



**KURŞUN AĞIR METALİ
BİYOREMEDİYASYON POTANSİYELİNE
SAHİP MİKROORGANİZMA İZOLASYONU
VE ADAPTASYONU**

**Merve Ezgi ESKİ
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilimdalı
Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ
Ocak-2019**

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURŞUN AĞIR METALİ BİYOREMEDİYASYON POTANSİYELİNE SAHİP
MİKROORGANİZMA İZOLASYONU VE ADAPTASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Merve Ezgi ESKİ

Anabilim Dalı: Biyoloji

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ

KARAMAN-2019

TEZ ONAYI

Merve Ezgi ESKİ tarafından hazırlanan “Kurşun Ağır Metali Biyoremediyasyon Potansiyeline Sahip Mikroorganizma İzolasyonu ve Adaptasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ

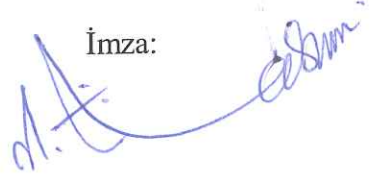
Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Muhammad ASIM

Dr. Öğr. Üyesi Buğrahan EMSEN

Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ

İmza:



Tez Savunma Tarihi: 29/01/2019

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Kamil ARI

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


Merve Ezgi ESKİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURŞUN AĞIR METALİ BİYOREMEDİYASYON POTANSİYELİNE SAHİP MİKROORGANİZMA İZOLASYONU VE ADAPTASYONU

Merve Ezgi ESKİ

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ

Ocak, 2019, 76 sayfa

Biyoremediyasyon, çeşitli kirleticileri doğal biyolojik faaliyetler kullanarak yok etme veya zararsız hale getirme olanağı sunan bir seçenektir. Endüstrinin büyümesiyle endüstriyel atıkların çevreye, özellikle toprak ve suya boşaltılmasında önemli bir artış olmuştur. Bu durum kentsel alanlarda ağır metallerin birikmesine yol açmıştır. Bu amaç için bakteriler, mantarlar veya bitkiler kullanılarak atıkların kontrollü koşullar altında biyolojik olarak zararsız bir hal almasını ve belirlenen konsantrasyon sınırlarının altındaki seviyelere indirgenmesini sağlamak amacıyla biyoremediyasyon biyoteknolojik araçlar kullanılarak uygulanmaktadır. İnsan sağlığı açısından en çok tehdit oluşturan ağır metaller kurşun, kadmiyum, civa ve arseniktir. Bu çalışmada kurşun ağır metalinin biyoremediyasyonuna yönelik mikroorganizma izolasyonu, adaptasyonu ve adaptasyon sağlayan mikroorganizmaların kurşunlu ortamda tepkilerinin SDS-PAGE, fosfoprotein boyama ve 2D-PAGE ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda iki farklı mikroorganizmanın kurşun biyoremediyasyonu potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu iki mikroorganizmanın, kurşun ağır metaline karşı tepkileri incelendiğinde farklı protein profillerine sahip oldukları gözlemlenmiş ve 2D-PAGE spot analizlerinde, TPRK2 için 18, SU1 için 9 adet farklı protein spotu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal biyoremediyasyon, ağır metal, protein profili, 2D Elektrofezi

ABSTRACT

Ms. Thesis

ISOLATION AND ADAPTATION OF MICROORGANISMS HAVING BIOREMEDIATION POTENTIAL FOR LEAD HEAVY METAL

Merve Ezgi ESKİ

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ

January, 2019, 76 pages

Bioremediation is an option that allows the removal or to make harmless of various pollutants by using natural biological activities. There has been a significant increase in the discharge of industrial wastes into the environment, especially to soil and water with regard to the growth of the industry. This has led to the accumulation of heavy metals, especially in urban areas. For this purpose, bioremediation is carried out using biotechnological tools by the help of the bacteria, fungi or plants to ensure that the wastes are biologically harmless and reduced to levels below the determined concentration limits under controlled conditions. Heavy metals, which are the most threat to human health, are lead, cadmium, mercury and arsenic. In this study, isolation and adaptation of microorganisms for bioremediation of lead heavy metal, and determination of the adaptation response by SDS-PAGE, phosphoprotein staining and 2D-PAGE were aimed. According to the results obtained, two different microorganisms have been found to have potential for lead bioremediation. These two microorganisms were found to have different protein profiles when their reactions to lead heavy metals were examined and 18 different protein spots for TPRK2 and 9 for SU1 were detected in the 2D-PAGE spot analysis.

Keywords: Microbial bioremediation, heavy metal, protein profile, 2D Electrophoresis

ÖN SÖZ

Eğitimim boyunca desteğini sürekli hissettiğim, çalışmalarımda tüm bilgi ve becerileri ile yanımda olan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ' a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma için 11-YL-16 nolu proje kapsamında destek veren Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirim. Araştırma çalışmalarında destek ve önerileri ile yanımda olan Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü değerli hocalarına, tüm Kamil Özdağ Fen Fakültesi ailesine saygılarımı iletiyorum. Mikrobiyoloji laboratuvar çalışma arkadaşlarım Suzan ŞAHİN DOĞAN hocama, Burhan KARABAKAN, Serap GÖNEK, Sevim KOL, Tuğba ÖZKAN ve diğer laboratuvar çalışanlarına gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Hayatımda büyük önem arz eden sevgili dostlarım İlayda ŞAT, Nimet GENÇ ve Berna ŞAHBAL iyiki varsınız.

Hayatımın her anında gösterdikleri sevgi, sabır, güven ve anlayış için annem Selda ESKİ, babam Şenol ESKİ, kardeşim Cavit Burak ESKİ' ye sevgilerimle.


Merve Ezgi ESKİ
Karaman-2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Ağır Metal Kaynakları	3
2.1.1. Kurşun Ağır Metali	3
2.1.2. Kurşun Ağır Metalinin Vücuda Alınması	4
2.1.3. Kurşunun Vücuda Etkileri	4
2.2. Biyoremediyasyon ve Uygulanması	5
2.3. Biyoremediyasyonun Avantaj ve Dezavantajları	6
2.3.1. Biyoremediyasyon Uygulamasının Avantajları	6
2.3.2. Biyoremediyasyon Uygulamasının Dezavantajları	6
2.4. Biyoremediyasyona Etki Eden Faktörler ve Biyoremediyasyon Çeşitleri	7
2.4.1. <i>In Situ</i> Biyoremediyasyon	7
2.4.2. <i>Ex Situ</i> Biyoremediyasyon	8
2.5. Bitkiler ve Biyoremediyasyon (Fitoremediyasyon)	9
2.6. Mantarlar ve Biyoremediyasyon (Mikoremediyasyon)	9
2.7. Bakteriler ve Biyoremediyasyon	10
2.8. Proteinler	11
2.9. Proteinlerin Karakterizasyonu	14
2.9.1 Jel elektroforezi	14
2.9.2. Agaroz Jel Elektroforezi	14
2.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	15
2.9.4. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2D-PAGE)	16
2.10. Biyoremediyasyon Uygulama Örnekleri	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19

3.2. Metot.....	19
3.2.1. Mikroorganizmaların Eldesi, Kültürü ve İzolasyonu	21
3.2.2. Adaptasyon Aşaması ve Direnç Tespiti.....	22
3.2.3. Biyokimyasal Testler	22
3.2.4. Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri	24
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Bakteri Tanımlama.....	24
3.2.6. Mikroorganizmaların Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	27
4. BULGULAR	31
4.1. Mikroorganizmaların Eldesi, Kültürü ve İzolasyonu	31
4.2. Adaptasyon Aşaması ve Direnç Tespiti.....	34
4.3. Biyokimyasal Testler	35
4.4. Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri	35
4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Mikroorganizma Tanımlama	37
4.6. Mikroorganizmaların Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR	58
EKLER	64
EK 1	64
EK 2	65
EK 3	66
EK 4	68
EK 5	70
EK 6	72
EK 7	74
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Gram pozitif ve gram negatif bakteri dış yüzeyi	10
Şekil 2.2 Amino asit yapısı.....	12
Şekil 2.3 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı	13
Şekil 3.1 Çalışmada uygulanan akış şeması	20
Şekil 3.2 25 bp DNA Ladder'a ait cetvel	27
Şekil 4.1 İzole edilecek kültürlerin NA besisi yerinde petri görüntüleri	32
Şekil 4.2 Mikroorganizmaların kurşunlu ve kurşunsuz besisi yerindeki görüntüleri	36
Şekil 4.3 TPRK2 büyüme eğrisi	36
Şekil 4.4 SU1 büyüme eğrisi	36
Şekil 4.5 Koloni PZR' a ait agaroz jel elektroforezinde bant görüntüsü.....	38
Şekil 4.6 SU1 kodlu mikroorganizmaya ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu	39
Şekil 4.7 TPRK2 ve <i>P. aeruginosa</i> ' ya ait SDS-PAGE protein profilleri.....	40
Şekil 4.8 TPRK2 ve <i>P. aeruginosa</i> ' ya ait SDS-PAGE toplam protein profilleri.....	42
Şekil 4.9 TPRK2 ve <i>P. aeruginosa</i> ' ya ait SDS-PAGE fosfo protein profilleri.....	43
Şekil 4.10 TPRK2 kodlu mikroorganizmanın NB besisi yerinde 2D-PAGE görüntüsü, TPRK2 kodlu mikroorganizmanın 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besisi yerinde 2D-PAGE görüntüsü	44
Şekil 4.11 <i>P. aeruginosa</i> ' nın NB besisi yerinde 2D-PAGE görüntüsü, <i>P. aeruginosa</i> ' nın 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besisi yerinde 2D-PAGE görüntüsü.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Yaygın olarak bulunan 21 amino asidin adı ve kimyasal özelliği.....	12
Çizelge 3.1 Örnek alım noktaları, tarihleri ve numune biçimi	21
Çizelge 3.2 PZR karışım protokolü	25
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler	26
Çizelge 3.4 İzoelektrik odaklama protokolü.....	30
Çizelge 4.1 İzolasyon aşamasında elde edilen mikroorganizmalar ve morfolojik özellikleri	33
Çizelge 4.2 Biyoremediyasyon uygulamasında kullanılacak mikroorganizmalar	34
Çizelge 4.3 Biyoremediyasyon uygulamasında kullanılacak mikroorganizmaların biyokimyasal test sonuçları.....	35
Çizelge 4.4 ICP-MS ölçüm sonuçları	37
Çizelge 4.5 TPRK2‘ nin 2D-PAGE aynı protein spotlarının karşılaştırılması.....	46
Çizelge 4.6 TPRK2 kodlu mikroorganizma‘ nın 2D-PAGE farklı protein spotlarının karşılaştırılması.....	47
Çizelge 4.7 <i>P. aeruginosa</i> ‘ nın 2D-PAGE aynı protein spotlarının karşılaştırılması.....	50
Çizelge 4.8 <i>P. aeruginosa</i> ‘ nın 2D-PAGE farklı protein spotlarının karşılaştırılması..	51
Çizelge EK7 1 Fosfoproteinlerin tespiti için boyama protokolü	75
Çizelge EK7 2 Toplam proteinlerin tespiti için boyama protokolü	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	Yüzde
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre (hacim ölçü birimi)
dk	Dakika
G	Yerçekimi ivmesi
G	Gram
kDa	Kilodalton (atomik kütle birimi)
KOB	Koloni oluşturan birim
L	Litre (ölçü birimi)
M	Molarite (madde konsantrasyonu)
mL	Mililitre (ölçü birimi)
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pH	Hidrojen Gücü (ölçü birimi)
ppm	mg çözünen / kg veya litre çözelti
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
W	Watt (güç birimi)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
DNA	Deoksiribonükleik asit
O.D.	Absorbans değeri
rRNA	Ribozomal RNA
UV	Ultraviyole (morötesi ışık)

1. GİRİŞ

Endüstrinin büyümesiyle endüstriyel atıkların çevreye, özellikle toprak ve suya boşaltılmasında önemli bir artış olmuştur. Bu durum özellikle kentsel alanlarda ağır metallerin birikmesine yol açmıştır. Ağır metallerin toprak ve sulara salınması, toksik olmayan formlara parçalanmaması ve bu nedenle ekosistem üzerinde uzun süreli etkiler göstereceği için dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Ağır metallerin çoğu, çok düşük konsantrasyonlarda bile toksiktir. Ağır metallerin başında arsenik, kadmiyum, krom, bakır, kurşun, civa, nikel, selenyum, gümüş ve çinko gelmektedir. Ağır metaller sadece sitotoksik değil aynı zamanda kanserojen ve mutajenik özellikleride barındırmaktadır (Dixit ve ark., 2015).

Kurşun ağır metali, madencilik, kurşun cevherlerinin erimesi ve yanmasından, kurşun tel veya boru üreten sanayilerden, otomobil egzozundan, metal kaplama işlemlerinden, gübrelerden, pestisitlerden ve kurşun bazlı boyalardan çevreye salınmaktadır (Chakraborty, 2013). Kurşun kanserojen ve mutajenik olup biyolojik sistemler üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır (Naik, 2012). Çevrede bulunan kurşun insan vücudu içinde birikebileceğinden, insan sağlığı, özellikle de çocukların sağlığında geri dönüşü olmayan hasarlara yol açmaktadır. Gelişim bozukluğu, zeka geriliği, kısa süreli hafıza kaybı, öğrenme ve koordinasyon problemleri bu hasarların sadece bir kaçıdır (Li, 2016).

