir (50µg/mL).

15 nolu (Kütahya Azot Fabrikası)örnekten 3 izolat elde edilmiştir. İzolatların hepsinin kurşun ağır metale karşı referans suştan daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan T139 'un kurşun ağır metali dışında, çinko ağır metale karşı, yine T138 suşunun da kurşun ağır metali dışında bakır ağır metale karşı referans suştan daha dirençli olduğu görülmüştür. T137

suşu ise kurşun ağır metali ile birlikte nikel, bakır ve çinko ağır metallerine karşıda referans suştan daha dirençli çıkmıştır.

16 nolu (Gaziantep sanayi bölgesi) örnekten 5 izolat elde edilmiştir. Bakıra karşı T140 ve T142 izolatları, kurşuna karşı T140 izolatu hariç 4 izolatin referans suşa göre daha yüksek MİK değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

17 nolu (Balıkesir ili Ayvalık ilçesindeki yağ fabrikası)örnekten 1 izolat elde edilmiştir. Bu izolat sadece kurşun ağır metale (50 µg/mL) karşı referans suştan daha fazla dirençlilik göstermiştir.

18 nolu (Elazığ toprağı) örnekten 2 izolat elde edilmiştir. T146 ve T147 suşlarının kurşun ağır metale karşı referans suştan daha fazla dirençli olduğu görülmüştür. Ayrıca T147 suşunun kurşun dışında bakır ağır metale karşıda direnci referans suştan yüksek olarak tespit edilmiştir.

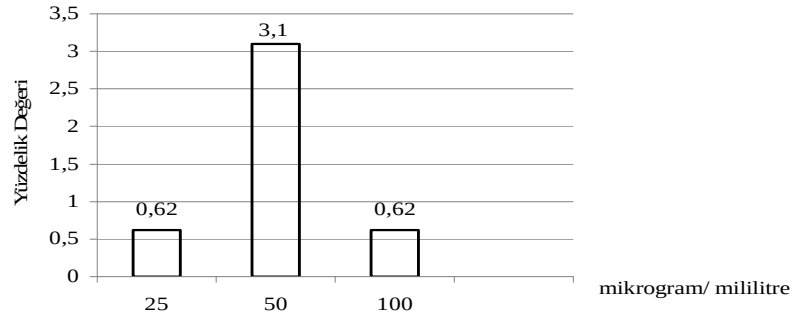
19 nolu (Nevşehir Göreme bölgesinden) örnekten izole edilen T148 ve T149 suşları, bakır ve kurşun ağır metallerine karşı referans suştan daha dirençli çıkmıştır.

20 nolu (Kütahya Cam fabrikasının toprağından) örnekten 9 izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlar bakır ve kurşun ağır metallerine karşı referans suştan daha fazla dirençlilik göstermiştir.

21 nolu (Rize ili Hat-Pek Beton sanayi)örnekten 2 izolat elde edilmiştir. Bakır tüm izolatlarda referans suşa göre dirençli bulunmuştur. Ayrıca T160 'ın bakır dışında kurşun ağır metale karşıda direnci referans suştan yüksek bulunmuştur.

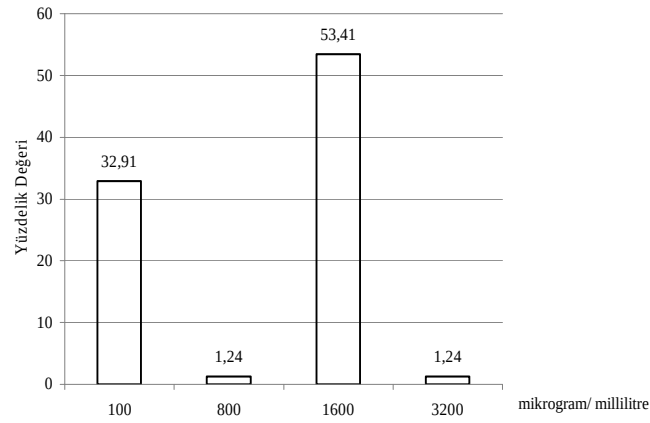
22 nolu (Rize ili inşaat alanı) örnekten 1 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatin bakır ve kurşun ağır metallerine karşı referans suştan daha fazla dirençlilik göstermiştir.

Tüm bölgelerden izole edilen izolatların çalışmada kullanılan metallere karşı gösterdikleri dirençliliklerin %'lik dağılımları ise Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6. ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



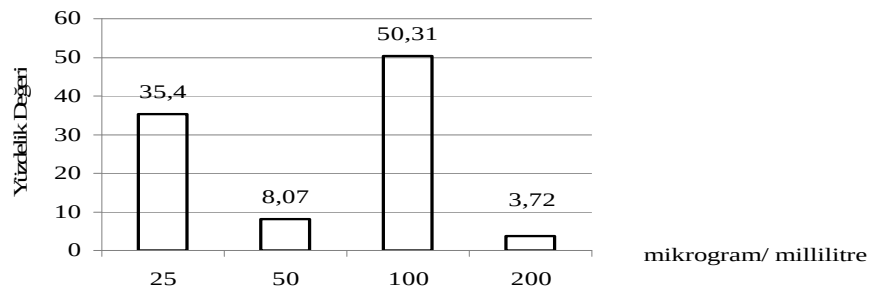
Şekil 3.1. Tüm Bölge İzolatlarındaki Civa Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen izolatların %4,34'ünün referans suşa göre ciya karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın civaya karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 25µg/mL 'ye toplam bakterilerin %0,62'sinin, 50 µg/mL 'ye %3,10'unun ve 100 µg/mL 'ye %0,62'sinin dirençli olduğu sonucuna varılmıştır.



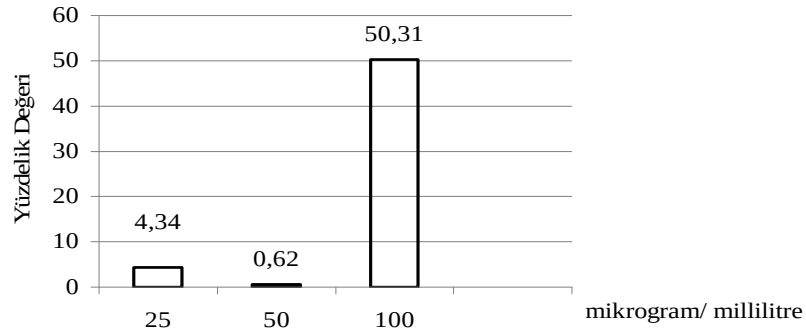
Şekil 3.2. Tüm Bölge İzolatlarındaki Bakır Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın %88,81 'inin referans suşa göre bakır ağır mateline karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın bakıra karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 100 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %39,91'inin, 800 µg/mL 'ye %1,24 'ünün, 1600 µg/mL 'ye %53,41'inin ve 3200 µg/mL 'ye %1,24'ünün dirençli olduğu tespit edilmiştir.



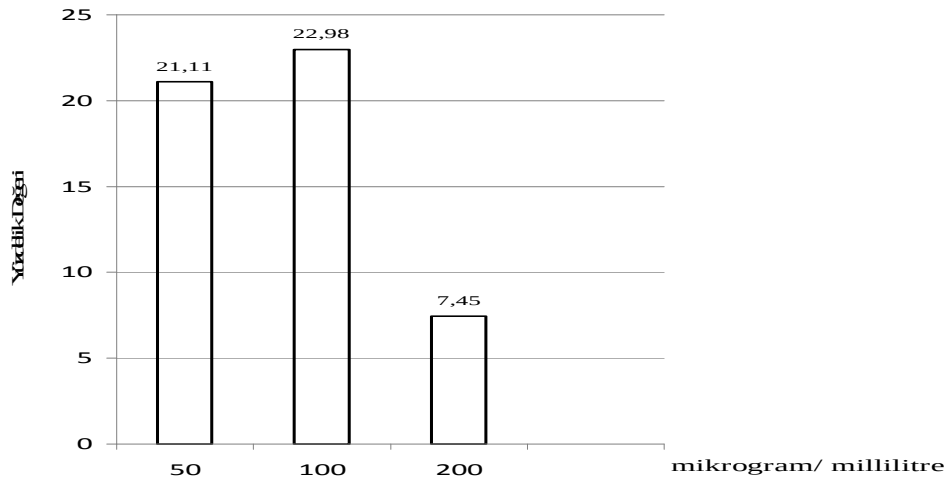
Şekil 3.3. Tüm Bölge İzolatlarındaki Kurşun Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın %97,51'inin referans suşa göre kurşun ağır mateline karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın kurşuna karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 25 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %34,40'ının, 50 µg/mL 'ye %8,07'sinin, 100 µg/mL 'ye %50,31'inin ve 200 µg/mL 'ye %3,72'sinin dirençli olduğu tespit edilmiştir.



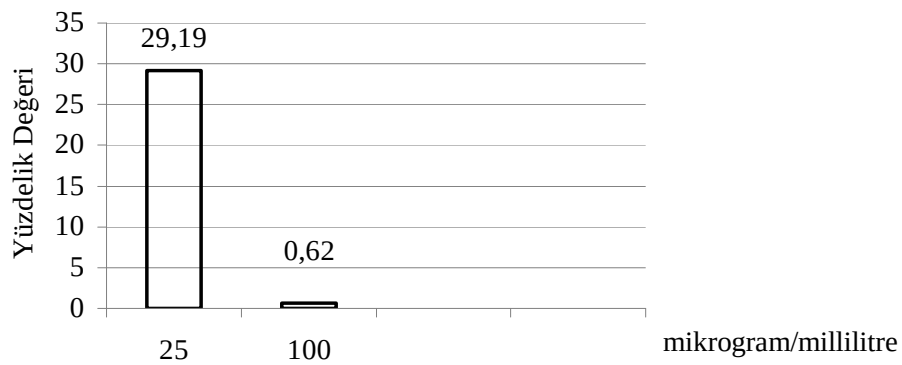
Şekil 3.4. Tüm Bölge İzolatlarındaki Nikel Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın %55,27'sinin referans suşa göre nikel ağır mateline karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın nikel karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 25 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %4,34'ünün, 50 µg/mL 'ye %0,62'sinin ve 100 µg/mL 'ye %50,31'inin dirençli olduğu tespit edilmiştir.