Ağır metalle kirlenmiş topraklar ve sular, DNA, protein ve lipitlere zarar vermektedir ve ayrıca metal iyonları enzim ve protein yapılarını değiştirdiğinden mikrobiyal büyüme için ekstrem koşullar yaratmaktadır. Mikroorganizmalar, metallerin toksik seviyelerine dayanacak çeşitli direnç mekanizmalarına sahiptir; Bunlar indirgeme, oksidasyon, çöktürme, hücre dışı sekestrasyon ve hücre içi biyoakümülyasyondur (Naik, 2012).

Toprakta ve suda meydana gelen ağır metal kirlenmesi çeşitli mobilizasyon ve immobilizasyon teknikleri ile giderilebilir. Bu teknikler biyoremediyasyon, elektrokimyasal işlem, iyon değişimi, çöktürme, ters ozmoz, buharlaştırma, ağır metal çıkarma teknikleri ve fizikokimyasal yöntemlerdir. Bu teknikler arasında biyoremediyasyon, düşük metal konsantrasyonlarında bile yüksek etkinliğe sahip olabileceği için, diğer yöntemlere kıyasla çok daha iyi bir seçenektir (Chatterjee, 2012). Biyoremediyasyon, çeşitli kirleticileri doğal biyolojik faaliyetler kullanarak yok etme

veya zararsız hale getirme olanağı sunan bir seçenektir. Düşük maliyetli, düşük teknolojiye tekniklerin kullanılması biyoremediyasyon yöntemin avantajlarından sadece bir kaçıdır (Vidali, 2001).

Fiziko-kimyasal yöntemler ağır metallerin konsantrasyonları 100 mg/L' den daha fazla olduğu ortamlarda etkin bir şekilde kullanılabilir. Özellikle sulu ortamlarda ağır metal tuzları çözündüğü için fiziksel ayırma yöntemleri yetersiz kalmaktadır dolayısıyla bu tarz durumlarda ağır metallerin uzaklaştırılması için alternatif metod olarak biyosorpsiyon ve / veya biyoakümülyasyon gibi biyolojik yöntemler tercih edilmektedir. Ağır metal kirliliğinin önlenmesinde biyoremediyasyonun diğer bir avantajı da mikroorganizmaların, mantarların ve bitkilerin kullanılmasından kaynaklı olarak sürdürülebilir iyileştirme potansiyeli sunmasıdır (Dixit ve ark., 2015).

İnsan nüfusunun artması, kontrolsüz endüstriyel gelişmeler doğanın kapasitesinin üzerinde kirlenmesine sebep olmaktadır. Bu kirliliğin önüne geçebilmek adına biyoremediyasyonun biyoteknolojik uygulamaları ön plana çıkmıştır. Biyoteknolojik çalışmalar arasında yeni ve farklı mikroorganizmaların bulunması, bunların istenilen karakteristiğe göre adaptasyonları bulunmaktadır. Bu çalışmada da, kurşun ağır metalinin biyoremediyasyonuna yönelik farklı ortamlardan mikroorganizma izolasyonları adaptasyonlarının sağlanması ve adapte olan mikroorganizmaların toplam ve fosfoprotein profillerinin SDS-PAGE üzerinde karşılaştırılması ve 2D-PAGE ile farklı protein spotların tayini amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ağır Metal Kaynakları

Ağır metaller, doğal olaylar ve insan yapımı faaliyetler sonucunda aşırı üretilmesi nedeniyle toprak ve su ortamında kirletici maddeler haline gelir. Ağır metal kaynakları, madencilik, eritme, elektrokaplama, böcek ilacı kullanımı, gübre deşarjı, kanalizasyon çamuru gibi doğal olmayan insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır. Doğanın jeokimyasal döngüsünün insanlar tarafından bozulması, topraklarda ve sularda ağır metal birikimiyle sonuçlanabilmektedir. Ağır metallerin çevrede birikimi başta insan sağlığı olmak üzere, bitkilere ve hayvanlara geri dönüşümlü-dönüşümsüz risk oluşturmaktadır. Ağır metallerin çoğu, çok düşük konsantrasyonlarda bile toksiktir. Ağır metallerin başında arsenik, kadmiyum, krom, bakır, kurşun, civa, nikel, selenyum, gümüş ve çinko gelmektedir (Dixit ve ark., 2015).

2.1.1. Kurşun Ağır Metali

Kurşun (Pb) atom numarası 82 ve atom kütlesi 207,19 olan mavi-gümüş rengi karışımı bir elementtir. Kurşun 327,5 °C de erir ve 1740 °C de kaynar. Doğada, 208, 206, 207 ve 204 kütle numaralarına sahip 4 izotopu bulunmaktadır. Kurşunun son katmanında 4 açık elektron olmasına rağmen, genellikle bileşiklerinde +4 yerine +2 değerlik alır. Çünkü kalan son 2 elektron kolayca iyonize olabilir. Yer kabuğunda bulunma sıklığı 12,5 g/t'dur. Doğal olarak bulunabilen metaller arasında yer alır. Kurşunun en çok rastlanılan cevherleri, galen (PbS) ve onun oksitlenmiş ürünleri serüsit (PbCO₃) ve anglezittir (PbSO₄) (Järup, 2003).

Ağır metaller binlerce yıldır pek çok alanda kullanılmakta, çevreye salınmakta ve ekosistemi tehdit etmektedir. Kurşun ağır metali başta kurşun yapımı, yapı malzemeleri, cam seramik için pigmentler ve su taşıma boruları da dahil olmak üzere kullanılmaktadır (Järup, 2003). Kurşun, civa, arsenik ve kadmiyum gibi ağır metaller vücuda besinlerle, içme sularıyla, hatta hava yoluyla buhar olarak girer, yumuşak dokularda birikip uzun yıllar kalır. Hatta anneden çocuğa da geçebilir. Çeşitli organ hasarları oluşturur, zehirlenme ve ölümlere neden olabilir (Järup, 2003).

Endüstri ve sanayide kullanımı nedeniyle kurşun doğada fazlaca bulunmaktadır. Kurşunlu otomobil yakıtları, kurşun içeren boyalar, bu boyaların kullanıldığı oyuncak ve diğer malzemeler, güneşlikler, sırlı porselen ve seramik malzemeler, kurşun içeren kap ve cam ürünleri, otomobillerde kullanılan kurşun-asit bataryalar, kurşun lehimli ambalajlardaki konserve kutuları, gıda ve içecekler, kurşunla kontamine olmuş su ve arazilerden elde edilen sebze ve meyveler, tütün mamulleri, su, alkollü içecekler; ile bu ortamlardan etkilenen balık, beyaz ve kırmızı et, sakatat türleri, süt, süt ürünleri kurşunun başlıca kaynaklarıdır (Dindar ve Aslan., 2005).

2.1.2. Kurşun Ağır Metalinin Vücuda Alınması

Ağır metaller, hava, su, toprak ve besinlerle canlı vücuda alınırlar. Solunum, sindirim ve deriden emilim ile vücutta birikir ve sağlığı tehdit ederler.

Solunum

Kurşun hava sirkülasyonu ile çevrede dağılım gösterir. Özellikle endüstriyel faaliyetler sonucunda açığa çıkan kurşun partikülleri ve kurşun içeren benzinlerin çevreye salınımı havanın kurşun ağır metali ile kirletilmesine neden olmaktadır. Havada bulunan kurşun partikülleri solunum yolları ile canlı vücuduna girer (Dindar ve Aslan., 2005).

Sindirim

Kurşun ağır metali çok düşük seviyelerde dahi sindirim sisteminden absorbe edilerek kan vasıtasıyla dokulara ulaşır. Kurşun ince bağırsak villuslarından kana hızla emilir ve vücutta birikmeye başlar (Dindar ve Aslan., 2005).

Deriden Emilim

Organik kurşun bileşikleri için meydana gelebilecek bir durumdur. Özellikle boyaların içinde bulunan kurşun oksit ve kurşun karbonat bileşikleri temas halinde deriden vücut içine alınmaktadır (Dindar ve Aslan., 2005).

2.1.3. Kurşunun Vücuda Etkileri

Kurşunun etkileri akut ve kronik olarak iki kategoride değerlendirilmektedir. Düşük konsantrasyonlardaki kurşun alımına akut, yüksek konsantrasyonda ve tekrarlayan kurşun alımlarını ise kronik zehirlenmeler denilmektedir. Akut zehirlenmeler hissedilemeyecek derecede gerçekleşir fakat kronik zehirlenmeler ağızda metal tadı,

bulantı, kusma diyare, solunum durması hatta ölümle sonuçlanabilmektedir (Dindar ve Aslan., 2005).

Kurşun özellikle kan hücreleri ve sinir hücrelerine etki etmektedir. Kurşun enzim inhibitörü olarak hücrelere geçer ve enzimlerin antioksidan etkinlik göstermesine izin vermez. Düşük dozlarda bile büyüme ve sinirsel gelişimi baskılar. Hamilelik sırasında alınan kurşun, bebekte sinir sistemi bozukluğuna ve gelişme geriliğine neden olmaktadır (Mameli ve ark., 2001).

Kurşun zehirlenmesinin belirtileri yetişkinlerde birkaç hafta içinde ortaya çıkarken çocuklarda bu bir veya iki gündür. Belirtiler çocuklarda daha şiddetli olarak görülür. Önlem alınmayan kurşun zehirlenmelerinde felç, körlük, hafıza kaybı, mental gecikme, kısırlık ve karaciğer yetmezlikleri hatta koma ve ölüm gelişebilmektedir (Dindar ve Aslan., 2005).

2.2. Biyoremediyasyon ve Uygulanması

Biyoremediyasyon, atıkların kontrollü koşullar altında biyolojik olarak zararsız bir hal almasını ve belirlenen konsantrasyon sınırlarının altındaki seviyelere indirgenmesini sağlayan süreç olarak tanımlanır. Tanım olarak biyoremediyasyon, çevre kirleticilerini daha az toksik yapılara indirmek için, başta mikroorganizmalar olmak üzere canlı organizmaların kullanılmasıdır. Moleküler biyoloji ve ekoloji alanında yapılan çalışmalar, canlıların biyolojik süreçlerinin daha iyi anlaşılmasını ve dolayısıyla biyoteknolojik potansiyellerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu alanlardan bir tanesi de biyoremediyasyondur ve özellikle kirli su ve arazilerin temizlenmesinde canlılar etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Vidali, 2001).

Biyoremediyasyon, insan ve çevre sağlığı amacıyla zararlı maddeleri indirmek veya çözmek için bakterileri, mantarları ve/veya bitkileri kullanır. Mikroorganizmalar kirletilmiş bölgeye özgü olabilir ya da başka alanlardan izole edilebilir ve kirlenmiş bölgeye getirilebilirler. Kirletici bileşikler, canlı organizmalar tarafından, metabolik süreçlerinin bir parçası olarak oluşan reaksiyonlar yoluyla dönüştürülür. Biyoremediyasyonun etkili olabilmesi için, mikroorganizmalar kirleticilere enzimatik olarak saldırmalı, zararlı olmayan ürünlere dönüştürmeli veya bünyesinde muhafaza etmelidir (Vidali, 2001; Kumar ve ark., 2011) .

2.3. Biyoremediyasyonun Avantaj ve Dezavantajları

Biyoremediyasyon uygulamasının birçok avantajının yanında dezavantajları da bulunmaktadır.

2.3.1. Biyoremediyasyon Uygulamasının Avantajları

- Doğal bir işlemdir, toprak gibi kontamine olmuş malzemeler için kabul edilebilir bir atık işleme biçimidir.
- Kirlenici madde bozunduğunda, biyolojik bozunma popülasyonu azalır. Uygulama kalıntıları, genellikle su, karbondioksit ve hücre biyokütlesi dahil zararsız bir ürünlerdir.
- Çok daha az çaba gerektirir ve genellikle normal faaliyetlerde büyük bir aksamaya neden olmadan sahada gerçekleştirilebilir.
- Tehlikeli atıkların temizlenmesi için kullanılan diğer geleneksel yöntemlerden (teknolojilerden) daha uygun maliyetli bir işlemde uygulanır.
- Ayrıca, kirlenicilerin tamamen yok edilmesine yardımcı olur, tehlikeli bileşiklerin çoğu zararsız ürünlere dönüştürülebilir.
- Tehlikeli kimyasallar kullanmaz. Besinler, özellikle aktif ve hızlı mikrobiyal büyüme sağlamak için eklenen materyallerdir.
- Biyoremediasyon zararlı kimyasalları suya ve zararsız gazlara dönüştürdüğü için zararlı kimyasallar tamamen ortadan kalkmaktadır.
- Doğal ekosistemi kirlenici maddeden arındırmak için etkili ve çevre dostu bir seçenektir (Abatenh ve ark., 2017).

2.3.2. Biyoremediyasyon Uygulamasının Dezavantajları

- Biyobozunur olan bileşiklerle sınırlıdır.
- Biyolojik bozunma ürünlerinin ana bileşikten daha toksik olabileceğine dair bazı endişeler vardır.
- Biyolojik süreçler genellikle oldukça spesifikdir.