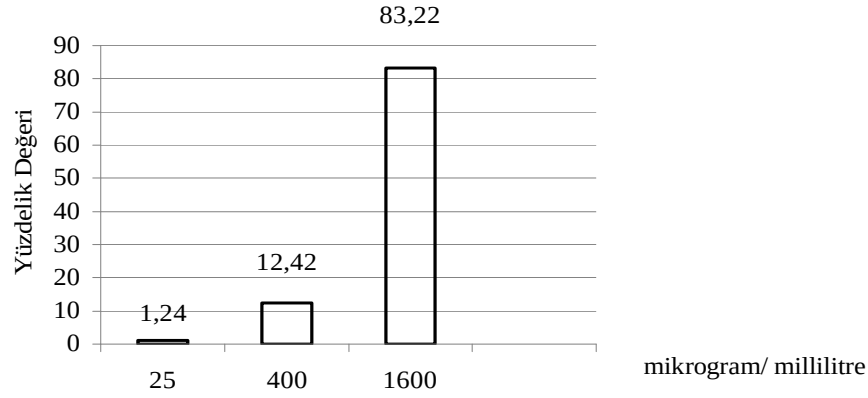
Şekil 3.5. Tüm Bölge İzolatlarındaki Çinko Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın %51,55'inin referans suşa göre çinko ağır mateline karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın çinkoya karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 50 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %21,11'inin, 100 µg/mL 'ye %22,98'inin ve 200 µg/mL 'ye %7,45'inin dirençli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.6. Tüm Bölge İzolatlarındaki Kadmiyum Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın %29,81'inin referans suşa göre kadmiyum ağır mateline karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. 161 izolatın kadmiyuma karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde 25 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %29,19'unun ve 100 µg/mL 'ye toplam bakterilerin %0,62'sinin dirençli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Tüm Bölge İzolatlarındaki Mangane Dirençlilik Yüzdeleri

Tüm bölgelerden izole edilen 161 izolatın mangane karşı gösterdiği dirençlilik düzeyleri incelendiğinde %83,22'sinin 1600 µg/mL 'ye referans suşla aynı dirençliliği gösterdiği, 400 µg/mL 'ye %12,42'sinin ve 25 µg/mL 'ye % 1,24'ünün dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. Toprakten izole elden Basillerin ağır metal toleranslılıklarının % 'lik dağılımı

Ağır metal /toprak	n	Ağır metal konsantrasyonlarına (µg/mL) göre genel toplam içerisindeki izolatların sayısal dağılımı										Dirençli izolatlar
		12.5	25	50	100	200	400	800	1600	3200	n	%
Nikel	161	72	7	1	81	—	—	—	—	—	89	55.27
Kadmium	161	113	47	—	1	—	—	—	—	—	48	29.81
Bakır	161	7	10	—	54	—	—	2	86	2	144	89.44
Çinko	161	26	53	33	37	12	—	—	—	—	82	50.93
Kurşun	161	3	58	13	81	6	—	—	—	—	158	98.13
Mangane	161	—	2	—	—	—	20	—	139	—	0	0.0
Civa	161	155	1	5	1	—	—	—	—	—	7	4.34

Elde edilen izolatların, referans suşa göre ağır metallerinin yüzde toleranslılık değerlerine bakıldığında; %98.13 kurşun, %89.44 bakır, %55.27 nikel, %50.93 çinko, %29.81 kadmiyum ve %4.34 civa ağır metale karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Tüm izolatların mangan ağır metale karşı herhangi bir dirence sahip olmadığı görülmüştür. Bu veriler göz önüne alındığında en yüksek direncin kurşun ve bakır ağır metale karşı, en düşük direncin ise civa karşı olduğu bulunmuştur.

3.3. İzole Edilen Suşların Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri

Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen toplam 161 basilin antibiyotik dirençlilik düzeyleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir. Bunun yanında izole edilen basillerin, antibiyotik sayısı ile bu antibiyotiklere direnç gösteren bakterilerin sayısı Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelgedeki veriler ele alındığında izole edilen bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençlilik düzeyleri incelendiğinde; toplam bakterilerin %47.82'sinin sefotaksim'e, %21.11'nin amfisilin'e, %10.55'inin tetrasiklin'e, %7.45'inin vankomisin'e, %8.07'sinin klindamisin'e, %6.83'ünün rifamisin'e, %4.96'sının streptomisin'e, %3.72'sinin eritromisin'e, %2.48'inin kloronfenikol'e ve %0.62'sinin imipenem'e dirençli olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların denenen antibiyotiklere karşı en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyini sefotaksim antibiyotiğine karşı gösterirken en düşük antibiyotik düzeyini ise imipenem antibiyotiğine karşı gösterdikleri belirlenmiştir.

Ayrıca izole edilen basillerin %14.28'inin bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu görülürken %85.72'sinin ise kullanılan antibiyotiklerin çok nadir kullanılmış olduğu ya da hiç kullanılmamış olduğu belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik dirençlilik düzeylerini ifade eden ÇAD değerleri bakımından izolatlar incelendiğinde 0.2 değerine sahip olanlar T8, T9, T10, T11, T17, T19, T31, T46, T56, T59, T61, T67, T70, T73, T85, T92, T96, T101, T111, T114, T115, T125, T138, T147 ve T148, 0.2 değerinden büyük olanlar ise T20, T21, T22, T23, T24, T40, T44, T47, T54, T63, T65, T68, T71, T72, T74, T81, T90, T98, T99, T100, T102, T110 ve T136 olarak tespit edilmiştir. Bu değer bize izolatın insan ya da hayvan kaynaklı antibiyotiklere yoğun miktarda maruz kalmış olduğunu ortaya koymaktadır

Çizelge 3.5. Bacillus suşlarının test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları
(disk 6mm)

İzolat No	VA	E	C	İPM	RD	DA	CTX	AMP	TE	S
T1	18	23	20	40	25	22	7	28	28	25
T2	30	44	40	46	50	28	50	50	30	23
T3	20	32	30	50	28	30	40	28	30	20
T4	20	30	25	40	30	25	10	35	30	25
T5	20	12	23	46	25	22	25	30	25	25
T6	20	20	23	40	34	20	20	25	20	22
T7	17	30	22	40	24	21	8	32	26	26
T8	18	30	24	40	20	30	11	10	24	26
T9	20	40	20	50	25	15	20	25	40	25
T10	18	25	24	30	16	35	10	10	23	24
T11	15	33	25	20	20	30	7	8	22	25
T12	22	30	30	40	25	30	25	30	25	25
T13	20	26	20	40	25	20	7	30	25	25
T14	19	27	18	45	22	19	12	28	27	22
T15	20	23	19	40	23	28	18	25	17	19
T16	20	25	15	48	25	30	20	20	12	16
T17	18	30	28	30	20	36	10	10	25	25
T18	20	30	20	40	25	27	30	20	28	22
T19	20	10	22	40	20	15	10	22	20	17
T20	13	30	23	20	13	27	7	7	16	30
T21	10	25	20	23	13	30	9	7	7	27
T22	12	26	20	38	13	29	7	7	20	23
T23	26	36	7	50	13	22	32	16	7	30
T24	15	31	15	21	11	30	10	6	20	25
T25	17	30	15	40	18	30	15	20	25	27
T26	21	34	24	44	20	27	17	20	35	32
T27	15	20	28	30	22	28	32	30	20	19
T28	25	32	32	42	24	32	26	32	30	23
T29	21	34	34	42	23	30	32	30	34	24
T30	24	32	40	42	22	18	30	42	36	26
T31	20	7	30	40	20	20	21	7	25	26
T32	42	26	34	42	27	30	32	34	16	10
T33	20	26	16	40	20	22	11	32	28	28
T34	19	20	22	40	25	18	10	30	26	25
T35	20	28	22	42	22	18	7	32	26	26
T36	20	26	23	40	26	19	10	30	26	28
T37	30	28	25	40	24	16	10	30	26	25
T38	20	28	25	38	20	17	8	30	26	25
T39	20	28	18	36	23	21	7	30	26	24
T40	16	23	7	34	11	20	7	30	29	30

Çizelge 3.5.(Devam)

İzolât No	VA	E	C	İPM	RD	DA	CTX	AMP	TE	S
T41	19	32	30	44	22	30	22	30	30	22
T42	20	32	25	40	26	30	25	30	30	28
T43	20	36	30	38	26	28	42	36	34	23
T44	13	30	26	40	18	31	7	7	22	23
T45	17	27	20	38	26	22	8	32	26	24
T46	15	25	25	30	18	27	12	14	25	20
T47	14	32	30	30	20	32	11	13	28	26
T48	22	30	30	50	26	32	30	26	10	20
T49	18	26	22	32	24	22	12	30	30	27
T50	20	26	30	40	24	26	22	25	25	25
T51	20	25	30	45	25	27	25	28	30	20
T52	24	30	30	7	40	30	30	36	12	20
T53	22	23	18	38	23	20	7	28	26	19
T54	16	19	21	34	14	33	11	7	19	20
T55	20	30	28	42	26	20	16	24	8	16
T56	17	21	21	38	20	23	12	8	23	19
T57	18	22	17	36	20	16	7	26	24	19
T58	21	30	32	43	30	26	32	34	17	15
T59	18	16	23	30	18	29	8	7	21	21
T60	21	26	18	33	25	25	9	30	30	18
T61	14	31	22	37	19	27	6	11	20	27
T62	20	29	32	42	30	28	33	30	32	17
T63	10	22	20	44	30	7	7	30	36	22
T64	19	22	22	36	28	19	7	30	28	21
T65	18	15	21	30	10	25	7	7	8	20
T66	20	30	26	38	28	26	22	30	24	18
T67	17	16	22	22	18	23	10	11	22	20
T68	20	10	26	32	20	14	16	26	13	18
T69	19	23	18	36	23	15	7	31	29	20
T70	16	17	26	34	18	27	10	11	20	21
T71	13	26	16	29	15	26	7	7	15	20
T72	8	15	20	33	24	7	7	7	22	20
T73	19	26	20	42	22	14	9	18	28	19
T74	14	32	20	30	12	33	8	7	12	20
T75	20	26	26	42	23	25	23	24	30	19
T76	20	30	30	40	20	25	25	20	18	15
T77	20	34	32	46	21	29	26	23	16	16
T78	23	32	34	44	30	34	42	34	14	22

Çizelge 3.5.(Devam)

İzolât No	VA	E	C	İPM	RD	DA	CTX	AMP	TE	S
T79	20	34	32	50	26	33	20	27	16	21
T80	23	38	32	50	30	30	20	32	16	22
T81	20	-	9	46	20	12	22	13	15	15
T82	20	27	20	45	20	15	20	15	17	17
T83	20	25	19	35	23	17	7	22	22	19
T84	19	24	18	36	21	19	7	27	26	19
T85	15	24	21	46	16	32	12	9	16	26
T86	21	23	19	36	21	17	7	26	24	19
T87	18	25	19	40	24	16	7	27	25	19
T88	20	25	25	40	24	20	10	25	26	20
T89	20	30	30	39	24	26	24	26	31	22
T90	17	16	17	38	20	18	10	7	13	20
T91	18	28	21	42	32	7	34	33	30	22
T92	20	23	20	37	22	20	7	31	24	7
T93	19	16	20	36	28	26	7	32	26	21
T94	18	21	18	33	20	17	7	21	23	19
T95	19	23	20	37	24	20	8	28	25	20
T96	20	23	17	35	22	22	7	26	25	7
T97	17	21	18	30	22	19	7	26	25	20
T98	18	16	25	36	13	22	8	7	9	18
T99	18	18	20	40	15	20	12	12	10	20
T100	19	10	16	50	25	11	22	20	13	20
T101	15	15	15	20	25	10	25	20	10	20
T102	16	16	10	18	28	8	32	10	9	19
T103	22	7	18	48	24	13	25	24	20	17
T104	18	20	18	36	22	21	6	30	25	21
T105	20	20	17	35	20	20	8	25	30	20
T106	20	22	15	37	24	19	7	27	24	17
T107	19	23	22	37	24	23	7	30	29	30
T108	18	30	30	42	22	27	24	30	22	22
T109	15	25	25	35	20	25	25	15	20	20
T110	12	26	20	30	14	30	6	8	20	22
T111	20	25	20	33	19	30	14	14	30	20
T112	20	25	20	35	20	30	22	17	35	20
T113	21	29	26	33	20	30	27	30	33	18
T114	20	24	24	34	20	32	12	8	32	21
T115	20	25	20	35	20	30	15	10	31	20
T116	22	23	20	40	19	25	20	20	30	19
T117	21	26	23	33	15	33	6	32	20	21
T118	24	25	20	35	20	36	25	35	35	17

Çizelge 3.5.(Devam)

İzolât No	VA	E	C	İPM	RD	DA	CTX	AMP	TE	S
T119	25	25	20	40	25	30	26	30	17	22
T120	20	24	22	45	27	35	15	32	28	19
T121	20	26	25	40	30	30	7	30	30	20
T122	21	25	24	40	28	27	6	33	30	21
T123	20	28	26	44	25	30	32	30	16	17
T124	24	35	30	50	24	36	40	32	36	24
T125	26	40	30	60	20	32	10	6	40	30
T126	22	32	24	50	30	33	29	34	24	22
T127	20	22	20	46	22	30	30	30	20	14
T128	20	25	24	40	28	30	30	30	30	15
T129	21	28	27	45	25	30	28	32	20	20
T130	24	30	30	50	25	35	35	30	40	25
T131	26	34	26	50	20	35	30	35	25	30
T132	22	32	30	45	30	32	40	30	30	35
T133	20	25	30	40	20	32	22	30	28	30
T134	19	22	28	40	24	30	20	20	30	25
T135	20	24	26	42	22	33	16	18	29	22
T136	12	20	24	41	26	9	7	11	20	7
T137	20	32	29	40	25	30	10	27	30	20
T138	20	30	27	42	19	12	12	17	25	28
T139	20	29	31	41	25	23	29	24	29	11
T140	16	31	31	43	24	26	25	26	32	16
T141	22	33	26	42	30	30	32	40	30	30
T142	20	35	20	40	30	30	15	40	30	25
T143	23	32	16	44	30	31	12	40	30	21
T144	22	30	17	40	30	30	15	35	30	20
T145	19	35	28	45	25	27	19	30	28	25
T146	20	30	30	40	27	29	12	30	30	25
T147	20	32	29	40	25	30	10	27	6	20
T148	20	30	27	42	19	12	12	17	25	28
T149	20	29	31	41	25	23	29	24	29	11
T150	20	25	35	40	25	25	30	25	30	10
T151	19	30	30	42	25	20	40	28	25	15

3.4. Ağır Metaline Dirençli Olan Basillerin İdentifikasyonu

Toprak örneklerinden izole edilen 161 izolat içerisinde kurşun ve civaya karşı yüksek toleranslılık gösteren izolatlar arasından 4 izolat'ın identifikasyonu yapılmıştır. Özellikle kurşun ve civaya karşı toleranslılığı yüksek olan basillerin identifikasyonu yapılmıştır. Vitek otomatik identifikasyon sistemi ile analiz edilen 4 izolatın analiz sonuçları Çizelge 3.7.'de verilmiştir. T56 *B. pumilis*, T62 izolatı *B. subtilis*, T65 *B. cereus* ve T113 *Paenibacillus. polymyxa* olarak identifiye edilmiştir.

Çizelge 3.7. Seçilen 4 izolatın biyokimyasal özellikleri ve VITEK sistemi ile identifikasyonu

Yapılan testler	T56	T62	T65	T113
1.Negatif Kontrol	-	-	-	-
2.Galaktoz	-	-	-	+
3.Amigdalin	-	+	-	+
4.Sorbitol	-	+	-	+
5.Oleandomycin	-	-	-	-
6.Trehaloz	-	-	-	-
7.Sukroz	+	+	+	+
8.Arabinoz	+	+	-	+
9.Inulin	-	+	-	+
10.N-asetil D-glukozamin	-	+	+	+
11. Sodyum Asetat	+	+	-	-
12. Tetrazolyum Kırmızısı	+	+	-	+
13. Ksilol	-	+	-	+
14. Riboz	+	+	-	+
15. Amylopektin	-	-	-	+
16. Arabitol	-	-	-	-
17. Tagatose	+	-	-	-
18.Mannitol	+	+	-	+
19. Maltoz	-	+	+	+
20. Potasyum thionat	+	+	+	+
21. Polyamidohygro streptin	+	+	+	+
22. Glukoz	+	+	+	+
23. Rafinoz	-	+	-	+
24. Trehaloz	+	+	+	+
25.%7 NaCl	+	+	-	+
26. Nalidixic asit	-	-	-	-
27. Inositol	-	+	-	-
28. Salisin	+	+	-	+
29. Platinose	-	+	-	+
30. Mandelik asit	+	+	+	+
31. Eskulin	+	+	+	+
	<i>B. pumilus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P.polymyxa</i>

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kayaçların, organik atıkların uzun bir süreç içinde birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik olay ve etkenlerle parçalanıp ayrışması sonucu ortaya çıkan doğal bir varlık olan toprak, yerleşme yeri, besin gereksinimi ve yaşam ortamı olarak biyosferin en önemli unsurlarından biridir. Bunun için toprağın dolaylı veya dolaysız olarak kirlenmesi, canlılar açısından son derece önemli sorunları da beraberinde getirmektedir.

Mikroorganizmaların en önemli yaşam alanı toprak olmuştur. Ancak günümüzde endüstriyel ve diğer nedenlerden dolayı özellikle topraklarda, başta ağır metal olmak üzere birçok kirlilik unsurları ile karşı karşıya gelinmiştir.

Civa, kadmiyum, bakır ve nikel gibi metallerin canlılar üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu tür endüstriyel atıkları kimyasal çöktürme, oksidasyon-redüksiyon ve filtrasyon gibi çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür. Fakat bu yöntemler oldukça pahalı ve etkili olmayan yöntemler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle fizikokimyasal yöntemlere alternatif olarak ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla biosorpsiyon (biyolojik bağlama) ve bioakümülyasyon (biyolojik biriktirme) gibi biyolojik metodlar geliştirilmiştir. Bu amaçla, ağır metallerin mikroorganizmalar tarafından absorplanmasına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır [126].

Ağır metaller, çeşitli insan aktivitelerinin bir sonucu olarak çevre ortamlarına yayılmaktadır. Bu yayılmalar sonucunda bulundukları ortamlarda yaşayan birçok organizmanın yaşam döngüsüne yararlı veya zararlı bir etkilerde bulunmaktadır.

Mikroorganizmalar değişen çevre koşullarına en iyi uyum gösteren canlılardır. Birçok bakteriyel türde; Hg^{+2} , Ag^{+} , AsO_2^{-} , AsO_4^{-} , Bi^{+3} , BO_3^{-3} , Cd^{+2} , Co^{+2} , CrO_4^{-2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+3} , Sb^{+2} , TeO_3^{-2} , Tl^{+} , Zn^{+2} ve diğer ağır metallere karşı dirençlilik özelliği tespit edilmiştir. Ağır metalle kirlenmiş ortamlarda, genelde bu ağır metallerin düşük konsantrasyonlarına karşı mikroorganizmalar çok duyarlıdır. Fakat çok hızlı bir şekilde değişen habitat koşullarına uyum sağlarlar [81]. Bu dirençlilik özelliklerinin hepsi genetik etkenlerle kontrol edilmektedir. Bu dirençlilik etkenleri, bu özelliklerin moleküler genetik tekniklerle analizlerini kolaylaştıran plazmidler ve transpozonlar üzerinde bulunmaktadır.

Cervantes ve ark. [128] çevresel ve klinik kökenli bakterilerde toksik ağır metallere dirençlilik bulunduğunu ve direncin genetik etkeninin sıklıkla plazmidler veya transpozonlar üzerinde lokalize olduğunu rapor etmişlerdir. Ağır metallere dirençli mikroorganizmaların esasen metal karışımli toprakta doğal olarak bulunduğu düşünülmektedir.

Toprakta yaşayan mikroorganizmaların bir kısmı toprağın yapısı itibarı ile ya da sonradan endüstriyel atıklar nedeniyle metalle kirletilmiş olabilirler bu nedenden dolayı ortamda bulunan mikroorganizmalar bazı direnç mekanizmaları geliştirerek ağır metal toksisitelerini belirli bir konsantrasyona kadar bertaraf etme yeteneği kazanmışlardır. Bu mekanizmalara bakıldığında mikroorganizmaların biyolojik tepkimelerle bazı metal bileşiklerini daha az toksik hale getirebildikleri, metal iyonlarını solüsyondan uzaklaştıran intraselüler polimerler sentezleyebildikleri, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını tutabilen proteinler bulundurdıkları, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını çözülemez metal kompleksleri halinde çöktürebilen mekanizmalara sahip oldukları ve difüzyon mekanizmasını kullanarak metal bileşiklerini hücre dışına atabildikleri bilinmektedir. Ancak bu tolere etme yeteneği de belirli bir konsantrasyona kadar geçerliliğini sürdürebilmektedir [82].

Mikroorganizmanın tolerans yeteneğini kaybettiği dolayısıyla gelişiminin engellendiği en düşük metal konsantrasyonu “Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu” MİK olarak adlandırılır. Tolerant mikroorganizmaların ekolojik açıdan önemi büyüktür. Çünkü metal kirliliği bulunan ortamlarda ancak metal tolerans yeteneği olan canlılar yaşayabilmektedir. Bu sebepten dolayı bu habitatlarda ekolojik madde döngülerinin devamı organizmanın metal toleranslılık gücüne bağlıdır. Aksi takdirde böyle bölgelerdeki madde döngülerinin durması ile bölgedeki canlılığın azalmasına ve belkide durmasına neden olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, çeşitli habitatlarda yer alan metal tolerant organizmalar, bu ortamlarda yaşamın devamı ve/veya bu ortamların ıslahı için büyük önem arz etmektedir.

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünleyici bir rolü vardır. Kalsiyum, kobalt, bakır, krom, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel, çinko gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Gümüş alüminyum, kadmiyum, altın, civa ve kurşun gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel değildirler. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi, protein yapısının ve bakteri hücre duvar yapısının stabilize edilmesi, osmotik dengenin korunması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, biyomoleküllerin aktive edilmesi gibi elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar [83].

Basillus cinsine ait mikroorganizmaları çeşitli habitatlardan elde etmemiz mümkündür. Yapılan çalışmalarda, *Basillus*ların sucul çevrelerden [84], çöl toprağından [85], deniz alglerinden [86], insektaların çeşitli kısımlarından [87], balıklardan [88], hububatların epifitik dokusu [89] gibi çeşitli yerlerden izole edildiğı bildirilmiştir. Aerobik spor oluşturan *Basillus* cinsinin üyelerinin genellikle çeşitli özellikteki ve derinlikteki toprak örneklerinden ve bunun yanında değişik iklim özelliklerine sahip topraklardan da ağırlıklı olarak izole edildiğı görülmektedir. Roberts ve arkadaşları [91] yaptıkları çalışmada çöl toprağından *Basillus* izole etmişlerdir. *Basillus*ların en fazla bulunduğu ortam toprak olduğundan dolayı çalışmamızda kullandığımız izolatlar topraktan elde edilmiş ve izolasyon için 22 farklı toprak örneğinden toplam 161 izolat elde edilmiştir (Çizelge 3.1). İzole edilen endosporlu *Basillus* izolatlarının ağır metal toleranslılık ve antibiyotik dirençlilik düzeyleri belirlenmiştir.

Basillus cinsinin en belli başlı özelliğı aerobik şartlarda spor oluşturma ve gram pozitif çubuk şekilli mikroorganizmalar olmasıdır. İzolasyon esas olarak bu özellik dikkate alınarak yapılmıştır. Ancak son bilgiler ışığında bu özelliklere sahip *Paenibacillus* gibi yeni cins ayrımları yapılmaktadır [92].