- Kirletici maddeler katılar, sıvılar ve gazlar olarak mevcut olabilir. Çevrede eşit şekilde dağılmayan karmaşık kirletici karışımları bulunan alanlar için uygun olan biyoremediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.
- Genellikle kazı ve toprağı yakmak gibi diğer arıtma seçeneklerinden daha uzun sürer.
- Biyoremediasyon için kabul edilebilir performans kriterlerine ilişkin düzenleyici belirsizlik devam etmektedir. Kabul edilmiş bir “temiz” tanımı yoktur, biyoremediasyonun performansını değerlendirmek zordur (Abatenh ve ark., 2017).

2.4. Biyoremediasyona Etki Eden Faktörler ve Biyoremediasyon Çeşitleri

Biyoremediasyon süreci kontrolü ve optimizasyonu birçok faktörden oluşan karmaşık yapıda bir sistemdir. Bu faktörler arasında, kirleticileri parçalayabilen bir mikrobik popülasyonun varlığı, kirleticilerin mikrobiyal popülasyona uygunluğu, çevre faktörleri (toprak tipi, sıcaklık, pH, oksijen ve besin maddelerinin varlığı) bulunmaktadır (Vidali, 2001). Bu çevresel faktörler mikroorganizmanın optimum koşullarını etkilediği için biyoremediasyon sürecinin verimliliğini de etkilemektedir.

Biyoremediasyon iki şekilde gerçekleştirilir; Bunlar *in situ* (yerinde) biyoremediasyon ve *ex situ* (yerinde olmayan) biyoremediasyondur (Girma, 2015).

2.4.1. *In Situ* Biyoremediasyon

In situ biyoremediasyon, biyolojik arıtmanın yeraltında bulunan tehlikeli kimyasalların temizliğinde uygulanmaktadır. Bu metodda biyoremediasyon uygulanacağı bölgede doğal olarak bulunan bakteriler oksijen ve besince zengin çözeltilerle uyarılarak biyoremediasyon süreci gerçekleştirilir. *In situ* biyoremediasyon toprak ve yeraltı suyu için kullanılabilir. *In situ* biyoremediasyon uygulanmadan önce biyoremediasyonu gerçekleştirecek kirleticilerin mikrobiyal dönüşümlerinin optimizasyonu ve kontrolü amacıyla öncesinde bilimsel çalışmalar gerçekleştirilir (Akshata ve ark., 2012). *In situ* biyoremediasyon, iki farklı yaklaşım içermektedir (Kulshreshtha ve ark., 2014).

Yerleşik Biyoremediyasyon Uygulaması

Yerleşik biyoremediyasyon, kirlenmiş bölgede doğal olarak oluşan mikrobiyal toplulukların metabolik aktivitelerini arttırmak için ortama besin, azot kaynağı ve oksijen tavrakivesinin yapıldığı bir yöntemdir (Kulshreshtha ve ark., 2014).

Tasarlanmış Biyoremediyasyon Uygulaması

Laboratuvar ortamında *in situ* biyoremediyasyon uygulaması için tasarlanan mikrobiyal topluluğun kirlenmiş bölgeye uygulanması ile gerçekleştirilir. Kirlenmiş bölgeye uygulanan mikrobiyal topluluğun bozunma işlemini hızlandırmak amacıyla ortama besin, azot kaynağı ve oksijen tavrakivesi yapılmaktadır (Kulshreshtha ve ark., 2014).

2.4.2. *Ex Situ* Biyoremediyasyon

Ex situ biyoremediyasyon uygulayabilmek için kirlenmiş toprağın kazılması ve çıkarılması gerekir. Kirlenici maddenin durumuna bağlı olarak, *ex situ* biyoremediyasyon katı faz sistemi (toprak işleme ve toprak yığınları) ve bulamaç faz sistemleri (bio reaktörlerde katı-sıvı süspansiyonlar) olarak gerçekleştirilir (Akshata ve ark., 2012).

Katı Faz Sistemleri

Katı-Faz biyoremediyasyon, kirlenmiş toprağın kazıldığı bir *ex situ* biyoremediyasyon teknolojisidir. Bakteriyel büyümenin uyarılması için alan boyunca döşenmiş borulardan oluşan sistemler hazırlanır ve bu sistemler sayesinde mikrobiyal solunum için gerekli havalandırma sağlanır. Katı fazlı sistemler, çok fazla alan gerektirir ve temizleme işlemleri bulamaç faz işlemlerinden daha fazla zaman gerektirir (Kulshreshtha ve ark., 2014).

Bulamaç Faz Sistemleri

Bulamaç fazı kirlenmiş toprağın kazılıp çıkartılmasından sonra suyla karıştırılması ve bir biyoreaktöre yerleştirilmesi sonucu uygulanan kontrollü olarak yapılan bir uygulama biçimidir. Bu işlemde ilk olarak taşların ve molozların kirlenmiş topraktan ayrılması amaçlanır. Daha sonra, bulamacı oluşturabilmek için toprak bir solüsyon ile karıştırılır. Eklenen solüsyon miktarı, biyolojik bozulma oranı, toprağın fiziksel yapısı ve kirlenicilerin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu işlem sonrasında toprak, basınç ve vakum

filtreleri veya santrifüjler kullanılarak kurutulur. Bir sonraki aşama ise toprak ve elde edilen sıvıların daha fazla işlenmesini içerir (Kulshreshtha ve ark., 2014).

2.5. Bitkiler ve Biyoremediyasyon (Fitoremediyasyon)

Fitoremediyasyon uygulaması, çevredeki kirleticilerin alınmasında ya da onların zararsız hale getirilmesinde bitkilerin kullanımı sağlayan bir teknolojidir (Dindar ve ark., 2010). Bitkiler toprağı, suyu veya havayı temizlemek için kullanılabilir. Bu teknoloji son zamanlarda tehlikeli atık sahalarında kullanılan daha gelişmiş arıtma yöntemlerine yenilikçi, uygun maliyetli bir alternatif olarak dikkat çekmektedir (Gırma, 2015). Toksik ağır metaller ve organik kirleticiler fitoremediyasyon uygulamasında hedef alınan kirleticilerdir (Dindar ve ark., 2011). Bitkiler organik kirleticileri bozabilir, parçalayabilir veya metallerde olduğu gibi bünyesine alabilir (EPA, 1995). Fitoremediyasyon çevresel açıdan problem oluşturmaması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Uygulanan yöntem toprak yapısını değıştirmez ve fitoremediyasyon sonrasında toprak tarımsal amaçlar için kullanılabilir. (Dindar ve ark., 2011). Fitoremediyasyonun dezavantajı uygulanabilir strateji olması için, yüksek metal alım gücüne sahip hızlı büyüyen bitkilere ihtiyaç duymasıdır (Khan ve ark., 2000). *Helianthus annuus* (Meers ve ark., 2005), *Brassica napus* (Zaier ve ark., 2010) ve *Bassia scoparia* fitoremediyasyonda kullanılan türlerdir (Moubasher ve ark., 2015).

2.6. Mantarlar ve Biyoremediyasyon (Mikoremediyasyon)

Mikoremediyasyon uygulaması, mantarların salgıladıkları enzimler, birçok çevresel kirleticinin indirgenmesi, endüstriyel ve tarımsal sanayi atıklarının ayrıştırıp kullanılabilir ürünlere dönüştürülmesini içeren bir teknolojidir. Mantarlar ekstrem iklim koşullarında gelişebilirler (Rhodes ve ark., 2014; Vural ve ark., 2018).

Mantarlar, güçlü hücresel enzimler salgırlar. Bu enzimler arasında lignin peroksidazlar (LiP), manganez peroksidaz ve lakkaz bulunur. Dolayısıyla kirlenmiş bölgelerde bu organizmalar tarafından bozunma oranlarını arttırmak için ortama talaş, saman ve mısır koçanı gibi karbon kaynakları eklemek diğerk teknolojiiler ile kıyaslandığında daha kolay bir seçenektir. Mantarlar, pestisitlerin biyotransformasyonu, petrol hidrokarbonlarının ve lignoselüolitik atıkların kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde parçalanması için kullanırlar. Kirli alanların temizlenmesinde *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus bisporus*, *Trametes versicolor* ve *Pleurotus*

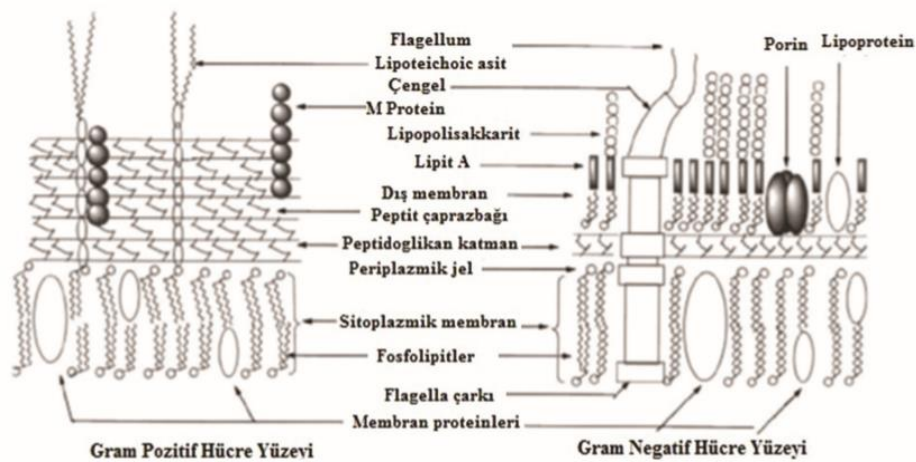
ostreatus gibi birçok mantar kullanılmaktadır (Adenipekun ve Lawal, 2012). Bu yöntemin dezavantajı havada sporların dağılması yoluyla hızlıca yayılmalarıdır (Rhodes ve ark., 2014; Vural ve ark., 2018).

2.7. Bakteriler ve Biyoremediyasyon

Bakteriler 1 µm genişliğinde ve 1-5 µm uzunluğunda olan, bağımsız olarak yaşayan tek hücreye sahip canlılardır. Ender durumlarda 50 µm genişliğinde ve bir kaç mm uzunluğunda olanları bulunmaktadır. Yine istisnai bir durum olarak aktinomisit ve biyofilm oluşumlarında çok hücreli bakteri yapıları gözlemlenmektedir. Bunun yanında ökaryot canlılara kıyasla bölünme zamanları çok kısadır ve biyoteknolojik uygulamalarda çok önemli bir avantaj sağlamaktadır (Kocabaş ve Ulaşlı, 2014).

Bakterilerde istisnai gruplar hariç güç ve koruma sağlayan hücre duvarı yapıları bulunmaktadır. Oldukça karmaşık olan bu yapının bileşeni, küçük peptit zincirleri ile birbirine bağlanmış polisakkaritlerin oluşturduğu kompleks bir polimer olan peptidoglikan tabakasıdır. Hücre duvarının kalınlığı ve içeriği bakterilerin türüne göre farklılık göstermektedir. Hücre duvarı yapılarına göre bakteriler 2 gruba ayrılır (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).

Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı, kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşmaktadır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarları ise daha ince olup dış tabaka lipopolisakkarit içermektedir (Şekil 2.1). (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).



Şekil 2.1 Gram pozitif ve gram negatif bakteri dış yüzeyi (Bozanta ve ark., 2011)

Bakteriler, farklı koşullarda yaşayabilmektedir ve biyolojik bozunmalarda önemli rol oynamaktadır. Bakteriler yüksek ağır metal içeren ortamlarda dahi biyolojik

fonksiyonlarını yerine getirebilmek için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar metallerin uzaklaştırılması, metal iyonlarının hücre dışına atılması veya hücre içinde biriktirilmesidir. Bu aktiviteler sonrasında toksik metal iyonları toksik olmayan yan ürünlere dönüştürülür veya hücre bünyesinde muhafaza edilir. Biyoremediyasyonda sıklıkla kullanılan bakteriler *Xanthofacter*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycrobacterium*, *Nitrosomonas*' dır (Kulshreshtha ve ark., 2014). Bakterilerin biyoremediyasyon süreci aerobik ve anaerobik olarak gerçekleştirilebilir.

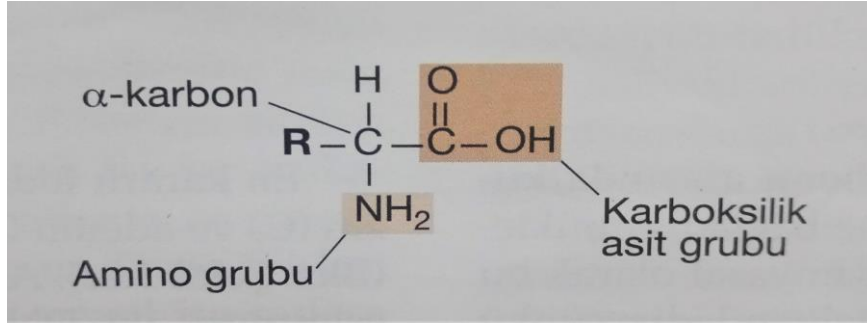
Aerobik biyoremediyasyon sürecinde kullanılan bakteriler parçalayıcı yetenekleriyle tanınan *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* ve *Mycobacterium*'dur. Bu bakterilerin, hem alkanları hem de böcek ilacı ve hidrokarbonları bozdukları bildirilmiştir. Bunun yanında bakterilerin birçoğu, ortamda bulunan kirleticiyi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Anaerobik biyoremediyasyon süreçleri nehir sedimentlerinde poliklorlu bifenillerin biyolojik olarak arıtılmasında ve atık suların temizlenmesinde kullanılmaktadır. (Kulshreshtha ve ark., 2014). Anaerobik biyoremediyasyon sürecinde kullanılan bakteriler *Desulfitobacterium spp.*' dir.