Bacillus ve *Paenibacillus* türleri çok rahat bir şekilde en basit bir besiyerinde bile kolaylıkla gelişebilmektedir [92]. Çalışmamızda topraktan izolasyon yapmak için Nutrient agar besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı morfolojiye sahip olan koloniler seçilmiş ve seçilen bu izolatlara gram boyama, endospor oluşumu ve katalaz testleri uygulanmıştır.

Bu çalışmada *Basillus* izolatlarının 7 ağır metal ve bu metallerin 9 farklı konsantrasyonuna karşı toleranslılıkları belirlenmiştir. Elde edilen izolatların ağır metal toleranslılık düzeylerini belirlemek amacıyla agar dilusyon yöntemi ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) yapılmıştır (Çizelge 3.3.). Özellikle kurşun, civa ve kadmiyum gibi toksisitesi yüksek olan ağır metaller tercih edilmiştir. Bütün izolatların referans suş olarak kullandığımız *B. subtilis* NRRL B-209 ile kıyaslaması yapılmış ve bu suşun ağır metallere gösterdiği MİK değerinden daha yüksek bir MİK değeri gösteren izolatlar dirençli veya toleranslı olarak değerlendirilmiştir. Referans suşun MİK değerinden düşük olanlar ise toleranslı olmayan (dirençsiz) izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Rathnayake ve arkadaşları (2009), *Bacillus* sp. yüksek oranda ağır metal içeren ortamlarda geliştiğini belirtmiştir [93]. Elde edilen izolatlar referans suş ile kıyaslandığında % 98.13'ünün kurşun, % 89.44'ünün bakır, % 55.27'sinin nikel, % 50.93'ünün çinko, % 29.81'inin kadmiyum,

% 4.34'ünün civa metaline karşı dirençli olduğu, mangana olan dirençliliğin ise referans ile aynı olduğu bulunmuştur.

Tarama çalışması sonucunda, çalışılan basil izolatlarının referans suş ile kıyaslandığında kurşun'a karşı önemli bir toleransa sahip olduğu belirlenmiştir. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. 161 izolattan 158 izolatın referans suşa göre kurşuna karşı daha yüksek konsantrasyondaki değerlerde geliştikleri görülmüştür. İzolatların kurşun ağır metaline karşı, referans suşa göre gösterdikleri direnç % 98.13 değerindedir (Çizelge 3.4.). Elde edilen izolatların kurşun'a karşı en yüksek MİK değeri 200 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu MİK değerine sahip 6 izolat belirlenmiştir. Bu izolatlar T56, T63, T65, T112, T116 ve T127 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3). Bu izolatlardan T56, T63 ve T65 Kütahya toprağından izole edilmiştir. Bu bölgede sanayiden kaynaklanan herhangi bir kirlilik olmadığı belirlenmiştir. Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve farklı formlarda ağır metal içerirler [94]. Bu tip topraklara serpentinli topraklar denir. Bu bölgeden elde edilen izolatların ağır metallerle karşı toleranslılıklarının yüksek olmasının, bölgedeki toprak yapısının serpentinli olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kütahya bölgesinde yapılan çalışmada herhangi bir kirlilik etkeni olmamasına rağmen, Enne baraj gölünde bulunan balıklardan alınan örneklerde ağır metal seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun sebebinin ise jeolojik yapının yanında, dünyadaki bor rezervlerinin 2/3'lük gibi büyük bir kısmının Türkiyede bulunması ve bu rezervin büyük kısmında Kütahyada olduğu bildirilmiştir.[95]. Bu durum bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Maden yataklarının jeolojik, mineralojik ve jeokimyasal özelliklerine bağlı olarak içerisinde bulunan mineral ve elementler rüzgar, sular, vb. mekanik etkenlerle çevreye dağılmaktadır. Bu madenlerin işletilmesi ve metallerin üretilmesi esnasında kullanılan fiziksel yöntemler veya metalurjik işlemlerde kullanılan kimyasallar nedeniyle çevresindeki kayaçlar, sular, topraklar ve bitkilerde ağır metal kirlilikleri ortaya çıkmaktadır. Kütahya'nın bazı bölgelerinde gümüş, kurşun, çinko, arsenik ve antimon gibi metalik cevherleşmenin olduğu belirlenmiştir [96]. T112, T116 ve T127 izolatları ise Sivas Divriği Demir Çelik Fabrikası civarından alınan toprak örneğinden izole edilmiştir. Ağır metallerin çevreye yayınımlarında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler arasında demir çelik sanayisinin yer alması, bu bölgeden elde edilen izolatların kurşun'a dirençlilik göstermesinin metal içerikli madde üreten bu fabrikadaki toprakta metal toleranslılığı kazanmış

olabilecekleri ile açıklanabilir. Çalışmada elde edilen izolatların alındığı toprak örneklerinde kurşun'a dirençli izolatların elde edilmesi bu izolatların, elde edildiği bölgeler farklı olsa bile değişen çevre koşullarına uyumu kolaylaştıran plazmitlerin bu metalle karşın ne kadar etkin olduğunun göstergesidir. Çeşitli habitatlardan yapılan birçok çalışmada metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmitler [97] ve konjugatif transpozonlar [98] üzerinde kodlandığını ve yayıldığını göstermektedir.

Kim ve ark. [99] ağır metalle kontamine olmuş topraklardan elde ettikleri *Bacillus spp.* suşları üzerinde ağır metal toleranslılık düzeylerini araştırmışlardır. Biyoremediasyon için yapılan bu çalışmada ağır metallerin tekli ve çoklu çalışımı sonucu elde ettikleri *Bacillus spp.* CPB4 suşunun kurşuna karşı yüksek bir dirençlilik kapasitesi gösterdiğini bulmuşlardır. 8 ayrı metalle yaptıkları çalışmada *Bacillus spp.* CPB4 suşunun metallere karşı göstermiş olduğu dirençlilik düzeyleri Pb>Cd>Cu>Ni>Co>Mn>Cr>Zn şeklinde tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Kim ve arkadaşları ağır metal komplekslerinin % 90'dan fazlasının hücre duvarı ve hücre zarındaki çeşitli kısımlarında adsorplandığını tespit etmişlerdir.

Pek çok çalışmada hücrenin yüzey yapıları tarafından hızlıca metallerin adsorbe edildiği ve fiziko-kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ağır metallerin bağlandığı bulunmuştur. Gram(+) bakterinin hücre duvarında (-) negatif yüklü alanlar temel metal bağlama bölgeleridir. *B.subtilis* ile yapılan çalışmalarda, hücre duvarındaki metal bağlayıcı bölümler tanımlanmıştır ve *Bacillus* genusundaki metal bağlama alanları teikoik asit ve peptidoglukanın fosfat grupları ve karboksilat olarak organik grupların olduğu kabul edilmiştir [100].

Dirençli izolat sayısının en yüksek olduğu ikinci metal ise % 89.44 oranı ile bakır olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatların bakır'a karşı en yüksek MİK değeri 3200 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu MİK değerine sahip olan izolatlar T66 ve T125 olarak belirlenmiştir. T66 izolatı Kütahyanın Emet ilçesinden elde edilmiş diğer izolat ise demir çelik fabrikasından izole edilmiştir. Ağır metallerin çevreye yayınımlarında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Diğer çalışmalardan elde edilen bilgilere göre tarım alanlarından izole edilen mikroorganizmaların bakır dirençliğinin fazla çıkması fungusit olarak kullanılan ilaçların bileşiminde bakır bulunmasından kaynaklanmaktadır [101]. Bizim çalışmamızda da bu doğrultuda sonuç bulunmuştur.

Antonio ve ark. [102] yaptıkları çalışmada *Bacillus* genusu ile kadminyum, çinko, kurşun ve bakır iyonları çalışılmıştır. *Bacillus* izolatları içerisinde *B.cereus* ve *B.subtilis* için en iyi metal alım sonuçları elde edilmiştir. *B. Subtilis* için $Cu > Zn > Kd > Pb$ toleranslılık sonuçlarını elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *Basil* izolatlarının tümü $Pb > Cu > Zn > Kd$ sonucunu vermiştir. Test ettiğimiz basil izolatlarının en zararlı ağır metallerden biri olan kurşun ve bakır'a karşı olan dirençliliklerinin bu çalışma ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Hassen ve ark. [60], *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus thuringiensis* üzerinde ağır metal etkisini çalışmışlardır. Çalışmalarında bakırın *Bacillus thuringiensis* tarafından biyosorpsiyonunun fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Mullen ve ark. [130] yaptıkları bir çalışmada dört bakteri türünün, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^{+2} ve La^{+3} çözeltilerinden bu metalleri bertaraf etme yeteneğini incelemişlerdir. *B.cereus*'ta 1 mM konsantrasyonda en çok metal alınımının bakır ve kadminyumda olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada *B. Subtilis*'te en çok Cu^{+2} biyosorplandığını bildirmişlerdir.

Yılmaz (2003) ağır metalle kirlenmiş bölgeden izole ettiği *Bacillus circulans EB1* suşunun MİK düzeylerine göre ağır metal toleranslılığı 6 farklı metalle araştırmıştır. Elde edilen ağır metal toleranslılık düzeyleri $Mn > Zn > Ni > Cu > Kd = Co$ şeklinde tespit etmiştir [103].

Dirençli izolat sayısının yüksek olduğu üçüncü metal ise % 55.27 oranı ile nikel olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatların referans suş ile kıyaslandığında yarısının dirençli oldukları ortaya çıkmıştır. İzolatların nikel karşı en yüksek MİK değeri 100 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu MİK değerine sahip 81 izolat belirlenmiştir. Bu 81 izolatın büyük çoğunluğu Kütahyadan izole edilmiştir. Dünyada şiddetli tektonik aktivitelere maruz kalmış birçok bölge olduğu gibi Kütahya bölgesinde tektonik aktiviteler ile şekillenmiş bir bölge özelliği taşımaktadır. Serpentin katmanlara sahip yeryüzü şekillerinin olduğu bölgeler nikel, kobalt, ve krom içermeleri ile karakterize edilirler [104]. Yapılan çalışmada Kütahya bölgesinde yetişen bitkilerin yapraklarında metal kirliliğinin olmamasına karşın nikel metalini yaprakta biriktirdiği tespit edilmiştir [104].

Rajkumar (2008) yaptığı çalışmada serpentinli bir topraktan metallere dirençli *B. weihenstephanensis* izolasyonunu gerçekleştirmiş ve bu izolatın nikel, bakır ve çinkoya dirençli olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda bu konuda paralellik göstermektedir [105]

Sabina ve ark. (2004)yaptığı çalışmada *Basillus sp.*'nin hücre içi ve hücre dışı nikel ağır metalini biriktirme kapasitesi araştırılmıştır. Toprakten izole edilen basil izolatı olan *Basillus SJ-101* suşunun hücre içi(% 45,4) ve hücre dışı(% 39,4) nikel birikim kapasitesinin olduğu tespit edilmiştir. Bununda hücre duvarında bulunan peptidoglukan tabakının içerdiği teikoik asit ve teikronik asitler aracılığı ile hücreye alınımının gerçekleştiği açıklanmıştır. Başka bir çalışmada nikel ağır metale karşı *Basillus sp.* suşu tarafından toleranslılık gösterildiği tespit edilmiştir [106].