2.8. Proteinler

Tüm canlılarda metabolik yolların kontrolü proteinler tarafından gerçekleştirilir. Mikrobiyal ağır metal biyoremediyasyonunda metal bağlayan proteinler ön plana çıkmaktadır. Dolayısıyla ağır metal biyoremediyasyonunu açıklayabilmek için protein yapısı ve yolları bilmek önemlidir.

Proteinlerin Yapıları

Amino asitler proteinlerin monomerleridir. 21 amino asitten 18'i sadece karbon, hidrojen, oksijen ve azot içerirken, iki tanesi kükürt ve bir tanesi selenyum içermektedir. Tüm amino asitler α -Karbona bağlı bir karboksilik asit (-COOH) bir amino grubu (-NH₂) ve bir değişken gruptan oluşur (Şekil 2.2). Proteinler, bir amino asidin karboksil grubu ile bir sonraki amino asidin amino grubu arasında kurulan peptid bağları aracılığıyla sentezlenir (Madigan ve Martinko, 2010).



Şekil 2.2 Amino asit yapısı (Madigan ve Martinko, 2010).

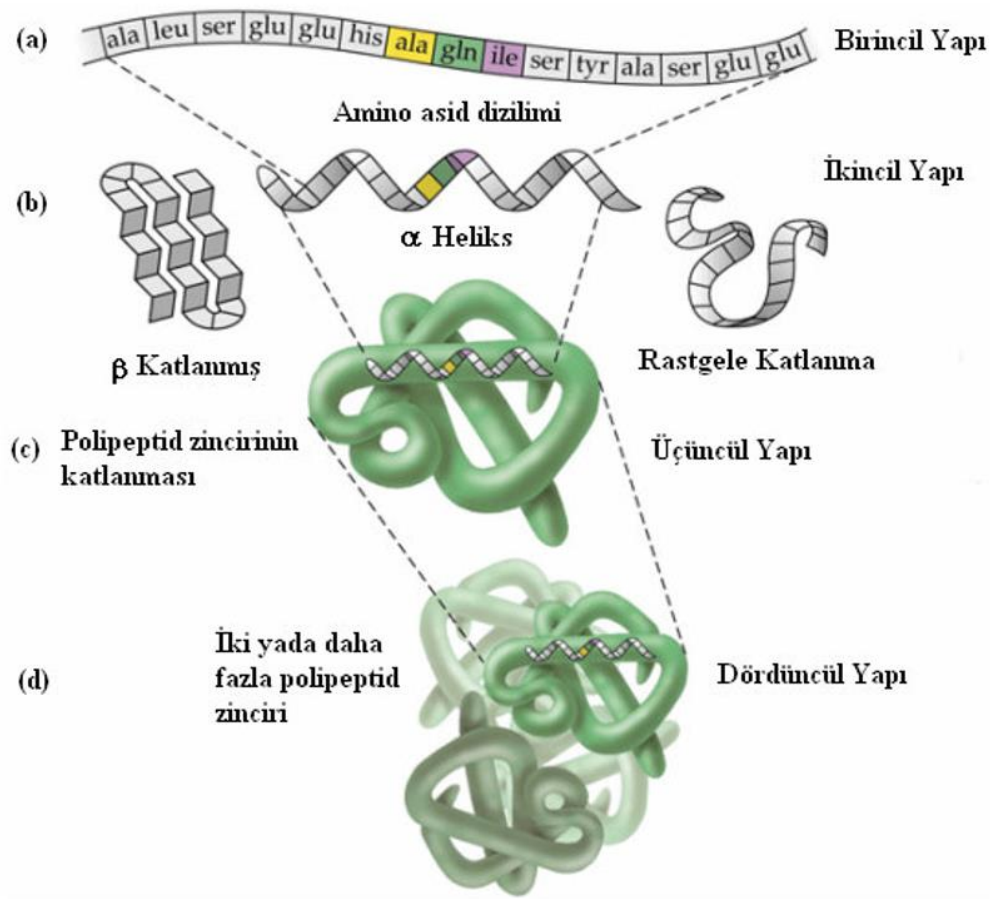
Amino asitlerin kimyasal özellikleri yan zincir niteliğine bağlıdır. Asidik amino asitler kimyasal özellikleri bakımından, bazik amino asitler, polar olan ve olmayan amino asitler olarak 4 farklı gruba ayrılır (Çizelge 2.2). Bu özellik hücrelerin birçok farklı biyokimyasal özelliğe sahip çok sayıda protein üretmesine olanak sağlar (Madigan ve Martinko, 2010).

Çizelge 2.1 Yaygın olarak bulunan 21 amino asidin adı ve kimyasal özelliği (Madigan ve Martinko, 2010).

Amino Asit Adı	Amino Asidin Kimyasal Özelliği
Gly Glisin (G)	Polar olmayan (hidrofobik)
Ala Alanin (A)	Polar olmayan (hidrofobik)
Val Valin (V)	Polar olmayan (hidrofobik)
Leu Lösin (L)	Polar olmayan (hidrofobik)
Ile İzölösün (I)	Polar olmayan (hidrofobik)
Met Metiyonin (M)	Polar olmayan (hidrofobik)
Phe Fenilalenin (F)	Polar olmayan (hidrofobik)
Trp Triptofan (T)	Polar olmayan (hidrofobik)
Pro Prolin (P)	Polar olmayan (hidrofobik)
Ser Serin (S)	Polar
Thr Treonin (T)	Polar
Asn Asparajin (N)	Polar
Gln Glutamin (Q)	Polar
Cys Sistein (C)	Polar
Sec Selenosistein (U)	Polar
Tyr Tirozin (Y)	Polar
Asp Aspartat (D)	Asidik
Glu Glutamat (E)	Asidik
Lys Lizin (K)	Bazik
Arg Arjinin (R)	Bazik
His Histidin (H)	Bazik

Proteinler temel olarak 2 sınıfta incelenir. Bunlar katalitik proteinler (enzimler) ve yapısal proteinlerdir. Katalitik proteinler hücrede meydana gelen birçok reaksiyonun katalizörü olarak işlev görürler. Buna karşılık yapısal proteinler zarları, duvarları ve

sitoplazmik bileşenleri oluşturmaktadırlar. Proteinler, birincil yapı, ikincil yapı, üçüncül yapı ve dördüncül yapıya sahip olabilirler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı (Derman, 2006)

Fosfoproteinler

Fosfoproteinler, ilk defa 1906 yılında Phoebus Levene tarafından vitellin proteininde fosfat grubu bulunmasıyla ortaya çıkmış, prostetik grubu fosforik asit olan proteinlerdir (Ası, 1995; Fischer ve Krebs, 1995; Kaynar, 2013). Protein fosforilasyonu, en çok çalışılan translayon sonrası modifikasyonlardandır. Protein fosforilasyonu, sinyal iletimi, hücre farklılaşması, hücre döngüsü kontrolü ve metabolizması gibi birçok protein fonksiyonu için hayati önem taşımaktadır. Protein fosforilasyonun en temel işlevi, protein aktivitesinin ya da hücresel yolağın açılıp kapanmasıdır. Günümüzde protein fosforilasyonu ile gerçekleştirilen tüm süreçler geri dönüşümlü ve kontrol edilebilirdir. Kontrol işlemi protein kinaz ve protein fosfatazlar tarafından

gerçekleştirilir. Fosforilasyonun hücrel faaliyetlerdeki öneminin anlaşılmasından bu yana çalışma konularının odak noktası olmuştur (Delom F. ve Chevet E., 2006)

2.9. Proteinlerin Karakterizasyonu

Proteinlerin karakterizasyonu genel olarak 4 aşamada oluşur. Moleküler ağırlığının belirlenmesi, pI değerinin belirlenmesi, üç boyutlu yapısının belirlenmesi ve amino asit sekansının belirlenmesidir. Amino asit sekansının belirlenmesi için protein izole edilir ya da kütle spektrofotometresi analizlerini içeren teknikler kullanılarak sekans dizilimi belirlenir.

2.9.1 Jel elektroforezi

Jel elektroforezi, makromolekülleri ayırmak ve tanımlamak için kullanılan, büyüklük, form veya izoelektrik noktaya dayanan yaygın kullanılan bir tekniktir. Moleküllerin elektroforez ile ayrılması, yüklü moleküllere bir elektrik uygulanması üzerine bir jel matrisinden geçtikleri tekniğe dayanmaktadır. Bu teknikler biyokimya, moleküler biyoloji, analitik kimya ve proteomik alanlarında temel bir araç haline gelmiştir (Descalzo ve ark., 2012).

2.9.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, 100 bp ila 25 kb aralığında değişen boyutlarda DNA' yı ayırmanın en etkili yoludur. Agaroz, deniz yosunu cinsi *Gelidium* ve *Gracilaria*' dan izole edilir ve tekrarlanan agarobioz (L ve D-galaktoz) alt birimlerinden oluşur. Jelleşme sırasında, agaroz polimerleri kovalent olmayan şekilde birleşir ve gözenek boyutları bir jelin moleküler eleme özelliklerini belirleyen bir yapı oluşturur. Agaroz jel elektroforezi kullanarak DNA' yı ayırmak için, taraklar yardımıyla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenen örneğe bir akım uygulanır. DNA molekülünün fosfat omurgası negatif olarak yüklenmiştir, bu nedenle bir elektrik alana yerleştirildiğinde, DNA pozitif yüke doğru taşınır. DNA, muntazam bir kütle / yük oranına sahip olduğu için DNA molekülleri, bir agaroz jeli içinde, kat edilen mesafe moleküler ağırlığına ters orantılı olacak şekilde ayrılır. Bir DNA molekülünün bir jelden geçiş hızı bazı nedenlere dayanmaktadır. Bunlar aşağıda ifade edilmiştir.

- Agaroz jelin konsantrasyonu,

- DNA molekülünün büyüklüğü,
- DNA konformasyonu,
- Uygulanan voltaj,
- Etidyum bromür varlığı,
- Agarozun türü ve
- Elektroforez tamponu.

Ayrıldıktan sonra, DNA molekülleri uygun bir boya (Etidyum bromür) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntülenir ve kullanılan DNA ladder ile okunur (Lee ve ark., 2012).

2.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Yaygın olarak poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) olarak adlandırılan bir poliakrilamid matrisine sahip proteinlerin jel elektroforezi, karmaşık proteinleri karakterize etmek için kullanılan en yaygın tekniklerden biridir. Proteinler, izoelektrik noktalarından farklı bir pH'a sahip olan bir ortamda bulunmaları durumunda net bir elektrik yüküne sahiptir ve bu nedenle bir elektrik akımına maruz kaldıklarında hareket edebilirler. Geçiş hızı, protein yükü ve kütlesi ile doğru orantılıdır. Kütle başına birim yük ne kadar yüksek olursa göç o kadar hızlı olur. Proteinler, nükleik asitler gibi tahmin edilebilir bir yapıya sahip değildir ve bu nedenle göç hızları farklıdır. Bir elektromotor kuvveti uygularken (izoelektrik noktalarındayken) göç edemezler. Bu durumlarda proteinler, yalnızca moleküler ağırlığa göre ayırmak için sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi bir deterjan ilave edilerek denatüre edilir. Bu tekniği (Shapiro ve ark. 1967) kullanmıştır. SDS, disülfid bağlarını kıran, proteini alt birimlerine ayıran ve ayrıca jel ile doğrudan boyutlarına göre geçmelerine izin veren negatif yük yükleyen bir indirgeyici maddedir. Ek olarak, denatürasyon, tersiyer yapılarını yitirmelerini sağlar ve bu nedenle göç hızı, tersiyer yapı ile değil, protein boyutu ile orantılıdır. Akrilamid jel elektroforez sistemleri bir veya daha fazla tampon kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu durumlarda sürekli fosfat tampon sisteminden (Osborn ve Weber, 1968) veya süreksiz tampon sistemlerinden (Davis, 1964; Ornstein, 1964) bahsedilir. Süreksiz sistemlerde, üst jel, tüm proteinlerin göçünü sağlar, bu da kuyuya yüklenen tüm numunenin birikmesine

neden olur. Gerçek ayırım, proteinlerin ikinci jel (alt jel) sınırına ulaştığı andan itibaren başlar ve devam eder (Lee ve ark., 2012).

2.9.4. İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroföresi (2D-PAGE)

Proteinler asit ve baz gibi davranmakta negatif ve pozitif iyon bağlama özellikleri bulunmaktadır. Protein molekülleri için farklı ve karakteristik özellikte olan R-gruplarının sayılarına ve elektriksel yüklerinin çeşitlerine bağlı izoelektrik noktaları bulunmaktadır. Proteinler, elektriksel alanda farklı hızlarda göç etmektedir. Bu göç, izoelektrik noktalarından düşük pH'larda katoda; izoelektrik noktalarından yüksek pH'larda anoda doğrudur. Proteinlerin elektriksel alanda göçme hızı, net elektrik yüklerine ve ortamın pH değerine bağlıdır. Bir protein, elektriksel alanda, izoelektrik noktasına eşit pH ortamında her iki kutup tarafından eşit kuvvetlerle çekildiğinden hareketsiz kalmaktadır (Ası, 1995).

İki boyutlu poliakrilamid jel elektroföresi (2D-PAGE), dokulardan, hücrelerden veya diğer biyolojik numunelerden elde edilen kompleks protein karışımlarının ayrılması için güçlü bir araç olarak kabul edilir ve binlerce proteinin tek bir jelde ayrılmasını sağlar. O'Farrell tarafından yapılan modifikasyon, 2D-PAGE tekniğinin 5000'e kadar proteini temsil eden noktaları çözmesine izin vermiştir ve protein lekelerinin yüksek doğrulukta ve hassas ayırmasını sağlamıştır. 2D-PAGE, temel olarak iki boyuttan oluşur; Birinci boyutta, protein molekülleri izoelektrik noktalarına (pI) bağlı olarak ayırır. Proteinlerin pH gradyanı altında ayrılması, izoelektrik odaklama (IEF) kullanılarak sağlanır. İkinci boyutta, protein ayırımı, SDS-PAGE (Laemmli, 1970) kullanılarak moleküler ağırlık temelinde dayanır. Farklı protein moleküllerinin aynı fizikokimyasal özelliklere (pI ve MW) sahip olması olanaksız olduğu için, proteinler verimli bir şekilde 2D-PAGE ile ayrılır. 2D-PAGE' in öne çıkan bir diğer özelliği, IEF jel şeridi SDS-PAGE jeline bağlandığında, birinci boyut ayırma sırasında elde edilen çözünürlüğün ikinci boyutta da devam etmesidir (Magdeldin ve ark., 2014).

2.10. Biyoremediyasyon Uygulama Örnekleri

Metallerin kirlettiği ortamda biyolojik giderme ve elüsyonun sınırlandırılması için *Ralstonia sp.* çökelti stabilizasyonu ve yüzey suyuna elüsyonun engellenmesi için önerilmektedir (Park ve ark., 2008).

Chatterjee ve ark. izole ettikleri kurşun dirençli suşların hem ağır metalle kirlenmiş lağım pisliklerinin hemde atık suların biyolojik olarak arıtılması için iyi ve etkili olduğu sonucuna varmıştır. A1suşu, kurşun iyileştirme mekanizması hala bilinmese de, A2 suşuna kıyasla kurşun iyileştirmede daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Chatterjee ve ark., 2012).

Atıksu arıtma merkezinden izole edilen *Aspergillus foetidus* mantarı kurşun toleranslı suşu takviye deneyleri ile saptanmış ve yüksek bir kurşun konsantrasyonuna dayanmıştır. Taramalı elektron mikroskobu ile kurşunun varlığını doğrulanmıştır. Hücre içi prolin seviyesi ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri, kurşun toksisitesinin ürettiği malondialdehit ve H_2O_2 ' yi detoksifiye etmek için belirli bir seviyeye yükselmiştir. Bu veriler, test suşunun alışılmadık derecede yüksek kurşun dozlarını ve yüksek kurşun alım potansiyelini tolere etmek için bazı doğal mekanizmalara sahip olduğunu göstermiştir (Chakraborty ve ark., 2013).

Naik ve ark., kurşuna dirençli bakterilerin yüksek kurşun seviyelerine direnç göstermesi için kullanılan farklı mekanizmalarının bulunduğunu ve bunların efeks mekanizma, hücre dışı sekestrasyon, biyosorpsiyon, çökeltme, hücre morfolojisinde değişiklik, arttırılmış yan kanal üretimi ve hücre içi kurşun biyoakümüülasyonu olduğunu bildirmiştir (Naik ve ark., 2013).

Taklamakan çölünden *Microvirga aerilata* ile yakından ilgili olduğunu ve bu nedenle *Microvirga aerilata* LM olarak adlandırılmış bakteri türünün etkili bir şekilde kurşun biriktirebildiğini ve hücre içi çökeltirer oluşturduğu bulunmuştur (Luo ve ark., 2014).

Hindistan, Ghaziabad' da *Enterobacter cloacae* izole edilmiş ve güçlü ağır metal biriktirme kapasitesi olduğu bildirilmiştir. Kurşun için 1100 ppm kullanılmış ve biyolojik birikim % 95,25 olarak kaydedilmiştir. Bu ağır metallerin varlığında az miktarda protein fazla eksprese edildiğinde gözlenmiştir (Banerjee ve ark., 2015).

2,4,5-triklorofenol (TCP) veya ağır metallerin (Cu, Cd, Cu + Cd) *Clitocybe maxima* ile topraklarda toplanması sağlanmış ağır metallerle ve TCP ile kirlenmiş toprağın biyolojik olarak iyileştirilmesi için *Clitocybe maxima*' nın iyi bir opsiyon olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Bassia scoparia ekilen kirli topraklar da kükürt seviyelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Petrol hidrokarbonları ve kükürtün *Bassia scoparia* tarafından

iyileştirilmesi için gösterilen potansiyel, ham yağ ile kirlenmiş kurak toprak topraklarının iyileştirilmesi için yararlı bir araç olabileceğini öne sürüyor (Moubasher ve ark., 2015).

Actinobacteria, *Firmicutes* ve *Alphaproteobacteria* temsilcileri izolatlar kültür ortamına eklenen tüm hidrokarbonları kullanabilmiş. Katekol 2,3-dioksijenaz, alkan dehidrojenaz ve hidroksilasyon dioksijenlerin polisiklik aromatik hidrokarbon halkalarının alfa alt biriminin primerleri kullanılarak izole edilen DNA' nın polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu, bilinen hidrokarbonları kullanabilen çeşitli izolatların genlerini sergilemediğini göstermiştir. Bu mikroorganizmalardaki bilinmeyen katabolik yolların varlığını ortaya koymuştur. Bulgular, tropik okyanus adaları kıyılarına bağlı mikrobiyotaların, kıyılarında petrol dökülmeleri gibi durumlarda çevresel rejenerasyona yardım etme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir (Rodriguez ve ark., 2015).

1,2-dikloroetan (DCA) bozundurucu bakteriler, sekans analizleri ile karakterize edildi. *Dehalococcoides spp.* ve *Desulfitobacterium spp.* olduğu belirlendi. İki bakteri büyümesinin DCA' nın indüklenebileceğini gösterdi (Wang ve ark., 2015).

Hindistan' da arseniğe maruz kalmış yer altı suyundan *Aneurinibacillus aneurinilyticus* ve *Bacillus sp.* izole edilmiş. 4500 ppm arsenit ve 550 ppm arsenat konsantrasyonunu tolere edebileceği görülmüştür. Bu iki mikroorganizma arseniğin daha az toksik madde olan arsenit okside dönüşmesini sağlamıştır (Dey ve ark., 2016).

Aspergillus niger Triton X-100' a karşı adsorpsiyon ve biyolojik bozunma, göstermiştir. *Aspergillus niger*, atık suyun biyolojik arıtımını sağlayabilmektedir (Ghunmi ve ark., 2016).

Kurşun ile kirlenmiş toprağın biyolojik olarak düzeltilmesi için *Rhodobacter sphaeroides* kullanılmıştır. *Rhodobacter sphaeroides*, kurşunu topraktan çıkarmamış, ancak özelliklerini değiştirmiştir. *Rhodobacter sphaeroides* kirli toprakta kurşun iyileştirme için ümit verici bir alternatif olmaya devam etmektedir (Li ve ark., 2016).

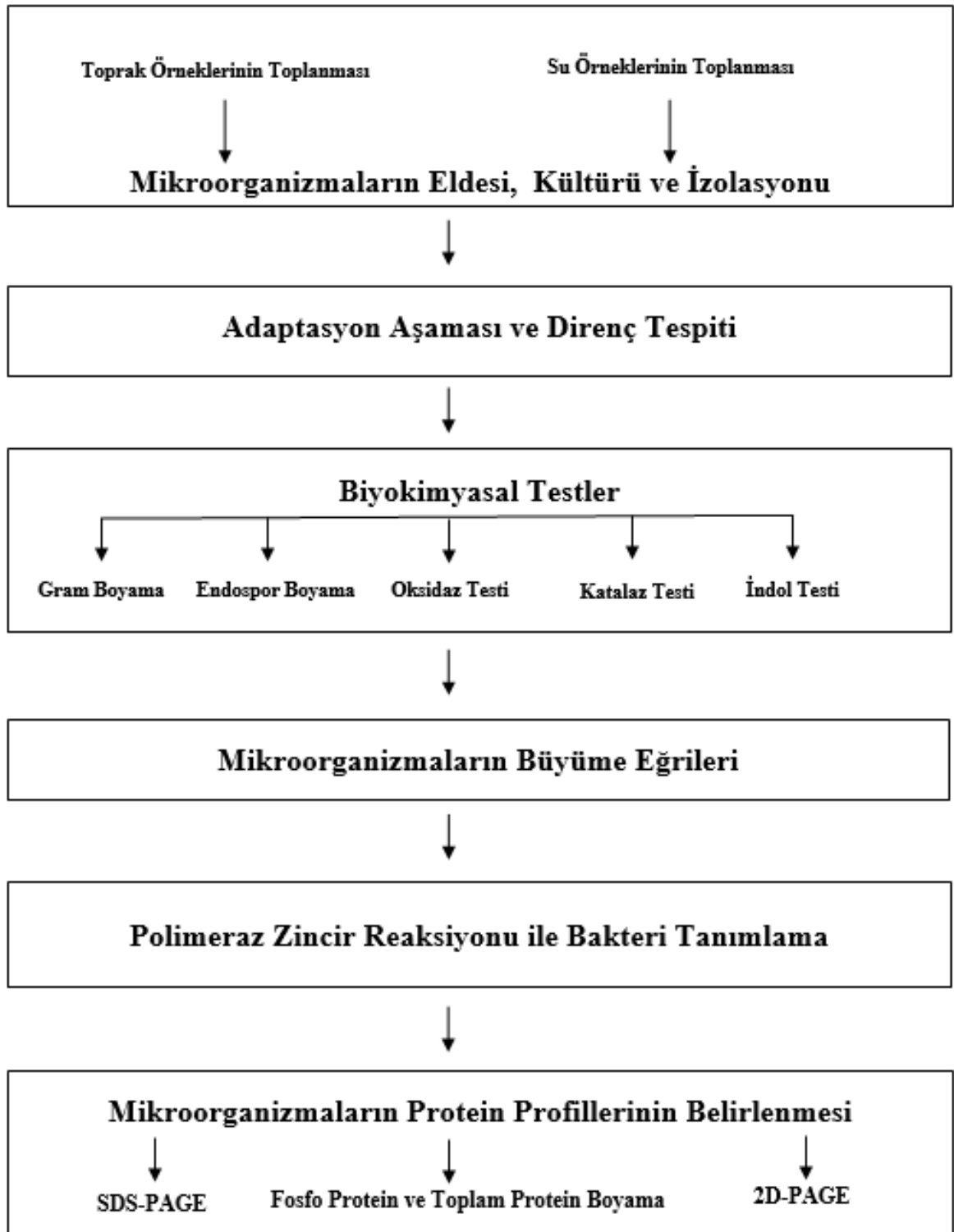
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan materyaller ve sarf malzemeler Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), şirketlerinden tedarik edilmiştir. Besiyelerinin, boyaların, çözeltilerin ve stok solüsyonların hazırlanmasına ait bilgiler Ek'ler kısmında verilmiştir.

3.2. Metot

Araştırmamızda 12.07.2017-24.09.2017 tarihleri arasında Karaman öp toplama merkezi, açık kanalizasyon, benzin istasyonu ve fabrika atık alanından toplanan su ve toprak numunelerinin mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada gerçekleştirilen süreçlerin akış şeması şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada uygulanan akış şeması

3.2.1. Mikroorganizmaların Eldesi, Kültürü ve İzolasyonu

Örnekler toprak ve sudan ayrı ayrı kurşun içerdiği bilinen endüstriyel atıkların depolandığı yerler olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Toprak Örneklerinin Toplanması

Toprak örnekleri: 1) Benzin istasyonu 2) Fabrika atık su alanları çevresi olmak üzere 2 farklı noktadan toplanmış ve kürek-spatül yardımıyla toprak yüzeyinin 10-15 cm altından örnekler alınmıştır.

Su Örneklerinin Toplanması

Su örnekleri: 1) Açık kanalizasyon kuyusu, 2) Çöp toplama merkezinin arıtmaya tabii tutulmamış sıvı biriktirme kuyusu olmak üzere 2 farklı noktadan toplanmış ve belirlenen bu noktalardan şırınga ve su şişeleri yardımıyla örnekler alınmıştır.

Çizelge 3.1 Örnek alım noktaları, tarihleri ve numune biçimi

Numune Alım Noktası	Numune Alım Tarihi	Numune Alımı
Karaman çöp toplama merkezi (37.1811- 33.2622)	12.07.2017	Su numunesi
	14.08.2017	
	23.09.2017	
Açık kanalizasyon (37.1747- 33.2752)	13.07.2017	Su numunesi
	15.08.2017	
	24.09.2017	
Benzin istasyonu (37.1177- 33.2778)	14.07.2017	Toprak numunesi
	16.08.2017	
	25.09.2017	
Fabrika atık alanı (37.2213- 33.3152)	15.07.2017	Toprak numunesi
	17.08.2017	
	26.09.2017	

Toplanan su ve toprak örnekleri laboratuvara getirilerek ekim ve izolasyon işlemlerine başlanmıştır.