Dirençli izolat sayısının yüksek olduğu dördüncü metal ise % 50.93 oranı ile çinko olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatların çinkoya karşı en yüksek MİK değeri 200 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu MİK değerine sahip 12 izolat belirlenmiştir. Bu izolatlar T56, T70, T84, T85, T86, T87, T89, T98, T99, T105, T106 ve T117 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Rathnayake ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, ağır metalle kontamine olmamış topraktan *Paenibacillus sp.* ve *B. thuringiensis* izole etmişler ve bu mikroorganizmaların metal toleranslılıklarını çalışmışlardır. İki basilin kadmiyum, bakır ve çinko' ya karşı toleranslılıklarına bakıldığında; Zn>Kd> Cu olarak saptanmıştır [108].

Endüstriyel atık sularla sulanan tarım alanından *Enterobacteriaceae* familyasından ve *Pseudomonas* cinsinden elde edilen izolatların maksimum MİK değerlerine bakıldığında kadmiyum 200 µg/mL, çinko ve bakır 400, nikel için 800 kurşun için 1600 µg/mL bulunmuştur [107].

Dirençli izolat sayısının yüksek olduğu beşinci metal ise % 29.81 oranı ile kadmiyum olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatların kadmiyum'a karşı en yüksek MİK değeri 100 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu MİK değerine sahip olan tek izolatın Sivas Divriği demir çelik fabrikasının toprağından izole edilen T121 kodlu izolat olduğu belirlenmiştir. Kadmiyum düşük konsantrasyonda bile toksik etkiye sahip olan ve bilinene hiçbir biyolojik fonksiyonu olmayan bir ağır metaldir. Kadmiyum için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir [43]. Malik ve arkadaşları (2002) endüstriyel topraklardan izole ettiği bakteriyel strainlerin civa için MİK değerini 100 µg/mL olduğunu ve bakır, kadmiyum, çinko, nikel, kurşun ve krom için MİK değerini 2400 µg/mL olarak bulmuştur [107].

Kadmiyum, bakır ve çinkoya karşı dirençlilikte genellikle mikroorganizmalar sistince zengin bir protein sentezlemekte ve hücre içine giren toksik metallere karşı direnç kazanmaktadır [43].

Çalışmamızda elde edilen izolatlara bakıldığında, kadmiyum ağır metalinden daha çok çinkoya karşı toleranslılık olduğu saptanmıştır. Tüm izolatların çinkoya karşı % 50.93, kadmiyuma karşı ise % 29.81 oranında dirençli olduğu gözlenmiştir. Rathnayake ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Bacillus* izolatlarının kadmiyum ve çinko ağır metallerine karşı buldukları toleranslılık düzeyleri, bizim verilerimizle aynı paralelliği taşımaktadır [93].

Dirençli izolat sayısının en düşük olduğu metal ise % 4.39 oranı ile civa olarak saptanmıştır. Referans suşa göre dirençli olan izolatların MİK değerleri 100 µg/mL olan 1 izolat elde edilirken, MİK değeri 50 µg/mL, 5 izolat elde edilmiştir. En yüksek toleranslılığı gösteren izolat T62 suşu olup, Kütahya bölgesinden izole edilmiştir. Diğer izolatlar ise T39, T63, T65, T95 ve T113 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Bazı bakteriler civa dirençliliği sağlayan ve bir operon (mer operonu) tarafından kodlanan gen setlerine sahiptir. Bu operon sadece civayı detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda civayı hücre dışına taşımakta ve kendi kendini regüle edebilmektedir [62]. Mer operonu, organik civa liyaz ve civa redüktaz olmak üzere iki enzim kodlamaktadır. *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*, civaya karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir [110].

Seralathan ve ark. (2005), antropojenik baskının ağır metal ve antibiyotik dirençli bakterilerle sağlanacağını düşünmüş ve Güney Kore'deki Sunchan Bay bölgesindeki sedimentlerden elde ettikleri *Bacillus* izolatları üzerinde ağır metal toleranslılığı ve antibiyotik dirençliliği çalışmışlardır. Çalışmalarında MİK konsantrasyonuna göre çinko, krom, mangan, magnezyum, kobalt ve civa ağır metalleri ile agar dilisyon metodunu uygulamışlardır. 11 adet ağır metal dirençli bakteri izole etmiş ve bunlardan 4 'ünü *B.subtilis*, *B.cereus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* olarak tespit etmişlerdir. Bu *Bacillus* suşlarından *B. licheniformis*'in plazmit kaynaklı civa'ya karşı dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir ve *Bacillus* genusuna ait bütün suşların ağır metalle kirlenmiş ortamda heterofrotik organizma kolonisinin topluluklarında endominant taxonomik grup olduğu belirlenmiştir [111].

Referans suşa göre ağır metal sonuçları değerlendirildiğinde, tüm izolatların mangan ağır metaline karşı gösterdiği toleranslılık değeri referans suştan daha yüksek bir değerde olmadığı tespit edilmiştir. Referans suşa göre kıyaslandığında herhangi bir toleranslılık gözlemlenmemiştir.

İzolatların mangana karşı en yüksek MİK değeri 1600 µg/mL olarak bulunmuştur. Referans suşun MİK değeri (Çizelge 3.2.) verilmiştir.

Kanan ve Lee, (2008) yaptığı çalışmada sediment toprağından elde ettiği *Bacillus* izolatlarının hepsinin manganeze karşı yüksek toleranslılığa sahip olurken, civaya karşı daha az dirençli olduğu bulunmuştur aynı zamanda bu izolatların ampicilin, tetrasiklin, kanamisin ve streptomisine dirençli olduğunu bulmuşlardır [111].

Rajkumar (2008) yaptığı çalışmada serpentinli bir topraktan izole ettiği *B. weihenstephanensis* izolasyonunun antibiyotiklerden ampicilin, penisilin, kanamisin ve streptomisin 'e dirençli olduğunu bildirilmiştir [105]. Değişen koşullara dirençliliğin sağlanmasında rol alan patojenik özelliklerden sorumlu genler ile antibiyotik dirençlilik genlerinin, ağır metal dirençlilik genleri ile bağlantılı olabileceği açıklanmıştır [81].

Yapılan araştırmada bazı metallere direçli olan mikroorganizmalar arasında, *Staphylococcus* sp. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* sp. gibi önemli dirençlilik gösteren mikroorganizmalar bulunmaktadır. Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerinde yarattığı strestir [45].

Lina ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, *B.sphaericus* suşlarından elde ettikleri canlı biyokütleleri üzerinde ağır metal biyoakümüleyonunu araştırmışlardır. Çalışmada *B.sphaericus* suşlarının canlı biyokütlelerinin arsenik, civa, kobalt, demir ve krom 'a karşı biyosorpsiyon ve biyoakümüleyonu tanımlanmışlardır. İzolatların(canlı hücre biyokütlesinde) % 47 ve % 6 oranında kobalt, civa, demir ve arsenik için en iyi toleranslılığı gösterdikleri belirtilmiştir [112].

Yaptığımız çalışmada basillerin aynı bölgeden izole edilmiş olsalar dahi ağır metal toleranslılıklarının birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında katı ortamlardaki ağır metal direncinin, sucul çevrelerden izole edilen izolatlara göre daha az olduğu bulunmuştur [111].

Çalışmamızda elde ettiğimiz *Basillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri 10 farklı antibiyotiğe karşı agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.5.'de verilmiştir. İzole edilen basilleri en yüksek antibiyotik dirençliğinden en düşüğe doğru sıraladığımızda; % 47.82'si sefotaksim'e, % 21.11'i amfisilin'e, % 10.55'i tetrasiklin'e, 8.07'si klindamisin'e, % 7.45'i

vankomisin'e, % 6.83'ü rifamisim'e, % 4.96'sı streptomisin'e, % 3.72'si eritromisin'e, % 2.48'i kloronfenikol ve % 0.62 'si imipenem'e dirençli olduğu bulunmuştur. Elde edilen izolatların dirençlilik yüzdeleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Sefotaksim antibiyotiği, sefalosporin grubu bir antibiyotik olup, bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder. Imipenem antibiyotiği ise karbapenem grubunda bir antibiyotik olup, bakteri duvarındaki penisilin bağlayan proteinlerden PBP-1 ve PBP-2'ye bağlanarak etkisini gösterir, en geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikleridir. Mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliği kromozomal veya plazmitler aracılığıyla sağlanır ve genel olarak; membran permabilitesinin azaltılması, inaktif hale getirilmesi, antibiyotiğin dışarı atılması ve hücredeki etki yerlerinin değiştirilmesi stratejisi dirençlilik sağlamaktadır [113].

Elde edilen izolatların denenen antibiyotiklere karşı en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyini sefotaksim antibiyotiğine karşı gösterdiği, en düşük antibiyotik düzeyini ise imipenem antibiyotiğine gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen basillerin antibiyotik dirençlilik profillerinin düşük olmasının nedeni ise izolatların elde edildiği ortamlarda antibiyotikle karşılaşma olasılıklarının düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Evsel atıklar, tarım alanları antibiyotik dirençliliği gösteren organizmaların en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bakteriler yeni antibiyotiklere dirençli duruma geldikçe, değişik ortam şartlarına kolayca uyum sağlayabilmektedir bu uyumun meydana gelmesinde plazmit adı verilen ekstrakromozomal DNA yapılarının taşıdıkları dirençlilik bilgisi önemli rol oynamaktadır [114, 115]. İnsan ve hayvanlar, R plazmitlerinin (dirençlilik plazmitlerinin) en önemli rezervuarını oluştururlar [112]. Özellikle gıda hayvanları gerek gıda zinciri aracılığı ile gerekse hayvansal atıklar aracılığı ile direnç genlerinin oluşmasında önemli bir rezervuar kaynağını meydana getirmektedir [57].

Yapılan bir çalışmada *B. stercorarius* ve *B. subtilis* bakterisinde kanamisin ya da tetrasikline dirençli genlerden birini kodlayan plazmit DNA'ları varlığı belirtilmiştir [115]. Yapılan bir başka çalışmada tetrasiklin dirençli *Basillus thuringiensis* suşlarında bu fonksiyonla ilgili plazmit DNA'lar tespit edilmiş, plazmitlerin *B. cereus* ve *B. anthracis* bakterilerine aktarımı sağlanmıştır [116].

Basilluslardan *B. anthracis* ve *B. cereus* dışındaki izolatlar patojeniteye sahip değildir. Dolayısıyla basil grubundaki mikroorganizmalar için yoğun antibiyotik kullanımı söz konusu değildir. Ancak çevrede bulunan antibiyotiklere karşı direnç genleri taşıyan enterik bakteriler

arasında ve özellikle diğer gram pozitif bakterilere plazmit ve transpozonlar aracılığıyla aktarım direncin hızla yayılmasına neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı enterik bakterilerin antibiyotiklere direnç düzeyinin belirlenmesi kadar çevrede bulunan diğer bakterilerinde direnç düzeylerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Yılmaz (2003) yaptığı çalışmada ağır metal içeren topraktan elde ettiği *Bacillus sp.* izolatının ampisilin, sefazolin, sefotaksim, mezlosilin, piperacilin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada *Bacillus sp* izolatının özellikle beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli, aminoglikozid türevi olan gentamisin, amikasin ve tobramisin gibi antibiyotiklere hassas olduğunu tespit etmiştir [103].

Güven ve ark. (2008) yapıla bir çalışmada topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının antibiyotiklere dirençliliklerini ve bu izolatların hücre proteinlerinin analizini çalışmışlardır. Elde edilen *B. cereus* suşlarının kanamisine duyarlı, amfisilin ve sefotaksime dirençli olduğu bulunmuştur [117].

B.cereus'ta tetrasikline dirençli küçük bir plazmitin olduğu rapor edilmiştir [118]. Yine aynı çalışmada topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının amfisiline yüksek direnç gösterdikleri, *B.subtilis* suşlarının da streptomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da identifiye ettiğimiz *B.subtilis* suşumuz (T62) streptomisine orta derecede duyarlılık göstermiştir.

Ombui ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada *B.cereus*'un amfiline dirençli, streptomisine duyarlı, gentamisin'e de % 7 dirençli olduğunu belirtilmiştir [119]. Bizim çalışmamızda da identifiye ettiğimiz *B.cereus* suşumuz (T65) amfisiline dirençli streptomisine duyarlı çıkmıştır. Benzer sonuçları veren bir diğer çalışma ise yine topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin tespiti üzerine yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *B.cereus* suşlarının amfisilin ve sefotaksime dirençli oldukları, izolatların bir kısmının ise basitrisin ve eritromisine de dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir [57].

Aslın ve ark. (2000) yaptığı çalışmada topraktan izole ettikleri *Basillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik düzeyleri araştırılmıştır. Bütün suşların vankomisin'e duyarlı olduğunu, izolatların % 97'sinin ise kloromfenikole ve %93'ünün de tetrasikline duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca elde edilen *Basillus* izolatlarından *B.megaterium* Y6 suşunun gentamisin, kloromfenikol, tetrasiklin ve vankomisine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir [120]. Çalışmamızda elde ettiğimiz *Basillus* izolatlarının %82.60'nın kloromfenikole duyarlılık gösterdiği ve %80.74'nün

tetrasikline duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada yine topraktan izole edilen *Basillus* suşlarından tanımlanan *B.brevis* M6 suşunun test edilen antibiyotiklerden kloromfenikole karşı yüksek direnç gösterdiği, *B.thuringiensis* RSKK 380' suşunun ise vankomisine dirençli olduğu fakat *B. brevis* M6 suşunun vankomisin'e bu izolattan daha fazla dirençlilik gösterdiği belirtilmiştir [121].

Ayrıca isolatlar ÇAD değerleri 0,2'den büyük olanlara bakıldığında T20, T21, T22, T23, T24 isolatlarının tarım arazisinden izolasyonu yapılmış olup ÇAD değerlerinin 0.3, 0.4 ve 0.5 değerinde bulunmuştur ve isolatlardan T22 hariç diğerlerinin bakır metaline ve hepsinin kurşun metaline toleranslı olduğu bulunmuştur. Çizelge 3.4 bakıldığında Kütahya bölgesinden elde edilen T40, T44, T47, T54, T63, T65, T68 ve T71 isolatların hepsinin ÇAD değerinin 0.3 olduğu ve en fazla 6 metale (nikel, bakır, kadminyum, çinko, kurşun ve civa) en az 3 metale (nikel, bakır ve kurşun) karşı toleranslılıklarını gösterdikleri belirlenmiştir. T72, T74 ve T81 isolatları Konya'dan izole edilmiş olup, ÇAD değerleri 0.4 'dür ve hepsinin sadece bakır ve kurşun metale toleranslı olduğu bulunmuştur. T90, T98, T99, T100, T102, T110 isolatları Emet bölgesinden izole edilmiş, ÇAD değerlerinin 0.3 ve 0.4 değerinde olduğu ve 3 (nikel, bakır ve kurşun) ile 5 (nikel, bakır, kadminyum, çinko ve kurşun) metale karşı toleranslı oldukları tespit edilmiştir. T136 demir çelik fabrikasından izole edilmiştir, ÇAD değeri 0.4 ve 4 metale (nikel, bakır, çinko ve kurşun) karşı toleranslılığının olduğu belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalarla ağır metal direnci ile antibiyotik direnci arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir [122]. Bhattacharjee ve arkadaşları(1988) ortamdaki mikroorganizmaların metal stresinin olduğu ortamlarda mutasyon ve seleksiyondan daha fazla, R faktörleri ile hızlıca ortama adapte olduklarını açıklamıştır. Bu nedenden dolayı çeşitli ağır metallere yüksek direnç görülmesine karşın bütün isolatların çoğunlukla test edilen antibiyotiklere duyarlı olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer bir sonuç bulunmuştur. Aynı türün farklı suşları, aynı ağır metale karşı dirençlilik göstermelerine rağmen farklı antibiyotik dirençlilikleri sergileyebilmektedir. Bizim çalışmamızda ağır metal ve antibiyotik arasında bir ilişkiden söz etmek mümkün değildir. Özellikle ÇAD değerine bakıldığında bu değer çok düşük olmasında bize bunu göstermektedir. Genel olarak isolatlarımızın ağır metal ve antibiyotik dirençlilik sonuçlarına baktığımızda, ağır metal dirençliliklerinin yüksek olduğu görülürken, antibiyotik dirençliliklerinin düşük olduğu görülmüştür.

Elde edilen izolatların özellikle çok toksik olan kurşun ve cıvaya karşı gösterdikleri toleranslılık göz önüne alındığında 4 izolat biyokimyasal özelliklerine dayanarak identifiye edilmiştir. Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde VITEK identifikasyon sistemi kullanılmış aynı zamanda bu sisteme ait *Bacillus* veritabanı ile değerlendirilme yapılmıştır. Değerlendirme sonucuna göre T56 izolatı *B. pumilus*, T62 *B. subtilis*, T65 *B. cereus* ve T113 *Paenibacillus polymyxa* olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan 4 izolatın sukroz, potasyum thionat, polyamidohygro streptin, glukoz, trehaloz, mandelik asit ve eskulin sonuçlarının pozitif olduğu görülmektedir (Çizelge 3.4). Otuz testten 7 tanesinin ortak özellik göstermesi izolatlar arası akrabalığı açıkça göstermektedir.

T56, T62 ve T65 izolatı Kütahya'nın Emet ilçesinden izole edilirken, diğer izolat Sivas Divriği demir çelik bölgesinden izole edilmiştir. T113 suşu hariç diğer üç izolat kurşun ağır metale karşı 200 µg/L toleranslılık göstermiştir. T62 cıvaya karşı 100 µg/L, T65 ve T113 izolatları ise 50 µg/L değerinde toleranslılık göstermiştir. Bu izolatların antibiyotik direnç profillerine bakıldığında T56'nın, sefotaksim ve ampiciline dirençli olduğu, T62 ve T113 'ün ise hiçbir antibiyotiğe dirençli olmadığı, T65 izolatının rifamisin, sefotaksim, ampicilin ve tetrasikline karşı dirençli olduğu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada *Paenibacillus* sp.'nin bakır'a karşı yüksek bir duyarlılık gösterdiği, yine başka bir çalışmada *P. polymyxa*'nın bakır'a olan dirençliliği MIK (minimal inhibisyon konsantrasyonu) 3.5 mM olarak belirtilmiştir [108].

Cıva ağır metali kirlenmiş göl sedimentinden *Bacillus* izolasyonu yapılmış ve identifikasyon sonucunda bu izolatların *B. cereus*, *B. pumilis*, *B. lentinorbus* ve *B. sphaericus* olduğu tespit edilmiştir. Bütün izolatların en yüksek toleranslılığı cıvaya daha sonra krom ve nikel e gösterdikleri belirlenmiştir. Cıvaya dirençli bakteriler arasında *B. pumilis* izolatının kloromfenikol, *B. cereus* izolatının ise kloromfenikol, kanamisin ve streptomisine dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen bütün izolatların tetrasikline duyarlı olduğu ortaya çıkarılmıştır [122].

Sonuç olarak, çevredeki ağır metallerin toksik seviyelerinin varlığı bütün canlılar için olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Çeşitli mikroorganizmalar bu metallerin varlığında kromozom, plazmid veya transpozonda kodlanmış metal dirençlilik mekanizmaları aracılığı ile başarılı uyum mekanizmalarına sahiptirler. Günümüzde metal dirençliliği için biyokimyasal ve

biyokimyasal olmayan mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar kullanılarak günümüzün önemli bir çevresel sorunu haline gelen ağır metal kirliliğine çözümler üretilmektedir.

Çevreden doğal bakteri suşlarının izolasyonu, metal kirliliğinin bertarafı amacıyla geliştirilecek olan yeni biyoteknolojik yaklaşımlar için kullanılabilecek mikroorganizmaların sağlanmasını mümkün hale getirmesi bakımından önemlidir. Çeşitli çevrelerden izole edilen doğal bakteri suşlarında yeni genetik özelliklerin (plazmid veya transpozon) ortaya çıkarılması, ağır metalle kontamine olmuş çevrelerde bakteriler tarafından geliştirilen adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılmasında yararlı olacaktır [130]. Ayrıca ağır metale dirençli bakteri suşlarının izole edilerek koleksiyonlarının hazırlanması, kirlilik probleminin olduğu bölgelerde bu doğal suşların kullanılmasıyla etkin biçimde bertaraf edilmesi açısından gereklidir. Bu sebepten dolayı özellikle de bakterilerde bulunan ağır metal dirençlilik mekanizmalarının anlaşılması, biyoremediasyon teknolojileri açısından oldukça önemlidir.

Metal dirençliliğinin genetik temellerinin araştırılması çevresel uygulamalar için önemli bir bilgi birikimidir. Genetik manipulasyon tekniklerindeki gelişmeler, kontamine çevrelerin temizlenmesi için süper akümülatör bakterilerin ve bitkilerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Ancak mikroorganizmaların özellikle de bakterilerin metal dirençlilik mekanizmaları hakkında hala öğrenilmesi gereken pek çok konu bulunmaktadır. Söz konusu noktaların aydınlatılması yeni çevresel remediasyon proseslerinin geliştirilmesi için başlangıç noktaları olacaktır [130].

Genelde yapılan çalışmalarda *Basillus* türlerinin kurşun ağır metale olan dirençliliği bizim çalışmamızda görüldüğü kadar yüksek olmamıştır. Kirlilik yaratan en önemli ağır metal olan kurşuna karşı direnç gösteren bu izolatların, ağır metallerin biyoremediasyonu için ilginç bir alternatif sağlayabileceği düşünülebilir.

Çalışmada elde edilen sonuçların eko-toksikolojik çalışmalar için kullanılabileceği gibi, ağır metal dirençliliği gösteren bu izolatların moleküler düzeyde proteom analizlerinin de yapılabileceğini söyleyebiliriz. İzolatların bu ağır metallerin stresine maruz kaldıklarında verdikleri yanıtın ve savunma mekanizmalarında kullanılan proteinlerin araştırılması gerçekleştirilebilir. Bunun dışında metal dirençli bakterilerin moleküler açıdan yapılan farklı çalışmalarla çoklu metal stresine verdikleri yanıtların türler arası bağlantısı araştırılabilir. Birden çok ağır metal iyonunun, mikroorganizmalara yarışmalı ve/veya kısmi yarışmalı biyosorbsiyonu üzerine çok az sayıda çalışma yapılmıştır [125, 126, 127].