Toplanan toprak ve su örnekleri 10^{-5} M kurşun konsantrasyonuna sahip Nutrient Agar (NA) besiyerlerine ekilmiştir. Ekilen besiyerleri farklı sıcaklıklara sahip (25, 30, 35, 40 °C) inkübatörlerde inkübasyona bırakılmıştır. Her gün çoğalmaları kontrol edilerek çoğalan mikroorganizmalar arasından, morfolojik farklılıklar gösterenler seçilerek

saflaştırılmak amacıyla çizme plak yöntemi kullanılarak taze besiyerlerine ekilmiştir. Tek koloni olarak çoğalan mikroorganizmalar tekrar taze besi yerlerine aktararak saf mikroorganizmalar elde edilmiştir.

3.2.2. Adaptasyon Aşaması ve Direnç Tespiti

Saflaştırılan mikroorganizmalar, 10^{-5} M kurşun konsantrasyonuna sahip NA besiyerine ekilerek inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları kontrol edilmiştir. Bu aşamada çoğalma kapasitelerine (koloni büyüklükleri) bakılarak mikroorganizmalar adaptasyon aşamasında kullanılmak üzere seçildi.

Seçilen mikroorganizmalar kurşun konsantrasyonu 10^{-5} M' dan 10^{-1} M' a kademeli olarak yükseltileen NA besi yerlerine ekilerek inkübe edilmiştir. Her aşama için aynı kurşun konsantrasyonuna sahip besi yerine 3 kez seri ekimleri yapılarak adaptasyonları sağlanmıştır. Üçüncü tekrarın sonunda çoğalabilen mikroorganizmalar bir sonraki kurşun konsantrasyonuna sahip besiyerine aktararak aşamalar tekrar edilmiştir. Kurşun konsantrasyonu 10^{-1} M olan besi yerinde çoğalan mikroorganizmalar kurşun biyoremediyasyonu için potansiyele sahip kabul edilmiştir.

3.2.3. Biyokimyasal Testler

Seçilen mikroorganizmalara gram boyama, endospor boyama, oksidaz-katalaz ve indol testleri yapılmıştır.

Gram Boyama

Kurşun biyoremediyasyonu için kullanılacak mikroorganizmalar NA besiyerine ekilmiş ve 24 saat 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda inkübatörden çıkarılan mikroorganizma lam üzerine alınmış ve steril distile su ile homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Lam pens yardımıyla 3 kez bunzen bek alevi üzerinden geçirilerek tespiti yapılmıştır. Hazırlanan preparata sırasıyla kristal viyole boya çözeltisi (1 dakika) eklenmiş ve distile suyla yıkanmıştır. Lugol çözeltisi (1 dakika) eklenmiş ve distile su, % 95' lik etanol ve tekrar distile su ile yıkanmıştır. Son olarak preparat karşıt boya olan safranin solüsyonu ile 30 saniye boyanıp su ile yıkanmıştır. Lam, kurutma kâğıdıyla kurutulduktan sonra ışık mikroskobunun 100 X objektifinde immersiyon yağı

damlatılarak incelenmiştir (Gram, 1884). Mor renkte görülen bakteriler gram pozitif, pembe renkte görülenler gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2).

Endospor Boyama

Kurşun biyoremediyasyonu için kullanılacak mikroorganizmalar lam üzerinde havada kurutulmuş ve pens yardımıyla 3 kez bunzen bek alevi üzerinden geçirilerek tespiti yapıldıktan sonra kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirilmiştir. Preparat % 5' lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile 5 dakika muamele edilmiştir. Preparat yıkanıp % 0,5' lik safranin ile 20-30 saniye boyanıp su ile yıkanmıştır. Lam, kurutma kâğıdıyla kurutulduktan sonra ışık mikroskobunun 100 X objektifinde immersiyeon yağı damlatılarak incelenmiştir.

Oksidaz Testi

Kurşun biyoremediyasyonu için kullanılacak mikroorganizmalar NA besiyeri yerine ekilmiş ve 24 saat 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Koloni üzerine indol ayırıcı damlatılmıştır. Üzerine ayıraç damlatılan kolonilerin 1-2 dakika içinde kırmızı mavi renk almaları pozitif oksidaz testi olarak kabul edilmiştir. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif oksidaz olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz Testi

Kurşun biyoremediyasyonu için kullanılacak mikroorganizmalar NA besiyeri yerine ekilmiş ve 24 saat 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Kolonilerinden platin öze yardımı ile yeterli miktarda mikroorganizma alınarak temiz ve yağsız bir lamın üzerine konulmuştur. Lam üzerine alınan koloninin üzerine % 3' lük hidrojen peroksitten bir damla damlatılmıştır. Hidrojen peroksit katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak derecelendirilmiştir.

İndol Testi

Kurşun biyoremediyasyonu için kullanılacak mikroorganizmalar Nutrient Broth (NB) besiyeri yerine ekilmiştir. Kültürlerin üzerine kovac's ayırıcından 0,5 mL ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın

oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu), sarımsı halkanın oluşması indolün oluşmadığını göstermiştir (negatif indol).

3.2.4. Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri

10^{-1} M kurşun içeren NA' da üreyebilen mikroorganizmalar için büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Büyüme eğrileri NB besi yerinde gerçekleştirilmiştir.

Seçilen mikroorganizmalar canlandırılmak ve sıvı besiyerine ekim yapılmak üzere 5 mL NB besi yeri bulunan cam tüplere her bir mikroorganizma için ayrı ayrı katı besiyerinden öze yardımıyla ekilmiş ve 18 saat boyunca 175 rpm ve 30 °C' ye inkübasyona bırakılmıştır.

18 saat sonunda inkübatörden çıkarılan mikroorganizmalar ilk olarak % 0,9' luk sodyum klorür (NaCl) solüsyonu kullanılarak 0,5 *McFarland* (1.5×10^8 KOB/mL)' a ayarlanmış ve 100 kat seyreltilmiştir. Seyrelme işlemleri tamamlandıktan sonra mikroorganizmalar 50 mL 10^{-3} M kurşun içeren NB içeren erlenlere paralelleriyle birlikte 250 µL ekilmiştir. Ekim yapılan erlenler ilk örnekler (250 µL) alındıktan sonra 175 rpm, 30 °C' ye inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan erlenlerden saat başı örnekler alınmış ve 600 nm' de ölçüm yapılmıştır. Ölçümler 35 saat aynı şekilde devam ettirilmiştir. Alınan örneklerle, kullanılan kurşunun oluşturduğu bulanıklığı önlemek amacıyla 3 M 150 µL hidroklorik asit (HCL) eklenmiştir.

ICP-MS ile Kurşun Miktar Tayini

Biyoremediyasyon aşamasında kullanılan mikroorganizmalar, kontrol ve 38 ppm kurşun içeren NB besi yerine ekilmiş ve optimum inkübasyon süreleri baz alınarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda alınan besiyerleri 22 µm boyuntundaki filtreden geçirilmiş ve süzüntü, besi yeri içinde bulunan kurşun miktarını belirlemek amacıyla ICP-MS ile ölçülmüştür (Çizelge 4.4).

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Bakteri Tanımlama

Araştırmada kullanılan mikroorganizmaların moleküler olarak tanımlanmak amacıyla koloni PZR yöntemiyle universal primerler (515F-Y ve 806R-B) kullanılarak bakterilerin 16S rRNA'nın V4 bölgesi hedeflenmiştir. PZR sonrasında çoğaltılan bölge

agaroz jel elektroforezinde kontrol edimiş ve elde edilen PZR ürünleri -20 °C’ de muhafaza edilerek sekanslamaya gönderilmiştir.

Reaksiyonun (Master mix’in) Hazırlanması

PZR’ı yapılacak her bir örnek için PZR ortamı hazırlanmış ve PZR içereği Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2 PZR karışım protokolü

PZR İçeriği	Miktarı (µL)
Steril distile su	34.25 µL
10X PZR buffer	5 µL
dNTP (2mM)	5 µL
Forward Primer	0,25 µL
Reverse Primer	0,25 µL
MgCl ₂ (25 µM)	4 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
Örnek	1 koloni
Toplam	50 µL

PZR işlemi için termal döngü cihazında laboratuvarımızda daha önce optimize edilen PZR yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan PZR yöntemi ve primerler Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler

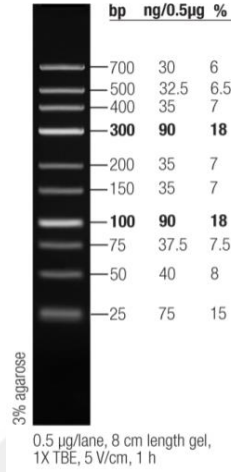
Hedef Bölge	V4																											
Primer Çiftleri	515f-Y & 806 R-B																											
Primer Dizileri	F: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA R: GGACTACNVGGGTWTCTAAT																											
Çoğaltılan Kısım	~ 250 Baz Çifti																											
PZR Protokolü	<table><tr><td>94°Cde</td><td>3 dk</td><td>İlk denatürasyon</td></tr><tr><td colspan="2">-----</td><td>1x</td></tr><tr><td>94°C de</td><td>45 sn</td><td>Denatürasyon</td></tr><tr><td>50°C de</td><td>60 sn</td><td>Bağlanma</td></tr><tr><td>72°C de</td><td>90 sn</td><td>Uzama</td></tr><tr><td colspan="2">-----</td><td>35x</td></tr><tr><td>72°C de</td><td>10 dk</td><td>Son uzama</td></tr><tr><td colspan="2">-----</td><td>1x</td></tr><tr><td colspan="3">4°C ‘ de bekleme</td></tr></table>	94°Cde	3 dk	İlk denatürasyon	-----		1x	94°C de	45 sn	Denatürasyon	50°C de	60 sn	Bağlanma	72°C de	90 sn	Uzama	-----		35x	72°C de	10 dk	Son uzama	-----		1x	4°C ‘ de bekleme		
94°Cde	3 dk	İlk denatürasyon																										
-----		1x																										
94°C de	45 sn	Denatürasyon																										
50°C de	60 sn	Bağlanma																										
72°C de	90 sn	Uzama																										
-----		35x																										
72°C de	10 dk	Son uzama																										
-----		1x																										
4°C ‘ de bekleme																												

Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünlerinin elektroforezi, % 3’ lük agaroz jelde (Ek 4) uygulanmıştır. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden ve sıcaklık 60 °C’ ye düştükten sonra 3 µL etidyum bromür eklenmiştir. Elektroforez jel tankı hazırlanarak içerisine kuyucuk oluşturmak üzere taraklar yerleştirilmiştir. Jel tankının içine yavaşça, kabarcık oluşturmadan döküldükten sonra jel katılaşana kadar (30 dakika-1 saat arası) beklenmiştir.

Jel tarakları çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın içerisine 1X TBE tamponu jelin üzerini 1-2 mm geçecek şekilde eklenmiştir. PZR örneklerinden 6 µL alınarak temiz bir parafilm üzerinde 4 µL 6x Loading Dye Solution (Ek 4) ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına 10 µL yüklenmiştir. DNA’nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna 3 µL ladder (Gene Ruler 25 bp DNA Ladder) yüklenmiştir. Gene Ruler 25 bp DNA Laddera ait cetvel Şekil 3.2’de verilmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmış ve 70 voltta da 45 dakika süre ile yürütme işlemi yapılmıştır. 45 dakikalık elektroforez

ardından jel elektroforez tankından dikkatlice alınarak ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, ABD) cihazı ile görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2 25 bp DNA Ladder'a ait cetvel (Thermo Scientific)

16S rDNA'nın Baz Sırasının Belirlenmesi ve BLAST Tarama

Sekans sonuçları elde edildikten sonra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adlı internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. BLAST (Basic Local Alingment Search Tool), aranan dizi sırasını (nükleotid) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, %-yaklaşım ve e-değerine göre veren bir bilgisayar programıdır. Eşleştirme (Alingment) sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ve e-değeri'ne göre belirlenmiştir.

3.2.6. Mikroorganizmaların Protein Profillerinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların protein profillerinin belirlenmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) gerçekleştirildikten sonra gümüş boyama (Blum ve ark., 1987), fosfoprotein boyama, total protein boyama ve iki boyutlu elektroforez (2DE) tekniği (O'Farrel ve Klose, 1975) kullanılmıştır. Çalışma, Mini Protean Tetra Cell (Biorad, ABD) ve PROTEAN®i12™Cell (Biorad, ABD) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlığı 5-250 kDa aralığında olan marker

proteinler (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi 150 V sabit voltaj altında gerçekleştirilmiştir.

Protein Eldesi ve Miktar Tayini

Seçilen mikroorganizmalar canlandırılmak ve sıvı besiyerine ekim yapılmak üzere 5 mL NB besi yeri bulunan cam tüplere her bir mikroorganizma için ayrı ayrı katı besiyerinden öze yardımıyla ekilmiş ve büyüme eğrileri göz önünde bulundurularak 175 rpm 30 °C' ye inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan mikroorganizmalar (her bir mikroorganizmadan 3 paralel ve 1 kontrol grubu olmak üzere) 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besi yerlerine $1,5 \times 10^8$ KOB/mL olacak şekilde ekilmiş ve 175 rpm, 30 °C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda besi yerleri 20,000 g' de 25 dakika 4 °C' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pelletler toplanarak sıvı azot ile öğütülmüştür. Öğütülen mikroorganizmalar 50 mM pH 7 sodyum fosfat (KH_2PO_4) tamponu (Ek 2) ile toplanmış ve 20,000 g' de +4°C' de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. Elde edilen süpernatantların üzerine 1:1 (H/H) oranında % 20 TCA-Aseton eklenmiş (Ek 2) ve çöktürme işlemi için + 4 °C' ye 1 gece bırakılmıştır. Gece sonu alınan örnekler 20,000 g' de +4 °C' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletler alınmış ve üzerlerine kullanılan % 20 TCA-Aseton miktarı ile aynı hacimde % 50 aseton (Ek 2) eklenmiştir. Pelletler çözdürüldükten sonra 20,000 g' de +4 °C' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve bu işlem seri şekilde 3 kez tekrarlanmıştır. Son aşamada elde edilen protein yeterli miktarda 50 mM pH 7 sodyum fosfat tamponu ile çözdürülmüştür.