Bu konuda ileride yapılması hedeflenen çalışmalar, çeşitli metallere dirençli mikroorganizmalar aracılığı ile kirletilmiş alanların biyoremedasyonunun (biyolojik iyileştirme) sağlanması yönündedir. Ön tarama niteliğindeki deneylerimiz sonucunda elde edilen bilgiler, *B.pumilus* T56, *B.subtilis* T62, *B.cereus* T65 ve *Paenibacillus polymyxa* T133 suşlarının daha detaylı araştırmalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Sneath, P.H.A. , Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.E. (ed) (1986). Bergey's manual of systemic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore .
- [2] Gordon, R.E. , Haynes, W.C. & Pang, C.H.-N. (1973). The genus *Bacillus* (Agriculture Handbook no. 427). Washington, DC: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- [3] Robinson, R. K. , (1985), Dairy Microbiology, 258p.
- [4] Taubman, S. , (1992), Genus *Bacillus*, contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356.
- [5] Lennette, E. , Balous A., Haysler WJ and Shadomy HJ (1985). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Amer. Soc. Microbiol Washington.
- [6] Ustaçelebi Ş. (1999), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara. S. 87.
- [7] Popham, D.L., B. Illades-Aguilar, and P.Setlow. (1995). The *Bacillus subtilis* dacB gene, encoding penicillin-binding protein 5*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. J. Bacteriol. 177:4721-4729.
- [8] In A. L. Demain, and E. Davies (ed.), Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. Molecular biology and genetics of *Bacillus spp.*, p 392-416.
- [9] Gebhardt K. , Schimana J., Krastel P., Dettner K., Rheinheimer J., Zeeck A., and Fiedler H., Endophenazines A-D, (2002). New Phenazine Antibiotics from the Arthropod Associated Endosymbiont *Streptomyces anulatus*. I.Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. J. Antibio., 55, 794-800.
- [10] Aranda, E. ; Sanchez J. ; Peferoen M.; Güereca L.; Bravo, A., (1996) Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., v.68, p.203-212,.
- [11] Zuber, P. , Nakano, M. M. & Marahiel, M. A. (1993). Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria, pp. 897-916. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington, DC : American Society for Microbiology.
- [12] Norris, J.R. , Berkeley, R.C.W., Logan, N.A & O'Donnel, A.G. (1981). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: M. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows & H. Schlegel the Prokaryotes : A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [13] Sevgi, E. , (2007), ‘Ağır metalle Kontamine Olmuş Topraklardan Metal İyonlarına Dirençli Bakterlerin İzolasyonu Ve Bu Dirençliliğin Plazmidlerle olan İlişkisinin Araştırılması’, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyooji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi.
- [14] Güley, M., Vural, N. , (1997), ‘Toxicoogy’, Ankara University Faculty of Pharmacy Publication, No:48, s.s. , 500 (in Turkish).
- [15] Rether, A., ‘Entwicklung und Charakterisierung was serlöslicher Benzoylthioharnstofffunktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen’, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, Almanya, (2002).
- [16] [http://www. Umweltbundesamt.de/vba-infodatent/daten/umweltkatastrophen.Htm](http://www.Umweltbundesamt.de/vba-infodatent/daten/umweltkatastrophen.Htm).(25.03.2009)
- [17] Öner, M. , ‘Mikrobiyal Ekoloji’, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:100;s.s. 282, İzmir (2002).
- [18] Wiener, P. , Müller-Graf, C., and Barcus, V., (2003). ‘Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research’, Reviews in Undergraduate Research, Vol. 2: 1-6.
- [19] Elman, A. , Yanar, T., Özergin, N., Türkoğlu, H., Ekoloji, No:55, s: 24-31.
- [20] Wong, P.K. and S.C. Kwok (1992): Accumulation of nicel ion (Ni+ 2) by immobilized cells of *Enterobacter* species, Biotechnol Lett. 14: 7, 629-634.
- [21] Gadd, G.M. and A.J. Griffiths (1978) : Microorganisms and heavy metal toxicity, Microb. Ecol. 4: 303-317.
- [22] Ting, Y. P. , F. Lawson, and I. G. Prince (1991) : Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*. II Multi-ion stiation, Biotechnol Bioeng. 37: 445-455.
- [23] Şengül, F. (1991): Endüstriyel atık suların özellikleri ve arıtılması, Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Basımevi Ünitesi (İzmir) 1-365.
- [24] Costa, A.C.A. and S.G. F. Leite (1991): Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella bomosphaera*. Biotechnol. Left. 13:8, 559-562.
- [25] Bigersson, B. , Sterner, O. , Zimerson, E., Chemie und Gesundheit, (1988). ‘Eine verst 2nd liche Einführung in die Toxikologie’, VCHVerlagsgesellschaft, isbn 3-527-264455-8.
- [26] John, H. , Howard, G. , Worth, J. , (1996), ‘Fundamental toxicology for Chemists’, Cambridge, VK:Royal Society of Chemistry Information Services

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı).