Protein miktar tayininde bradford metodu kullanılmıştır (Bradford, 1976). Standart protein olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA' nın 1 mg/mL' lik standart çözeltisi hazırlanmış ve standart çözeltiler bu stoktan 0,01-0,5 mg/mL olacak şekilde, saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 0,05 mL eklenmiş, kör örneğe ise 0,05 mL sodyum fosfat tamponu koyulmuştur. Bütün tüplere 1,5 mL hazırlanan bradford çözeltisinden (Ek 2) eklenmiş, karıştırılmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra standartlar 595 nm dalga boyunda kör örneğe karşı okunmuştur. Protein standart grafiği, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir. Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğin analizi sonucu elde edilen denklemin formülünden hesaplanmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Mini-protean Tetra Cell (Biorad, ABD) elektroforez düzeneği ve Laemmli, (1970) metodu kullanılarak proteinler SDS-PAGE ile yürütülmüştür. Bunun için öncelikle % 12' lik alt jel ve % 4' lük üst jel örnek yüklemesi için hazırlanmıştır (Ek 5).

Yüklenecek protein miktarlarını eşitlemek amacıyla (son konsantrasyon 100 µg/µL) yükleme tamponu ile seyreltme işlemi yapılmıştır. Yükleme öncesinde proteinler 95°C' de 5 dakika kaynatılmış ve kuyucuklara 25 µL yüklenmiştir. İlk kuyucuğa 5 µL protein marker yüklenmiştir. SDS-PAGE elektroforez tankı yürütme tamponu ile uygun şekilde doldurulduktan sonra 150 V sabit akımda yürütülmüştür.

Elde edilen jeller gümüş boyama (Ek 7), toplam boyama ve fosfo protein boyama prosedürüne göre işleme tabii tutulmuştur. ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, ABD) cihazı ile görüntülenmiştir.

Fosfoprotein ve Toplam Protein Boyama

Fosfoprotein Boyama

SDS-PAGE sonrası elde edilen jeller 2 kez 100 mL fiksasyon çözeltisi (Ek 7) ile 30 dakika boyunca çalkalanarak fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası jeller 100 mL ultra saf su ile 10 dakika boyunca 3 kez çalkalanarak yıkanmıştır. Jelin tamamını kaplayacak yeterli phos-Tag™phosphoprotein jel boyası (40 ~ 60 mL) ile jel 60-90 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde boyanmıştır. Fazla boyayı uzaklaştırmak için 30 dakika boyunca yavaşça çalkalanması sağlanarak (P005B) Phos-Tag™ phosphoprotein boya uzaklaştırıcı çözelti ile jel 2 kez yıkanmıştır. Jeller her yıkamadan sonra 5 dakika ultra saf su ile yıkanmış ve yıkama işlemi sonunda jeller 300 nm UV transillüminator ile görüntülenmiştir.

Toplam Protein Boyama

Fosfo protein boyama sonrası elde edilen jeller görüntülendikten toplam protein boyama yapılabilmesi için 5 dakika boyunca ultra saf su ile 2 kez yıkanmıştır. eLuminol™ protein jel boya çözeltisi (40~60 mL) ile jel 45 saniye mikrodalgada fırında tutulmuş (500 Watt) ve 15 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrar

edilmiştir. Jel 100 mL yıkama çözeltisi (Ek 4) ile 30 dakika yıkanmış ve 300 nm UV transillüminator ile görüntülenmiştir.

İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektrofrez (2D-PAGE)

2D-PAGE izoelektrik odaklama için yüklenecek örneklerin protein konsantrasyonları 20 µg/µL olacak şekilde rehidrasyon tamponu (Ek 6) ile ayarlanmıştır. Pasif rehidrasyon için pH 3-10 arasındaki stripler yürütülecek protein örnekleri üzerine hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiş ve striplerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde mineral yağı eklenmiştir. Pasif rehidrasyonun tamamlanması için stripler 16 saat boyunca 27 °C’ de bekletilmiştir. Rehidrasyon sonrasında (PROTEAN®i12™Cell)’ de yürütülmüştür (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 İzoelektrik odaklama protokolü

Adımlar	Voltaj	Değişim Hızı	µAmp	Zaman	Birim
1	200	Hızlı	100	0:10	HH:MM
2	500	Hızlı	100	0:01	HH:MM
3	4000	Doğrusal	100	2:00	HH:MM
4	4000	Hızlı	100	10000	Volt Hr

Yürütme sonrasında stripler ilk olarak 1. Dengeleme tamponunda (Ek 6) sonrasında 2. Dengeleme tamponu (Ek 6) ile 15’ şer dakika çalkalanarak dengelenmiştir. Dengeleme işlemi sonunda stripler 1X yürütme tamponu (Ek 6) ile 2 kez yıkanarak 2. boyutta yürütülmek amacıyla dikey elektroforez jeli üzerine yerleştirilmiştir. Üzerine % 1 agoroz jel (Ek 6) dökülüp 100 voltta sabit akımda yürütülmüştür. Yürüme tamamlandıktan sonra elde edilen jel gümüş boyama prosedürüne göre işleme tabii tutulmuş ve ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, ABD) cihazı ile görüntülenmiştir.

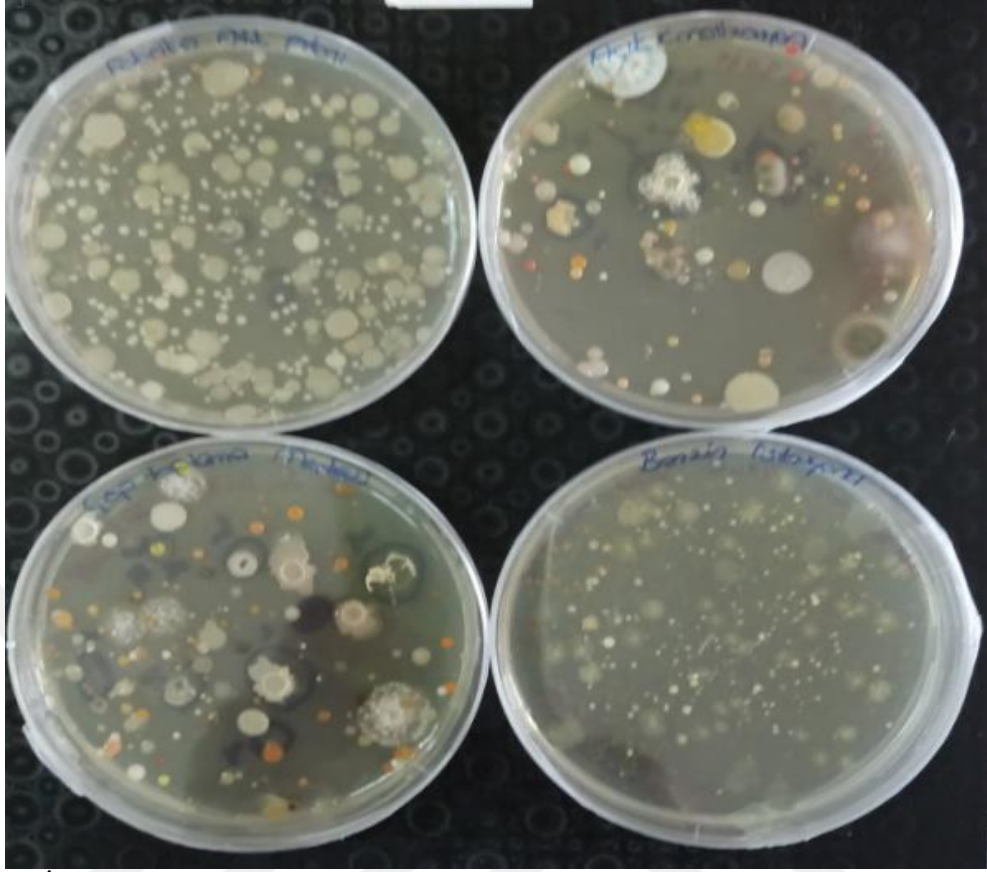
4. BULGULAR

Bu çalışmada kurşun ağır metalinin biyoremediyasyonuna yönelik mikroorganizma izolasyonu, adaptasyonu ve adaptasyon sağlayan mikroorganizmaların protein profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

4.1. Mikroorganizmaların Eldesi, Kültürü ve İzolasyonu

Çalışma kapsamında dört farklı ortamdan farklı tarihlerde 3 kez su ve toprak numuneleri alınarak toplamda 12 örnek, mikroorganizma eldesi için toplanmıştır. Numunelerin alındığı alan, tarih ve numune alımı Materyal ve Metod bölümü Çizelge 3.1 verilmiştir.

Toplanan örnekler kurşun ağır metale toleranslı mikroorganizmaların tespiti amacıyla öncelikle 10^{-5} M kurşun konsantrasyonuna sahip NA besi yerlerine ekilmiştir. Bu besi yerleri farklı sıcaklıklara sahip (25, 30, 35, 40 °C) inkübatörlerde inkübasyona bırakılmıştır. Her gün çoğalmaları kontrol edilerek çoğalan mikroorganizmalar arasından koloni büyüklüğü, üreme süresi baz alınarak 13 adet mikroorganizma seçilmiştir (Şekil 4.1). Seçilen mikroorganizmalar saflaştırılmak üzere çizme plak, yayma plak yöntemleri uygulanarak taze besi yerlerine ekilmiştir. Elde edilen tek koloniler tekrar kurşun ağır metali içeren taze besi yerlerine aktarılarak hem kurşun ağır metale karşı toleransları kesinleştirilmiş hem de saf mikroorganizmalar elde edilmiştir. Elde edilen mikroorganizmalara izole edildikleri alana göre kod verilmiştir. Topraktan izole edilen mikroorganizmalar TPRK, sudan izole edilen mikroorganizmalar SU olarak kodlanmıştır. Kodların yanında bulunan numaralar ise izolasyon sırasını belirtmek amacıyla yazılmıştır.



Şekil 4.1 İzole edilecek kültürlerin NA besiyerinde petri görüntüleri

İzolasyon aşamasında elde edilen mikroorganizmaların, alım noktaları, büyüme sıcaklığı, renk, koloni büyüklüğü ve üreme süreleri Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolasyon aşamasında elde edilen mikroorganizmalar ve morfolojik özellikleri

MİKROORGANİZMA KODU	BESİ ORTAMI	SICAKLIK	GÜN	NUMUNE ALIM NOKTASI	KOLONİ BÜYÜKLÜĞÜ	RENK
TPRK1	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	2 gün	Fabrika atık alanı	0,1 cm	Beyaz
TPRK2	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Fabrika atık alanı	0,4 cm	Kırmızı
TPRK3	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Benzin istasyonu	0,1 cm	Beyaz
TPRK4	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	3 gün	Fabrika atık alanı	0,3 cm	Sarı
TPRK5	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	1 gün	Benzin istasyonu	0,2 cm	Beyaz
SU1	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Açık kanalizasyon	0,3 cm	Yeşil
SU2	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	4 gün	Çöp toplama merkezi	0,1 cm	Krem rengi
SU3	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	3 gün	Açık kanalizasyon	0,1 cm	Beyaz
SU4	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	1 gün	Açık kanalizasyon	0,2 cm	Turuncu
SU5	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	35 °C	1 gün	Çöp toplama merkezi	0,3 cm	Beyaz
SU6	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Çöp toplama merkezi	0,2 cm	Krem rengi
SU7	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	2 gün	Çöp toplama merkezi	0,1 cm	Sarı
SU8	10 ⁻⁵ M kurşun içeren NA	30 °C	2 gün	Açık kanalizasyon	0,1 cm	Pembe

İzolasyon aşamasında üreme süresi kısa ve koloni büyüklüğü fazla olan mikroorganizmalar (Çizelge 4.1 koyu olarak belirtilenler) adaptasyon ve direnç tespiti için seçilmiştir.

4.2. Adaptasyon Aşaması ve Direnç Tespiti

Mikroorganizmaların kurşun ağır metale karşı adaptasyonlarını sağlamak amacıyla her bir mikroorganizma kurşun derişimi aşamalı olarak artırılan besi yerlerine ekilmiştir. Her aşamada mikroorganizmanın adaptasyon sağladığından emin olmak adına aynı kurşun konsantrasyonuna sahip katı besi yerlerine 3 kez seri ekim yapılmıştır. Her üç ekimde de benzer üreme profili (morfolojik ve üreme süresi) gösteren mikroorganizmalar bir sonraki aşamaya geçirilmiştir. Bir önceki aşamada seçilen 6 mikroorganizma başlangıç kurşun konsantrasyonu 10^{-5} M olacak şekilde NA besi yerine uygun çoğalma koşulları baz alınarak inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü tekrar sonunda çoğalabilen mikroorganizmalar bir sonraki kurşun konsantrasyonuna sahip katı besi yerlerine aktarılmış ve aşamalar 10^{-1} M' a kadar devam ettirilmiştir.