- [27] Hughes, M.N. , Poole, R.K. , (1989), 'Metals and Micro-organism.' Pp.400 Chapman and Hall, London.
- [28] Ji, G. , Silver, S., (1995), 'Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern', J. Ind. Microbiol 14:61-168.
- [29] Orelan, R.S. , Blum, J.S. , Bind, A.B. , Dowdle, P.R. , Herbel, M., and Stolz, J.F. , 'Simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspensions of selenium respiring bacteris', Applied and Microbiology.65:4385-4392, (1999).
- [30] Ahmann, D. , Roberts, A.L. , Krumholz, L.R. , and Morel, F.M.M . , 'Microbe grows by reducing arsenic', Nature 371:750.1, (1994).
- [31] Laverman, a.m. , Switzer Blum, J. , Philips, E.J.P. , Lovley, D.R., and OremLand, R.S.: 'Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors', Applied and enviromental Microbiology. 61: 3556-3561, (1995).
- [32] Newman, D.K. , Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R., and Morel, F.M.M. 'Dissimilatory arsenate and sulfate reduction auripigmentum sp.', nov. Archives of Microbiology. 168.380-388, (1997).
- [33] Holan, Z.R. , B.Volesky and I. Prasetyo (1993): Biosorption of cadmium by biomass of marine algae, Biotechnol Bioeng. , 41: 819-825.
- [34] Scott, J.A. and A.M. Karonjkar (1992): Repeated cadmium biosorption by regenerated *Enterobacter aerogenes* bioflim satched to activated carbon, Biotechnol. Let. , 14; 8, 737-740.
- [35] Volesky, B. , H. May and Z.R. Holan (1993): Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* Biotechnology and Bioengineering, 41; 826-889.
- [36] Yazgan, A. , G. Özcengiz, and G. Alahaddinoğlu (1993): Studies on metal resistance system in *Kluyveromyces marxianus*, Biological Trace Element Research, 38: 117-127.
- [37] Favero, N. , P. Costa, M. L. Massimino (1991): In vitro uptake of *Cadmium* by *Basidiomycetes (Pleurotus ostreatus)* Biotechnol. Lett. 13; 10, 701-704.
- [38] Han, N.S. , J.H. Seo, Y.C. Chung (1992): Growth and copper resistance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing a metallothionein gene, Biotechnol. , 14; 1, 7-11.
- [39] Gadd, G.M. (1990): Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. Experimenta 46: 834-840.
- [40] [40] Karin M. (1985) : Metallothioneins: Proteins in search of function. Cell 41; 9-10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [41] Blais, J.F. , R.D. Tyagi, and J.C. Auclair (1993): Bioleaching of metals from sewage sludge: Effects of temperature. *Water Res.* 27; 1, 111-120.
- [42] Artola, A. and M. Rigola (1992): Selection of optimum biological sludge for zinc removal from wastewater by a biosorption process, *Biotechnol. Lett.* , 14; 12, 1199-1204.
- [43] Bruins, M.R. , Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000b). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotox. Environ.Safe.*, 45:198-207.
- [44] Choudhury, R. And Srivastava, S. (2001)Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria. *Curr. Sci.* , 81(7):7.
- [45] Guzzo, J. ,Diorio, D.C., Alexander, D.C. and Dubow , M.S. (1999) Toward understanding metal stres in enviromental microbial flora. *Proccedins of the 8th International Symposium on Microbiol Ecology*, Canada.
- [46] Harnett, N.M. , and Gyles, C.L. ‘Resistance to drugs and heavy metals colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains’, *Appl. Environ. Microbiol.* 48:930-945 (1984).
- [47] McEntee, J.D. , Woodrow, J.R. , and Quirk, A.V., ‘Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes sp.*’, *Appi. Environ. Microbiol.* 51:515-520 (1986).
- [48] Ji, G. , and Silver, S. , ‘Bacterial resistance mechanism for heavy metals of enviromental concern’, *J.Ind.Microbiol.* 14:61-168. (1995).
- [49] Silver, S. (1992). Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanism : Range and Overview. *Plasmid*, 27 :1-3.
- [50] Rouch, D.A. , Lee, B.T.D., and Morby, A.P. ‘Understanding cellular responses to toxic agents: Amodel for mechanism choice in becterial metal resistance’, *J.Ind Microbiol.*14:132-141 (1995).
- [51] Silver, S. (1998). Genes for all metals – a bacterial view of the Periodic Table. *J Indust Microbiol Biotechnol* 20, 1-12.
- [52] Li, X.Z. , Nikaido, H. And Williams, K.E. (1997) Silver-resistance Mutants of *Escherichia coli* Display Active Efflux of Ag⁺ and are Deficient in Poris. *J. Bacteriol.* , 179(19): 6127-6132.
- [53] Gazso, L.G. , (2001). The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment. *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.* , 7: 178-185.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [54] Gavrilescu, M. (2004). Removal of Heavy Metals from the Environmental by biosorption.Eng.Life.Sci., 4(3):219-232.
- [55] Emtiaza, G. , Ethemadifar, Z. And Habibi, M.H. (2004). Production of extra-celluler polymer in Azotobacter and Biosorption of Metal By Exopolymer. Afr.J. Biotech. , 3(6):330-333.
- [56] Scoot, J A, Sage GK, Palmer SJ (1998). Metal immobilisation by microbial capsular coatings.
- [57] Jensen, L.B., Baloda, S., Boye, M. and Aqrestrup, F.M. (2001), Antimicrobial resistance *Pseudomonas ssp.* And *B.cereus* group isolated from Danish Aricultural soil.Environ.Int., 26:581-587.
- [58] Pardo, R. , Herguedas, M. , Barrado, E., and Vega, M., (2003). Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. Anal Bional Chem.,376:26-32.
- [59] Nies, D. H. and Silver, S. , (1995), ION Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistance. J. Ind. Microbiol. , 14(2): 186-199.
- [60] Hassen, A. , Saidi, CherIf, M. & Boudabous, A.(1998). Effect of heavy metals on *Pseudomonas auruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. Biores Technol. 65:73-82.
- [61] Temzikan, G. , ‘Genetik II. Moleküler Genetik’, İ.Ü.Fen Basımevi, s.400 (1999).
- [62] Brown, T.A. , Çeviri Coral, G. , Ünalrı Coral, N., ‘Gen Klonlama’, s.s. 322 (2005).
- [63] Öner, M., Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:94, İzmir, s. 231-245 (1992).
- [64] Schlegel, H. , Production Sekundarer Metabolite, Allegemeine Microbiologie, Georg-Thieme Verlag, s. 362-371 (1992).
- [65] Demain, A.L. , Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol, No:52,s. 455-463 (1999)
- [66] Kish, A.J and J.R. Lampky, 1983. Survival incidence of antibiotic-resistant coliforms in a lagoon system.
- [67] Viljanen, P.,Boratynski, J., The susceptibility of Conjugative Resistance Transfer in Gram Negative Bacteria to Physicochemical and Biochemical Agents.FEMS Microbiology Rev. 88:43-54 (1991).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [68] Desai, J.D. and Banat, I.M., Microbial Production of Surfactans and their commercial potential, Microbiology and Molecular Biology Reviews, No:61, 1, s. 47-64 (1997). [67] Rosovitz, M., J., Voskvil, M., I., Chambliss, G., H., Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Oxford University Press, Ninth Edition, Volume 2, New York, (1998).
- [69] Rosovitz, M.J., Voskvil, M.I., Chamblis, G.H., (1998), Basillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Press, Ninth Edition, Volume 2, New York.
- [70] Öztürk, R. , Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, s. 27-51. (1997).
- [71] Gür, D. , Antibiyotiklerde Direnç Gelişmesi, Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar, Güneş Kitabevi Limited Şirketi. Ankara. s: 19-37. (1994).
- [72] NCCLS -1990 (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard 4th ed. Document. (1990).
- [73] Özçelik, S. , 1998. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu.
- [74] Tamer, A.U. , F. Ucar, E. Unver, I. Karaboz, M. Bursalioglu, R. Ogultekin. 1989. Microbial Ecology (in turkish), In: Microbiology Laboratory Handbook for 3rd and 4th Classes. Anadolu University Press No : 74, Eskişehir.
- [75] Temiz, A. (2000) Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- [76] Malik A. , Jaiswal R. , (2000). Metal Resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16:177-182.
- [77] Masaoka, T. , Suzuki, H. , Kurabayashi, K., Kamiya, A., Shii, H., (2003). Gastroenterology, Volume 124, Issue 4, supplement 1, page A406.
- [78] NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fourth ed. , Approved Standard. NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-56238-309-4) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087, 1997
- [79] Krumperman, P.H. , 1985. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. App Environ Microbiol.
- [80] Vieira, R.H.S. And Volesky, B. (2000) Biosorption: A solution to Pollution. Int. Microbiol., 3:17-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [81] Bezverbnaya. I.P, Buzelova. R.S. and Khristoforovan. S, (2005). Metal resistant heterotrophic bacteria in coastal waters of primorye.
- [82] Karaduman A B Metal tolerant aktinomiset izolatlarının eldesi, karakterizasyonu ve ağır metal giderimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi s:149.
- [83] Ehrlich, H.L. , (1997), Microbes and Metals. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48: 687-692.
- [84] Faulkner, D.J. , 2000. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 17.
- [85] Mercan, N., Çağlar, A., Aslım, B., Beyalı, Y., (2003). Classification of Strains of *Bacillus sphaericus* by Different statistical methods. Turk J. Biol. 27.
- [86] Burgess J.G. , Jordan E.M., Bregu M., Mearns-Spragg A., Boyd K.G. (1997). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. J. Biotechnol.
- [87] Kenny, P. T. M. , Tamura, S. Y., Fredenhangen, A., Naya, Y., Nakanishi, K., Nishiyama, K., Sugiura, M., Kita, H. and Kamura, H. (1989), Symbiotic microorganisms of insects: Potential new source for biological active substances, Pestic. Sci. 27, 117-131.
- [88] Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi., 1998, Production of the antibacterial substance by *Bacillus spp.* Strain MN12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish, Aquaculture 165, 269,280.
- [89] Földes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J., 2000, Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food borne pathogenic and spoilage microorganisms, Journal of Applied Microbiology 89, 840-846.
- [90] Poar, A., Costa, S., Tzanov, T., Güdelj, M., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M., (2000), 'Thermo-alkali stable catalases from newly isolated *Bacillus sp.* for the treatment and recycling of textile beaching effluents'.
- [91] Roberts, M. S. , Nakamura, L. K. & Cohan, F. M. (1996). *Bacillus vallismortis sp. nov.*, a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California.
- [92] Madigan, M. T. , Martinko, J. M. and Parker J. , (2006), Brock Biology of Microorganisms. 11th edition, Prentice Hall.
- [93] Pichard, B., Larue, J.P., Thouvenot, D., 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. FEMS Microbiology Letters. 133:215-218.
- [94] Gündüz, T. 'Çevre Sorunları', (1994, 1. Baskı, A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara, s. 131-148.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [95] Uysal, K. , Köse, E.,Bülbül, M., Dönmez, M., Erdoğan, Y., Koyun, M., Ömeroğlu, Ç.,Özman, F.,(2008), 'The comparision of heavy metal accumulations ratios of some fish species in Enne Dame Lake(Kütahya/Turkey).Environ. Monit. Asees.157:355-362.
- [96] Nalbantçılar, M.T., Arık, F., Haşımoğlu, A.,(2006)'Enne Baraj'ındaki (Kütahya) Kirlilik Düzeyi ve Nedenleri', Selçuk Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği Bölümü, Konya.
- [97] Sandaa, R.A., Torsvik, V.L., Goksuyr, J., 1992. Transferable Drug Resistance in Bacteria from fish farm Sediments. Can J Micro-biol 38: 1061-1065.
- [98] Scott, J.R. , 1992. Sex and the single circle: conjugative transposition. J Bacteriol; 174: 6005-6010.
- [99] Kim, S.U. , Cheong,Y.H., Seo, D.C.,Hur, J.S., Heo, J.S. and Cho, J.S.,(2007), 'Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain *Bacillus spp.* CPB4, DOI:10.2166, S:105-111.
- [100] Beveridge, T.J. and Fyfe, W.S. 'Metals fixation by bacterial cell walls', Can J. Earth. Sci. 22:1893-1898, (1985).
- [101] Albarracin, V. H. , Amoroso, M. J. and Abate, C. M., (2005), 'Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains', Chemie der erde 65 s1. 145-156
- [102] Link L, Sawyer J, Venkateswaran K, Nicholson W, Extreme spore UV resistance of *Bacillus pumilus* Isolates obtained from an Ultraclean Spacecraft Assembly Facility Microbial Ecology,2004, 47:2, 159-163.
- [103] Yilmaz E. I. , (2003), 'Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1', Research in microbiology 154:409-415.
- [104] Babaoğlu, S. , Açıık, L., Çelebi, A. and Adıgüzel, N., (2004), 'Moleculer analysis of turkish Alyssum I. (*Brassicaceae*) species by rapd-pcr and sds-page methods', G.U. Journal of Science,17(3):25-33.
- [105] Mani Rajkumar, Ying Ma and Halena Freitas (2008), 'Characterization of metal-resistant plant-growth promoting *Bacillus weihens* stephonensis isolated from serpentine soil in Portugal', Centre for functional Ecology, Department of Botany, University of Combra, Portugal.
- [106] Zaidi, S. , Musarrat, J.,(2004), 'Characterization and Nikel sorption Kinetics of a New Metal Hyper-accumulation *Bacillus sp.*' Journal of Environ. Sci. and health,No:3,pp.681-691.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [107] Bottone EJ and Peluso RW, Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is ctive againts ucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. *Antimicrobial agents and Chemotheraphy*, 52,69-4.
- [108] Rathnayake, I. V.N. , Mallavarapu, M., Bolan, N. and Naidu R., (2009), ‘Tolerance of heavy metals by gram positive sooil bacteria’. *World academy of science, engineering and tecnology* 53:1185-1189.
- [109] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J. Hobman, J.L. and Wilson, J.R.,(2002), Mercury transport and resistance.*Biochem.,Soc.*, 30:715-718.
- [110] Sadhukan, P.C. ,Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A.,(1997), ‘Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isoleted from Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcuta. *Environ.Pollut.*, 97(1-2):71-78.
- [111] Kamala-Kannan, S. , Lee, K.j.,(2008a),’ Metal tolerance and Antibiotic Resistance of B. Species Isolated from Sunchon Bay Sediments, South Korea’, *Research Institute of Bioindustry. Collageof Agriculture and Life Science, Chonbuk National University, Jeonju*,561-756.
- [112] Velasquez, L., Dusson, J., (2009),’Biosorption and Bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus shpaericus*.’, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 167, Issues 1-3, pages:713-716.
- [113] Austin, C. B., Wringht, M. S., Stepanauskas, R. and McArthur, J. V., (2006), ‘Co-selection of antibiotic and metal resistance’, *Trends in microbiology* vol.14 no.4 :176-182.
- [114] Saunders, J. R., (1984), ‘Genetics and evolution of antibiotic resistance’, *British medical Bulletin*, 40:54-60.
- [115] Hoshino, T., Ikeda, T., Narushima, H. and Tomizuka, N. , (1985),’ Isolation and characterization of antibiotoc-resistance plasmids in thermophilic bacilli’, *Can. J. Microbiol* 31:339-345.
- [116] Reddy, A. , Batisti, L. and Thome, C. B. , (1987), ‘Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis subspecies*’, *J. Of gen. Microbiol.* , 135: 3035-3041.
- [117] Güven K. , İlhan, S. , Mutlu, M. B. and Çolak F., (2008). Diversity, characterization and antimicrobial activities of *Bacillus cereus* strains isolated from soil. *Fres Env Bull* 17: 303-310.
- [118] Bernhard, K., Schremph, H. and Rooebel, W.,(1978),Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *B.cereus* and *B. Subtilis* *J.Bacteriol*, 133:897-903.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [119] Ombui, J.N, Mathenge, J.M. , Kimotho, A.M., Macharia, J.K. and Nduhiu, G.,(1996),Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *B.cereus* strains isolated from milk, East Afr.Med. J. ,73:380-384.
- [120] Aslım, B. , Sağlam, N. , Beyatlı, Y. , (2002), ‘Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil’, no:26,s. 41-46
- [121] Yılmaz, M., Soran, H. and Beyatlı, Y. , (2005),‘Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. Strains isolated from the soil’, Microbial Reserch Vol 161,Issue 2, s. 127-131.
- [122] Kannan, S. K., Mahadevan, S. and Krishnamoorthy, R.,(2006). ‘Characterization of a mercury- reduccig *Bacillus cereus* strain isolated from the Pulicant lake sediments, South east coast of India’, Arch microbiol 185:202-21
- [123] Bhattacharjee, J.W. , Pathak, S.P. and Gaur, A. ,(1988). ‘Antibiotic resistance and metal tolerance of coli form bacteria isolated from Gomti river water at Lucknow city’. , J Gen appl microbiol 34:391-399
- [124] Hussein, H. , Ibrahim, S.F., Kamal, K., Moawad, H., (2004),‘Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas sp.*’,Electronic Journal of Biotechnology, 7(1):38-46.
- [125] Ting, Y.P.,Lawson, F. And Prince, I.G.,(1991),‘Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*:II. Multi-ion situation. Biotech. Nd Bioeng. , 37:445-55.
- [126] Pascucci, P.R. and Sneddon, J. ,(1993),’ A Simultaneous Multielement Flame Atomic Absorption Study for The Removal of Lead, Zinc and Copper by an Algal Biomass, Jour. Environ. Sci. Health, 28: 1483-93.
- [127] Pascucci, P.R. (1993), ‘Simultaneous Multielement Study of Bingling of Metals in Solution By an Algal Biomass, *Chlorella vulgaris*’. Anal. Lett. , 26: 445-55.
- [128] Cervantes , C. , Chavez, K. , Vaco, S.,(1991), ‘Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals, Rev. Latin Microbial. , 33:61-70.
- [129] Mullen, M.D. , Wolf, D.C. , Ferris, F.G. , Beveridge, T.J., Flemming, C.A., Bailey, G.W., (1989), ‘Bacterial soprtion of heavy Metals’, Applied and Environmental Microbiology, 55:3143-3149.
- [130] Gülcan, S. , (2008), ‘Çeşiti Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomanas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı’, Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabil Dalı.