Seçilen mikroorganizmaların tamamı 10^{-4} M kurşun konsantrasyonuna ait NA besi yerlerinde adaptasyon göstererek 3. ekim sonrasında bir sonraki aşamaya geçirilmiştir. 10^{-3} M kurşun konsantrasyonuna ait besi yerlerinde TPRK5, SU5 ve SU6 kodlu mikroorganizmalar çoğalma gösteremediği için bir sonraki aşama için seçilmemiştir. SU4 kodlu mikroorganizmada ise pigmentasyon kaybı ve üreme süresinde uzama gözlemlendiği için bir sonraki kurşun konsantrasyonuna aktarılmamıştır. 10^{-1} M kurşun konsantrasyonuna kadar çoğalma gösteren mikroorganizmalar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Biyoremediyasyon uygulamasında kullanılacak mikroorganizmalar

KOD	BESİ ORTAMI	SICAKLIK	GÜN	NUMUNE ALIM NOKTASI	KOLONİ BÜYÜKLÜĞÜ	RENK
TPRK2	10^{-5} M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Fabrika atık alanı	0,4 cm	Kırmızı
SU1	10^{-5} M kurşun içeren NA	30 °C	1 gün	Açık kanalizasyon	0,3 cm	Yeşil

4.3. Biyokimyasal Testler

Adaptasyon aşamasında elde edilen TPRK2 ve SU1 kodlu mikroorganizmalar katı besiyerlerine tekrar ekilmiş ve gram reaksiyonları, oksidaz, katalaz ve indol testleri yapılmıştır. Test sonuçları Çizelge 4.3’ te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Biyoremediyasyon uygulamasında kullanılacak mikroorganizmaların biyokimyasal test sonuçları

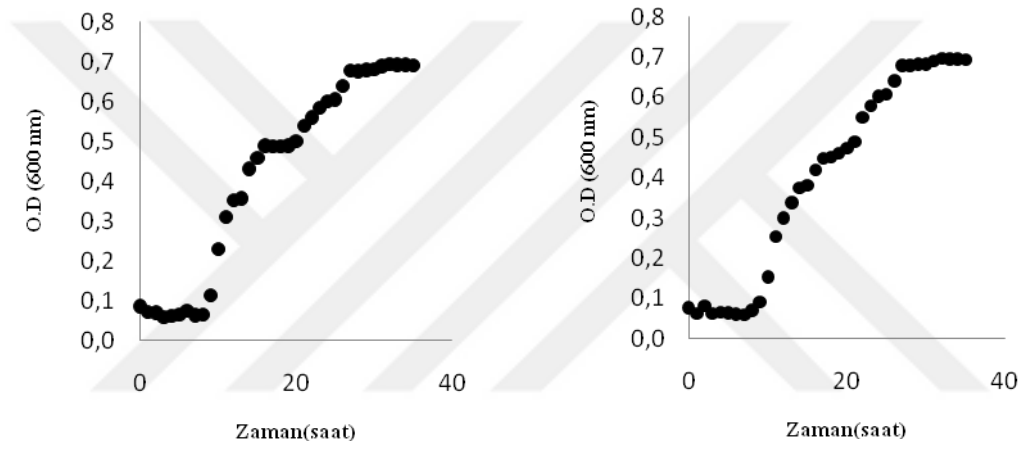
KOD	Besiyeri Adı	Endospor Boyama	Gram Boyama	Şekil	Oksidaz	Katalaz	İndol
TPRK2	NA	Yapılmadı	Gram negatif	Kok	Negatif	Pozitif	Negatif
SU1	NA	Sporsuz	Gram negatif	Basil	Pozitif	Pozitif	Negatif

4.4. Mikroorganizmaların Büyüme Eğrileri

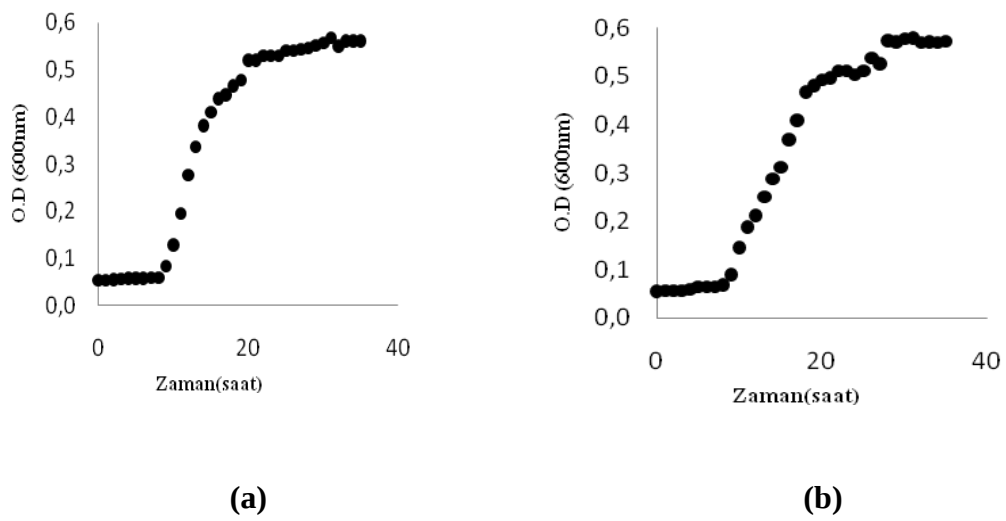
Adaptasyon aşamasında seçilen ve biyokimyasal testler uygulanan TPRK2 ve SU1 kodlu mikroorganizmalar büyüme eğrilerinin oluşturulması amacıyla NB besi yerlerine ekilmiştir. Büyüme eğrileri kurşunsuz besiyeri (kontrol) ve 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besi yerlerine ekilerek 35 saat süresince 1 saatlik periyotlarla örnekler alınmış ve spektrofotometrede O.D 600 nm’ de ölçümleri yapılarak büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.2 Mikroorganizmaların kurşunlu ve kurşunsuz besi yerindeki görüntüleri



Şekil 4.3 TPRK2 büyüme eğrisi a (kontrol), b (kurşunlu)



Şekil 4.4 SU1 büyüme eğrisi a (kontrol), b (kurşunlu)

ICP-MS ile Kurşun Miktar Tayini

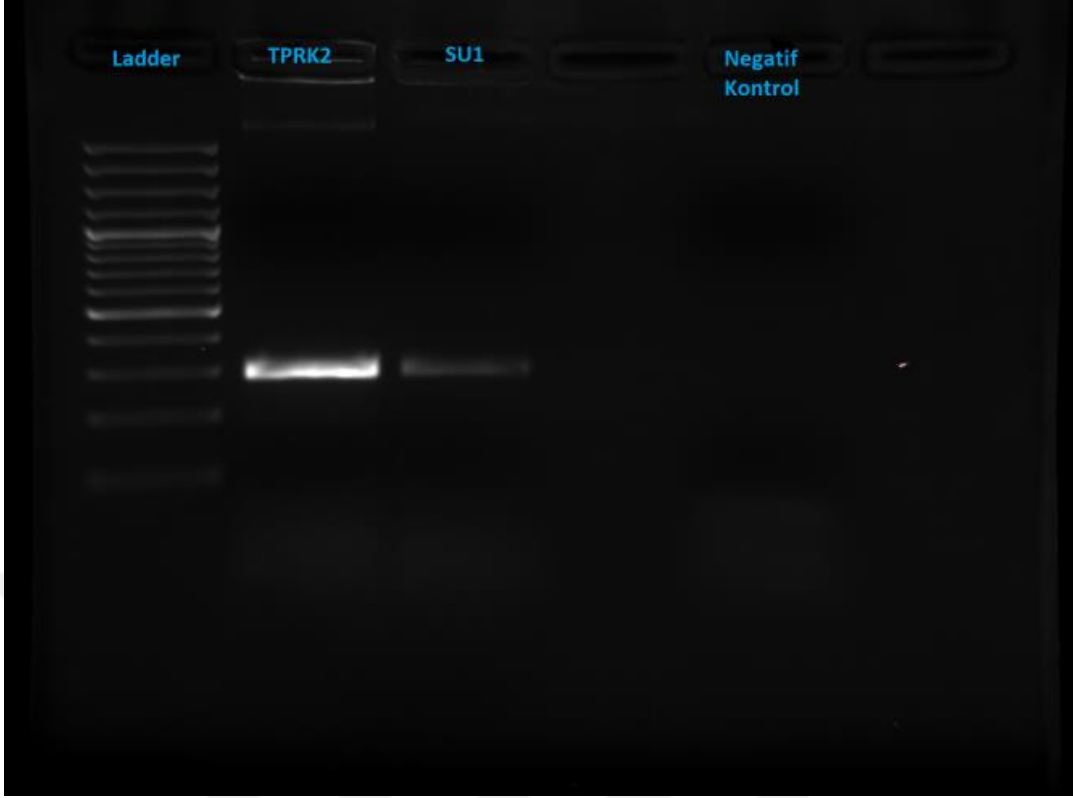
TPRK2 kodlu mikroorganizma bulunduğu ortamdaki kurşunun % 76,3' ünü ortamdan alıp ortamın ağır metal konsantrasyonunu düşürürken, SU1 kodlu mikroorganizmanın % 63,1' ini ortamdan aldığı tespit edilmiştir. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4 ICP-MS ölçüm sonuçları

Mikroorganizma/ Ölçüm (mg/L)	TPRK2	SU1
Başlangıç Kons. (mg/L)	38	38
Besiyerinde Kalan Miktar (mg/L)	8,923 ± 0,05	14,48 ± 0,05
Yüzde (%)	% 76,3	% 63,1

4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Mikroorganizma Tanımlama

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen 2 mikroorganizmayı moleküler seviyede tanımlanmak için koloni PZR yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle her bir mikroorganizma için NA besi yerine çizme plak yöntemi kullanılarak ekimi yapılan 24 saatlik taze, saf mikroorganizma kültürü elde edilmiştir. Saf mikroorganizma kültüründen doğrudan alınan koloniler PZR ortamına konularak koloni PZR tekniği kullanılmıştır. Uygun universal primerler (515F ve 806R) kullanılarak 16S rRNA' ya ait V4 değişken bölgesinde bulunan DNA parçası amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonunda koloni PZR' nin doğruluğunu göstermek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmış ve koloni PZR' de elde edilen ürünlere ait bantların agaroz jeldeki görüntüleri mikroorganizmalara verilen kodlara göre kaydedilmiştir (Şekil 4.5). Agaroz jelde kullanılan 25 bp DNA ladder' a göre değerlendirildiğinde DNA boyutlarının yaklaşık 300 bp olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Koloni PZR' a ait agaroz jel elektroforezinde bant görüntüsü

Amplifike olmuş ürünler sekanslama sonrasında Bioedit programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bioedit programı Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır. Her bir mikroorganizmaya ait sekans dizisi ve Gen Bankası'ndan elde edilen sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

İontek firmasına gönderilen ürünler yaklaşık 300 bp uzunluktadır. Bu uzunlukta ürünün 1 primer seti (forward ve reverse) kullanılarak okunması durumunda yöntem kaynaklı olarak arada okunmamış bölgeler oluşmaktadır. Reverse primerle elde edilen sekansın bir kısmının forward primer ile okunan sekansla eşleştirilmesi çalışmanın güvenilirliği açısından çok önemlidir. Bu nedenle PZR ürününün mümkün olan en uzun sekans dizisinin elde edilmesi amacı ile dizi analizleri iki farklı primer (515F ve 806R) kullanılarak yaptırılmıştır. Bioedit programında mikroorganizmalara ait ileri ve geri sekans sonuçları birleştirilerek her strain için tek bir sekans dizisi oluşturulmuştur. Bu işlem yapılırken aynı zamanda primerlerin ortak belirlediği sekanslar da eşleştirilerek kontrolü sağlanmıştır. Sekans sonuçlarının başında verilen kod numaraları çalışmamızda elde ettiğimiz sekans dizilerinin birleştirilmesi işlemi sırasında çıkan sekansımızla en yüksek benzerliğe sahip Gen Bankasına kayıtlı olan sekansın accession

(kayıt) numarasıdır. Mikroorganizmalara ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu Şekil 4.6' da verilmiştir.

TPRK2 kodlu mikroorganizmanın blast sonucu okutulduğunda anlamlı bir veri elde edilememiştir.

Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [NR_117678.1](#) Length: 1527 Number of Matches: 2

Range 1: 511 to 753 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	2e-120	240/243(99%)	1/243(0%)	Plus/Minus
Query 295	TTTCGACCTCAGTG-CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC	353		
Sbjct 753	TTTCGCACCTCAGTGTCAAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC	694		
Query 354	TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT	413		
Sbjct 693	TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT	634		
Query 414	CAGTAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAA	473		
Sbjct 633	CAGTAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAA	574		
Query 474	CCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACC	533		
Sbjct 573	CCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACC	514		
Query 534	GCG 536			
Sbjct 513	GCG 511			

Şekil 4.6 SU1 kodlu mikroorganizmaya ait 16S rRNA'nın kısmi sekans dizisinin blast sonucu

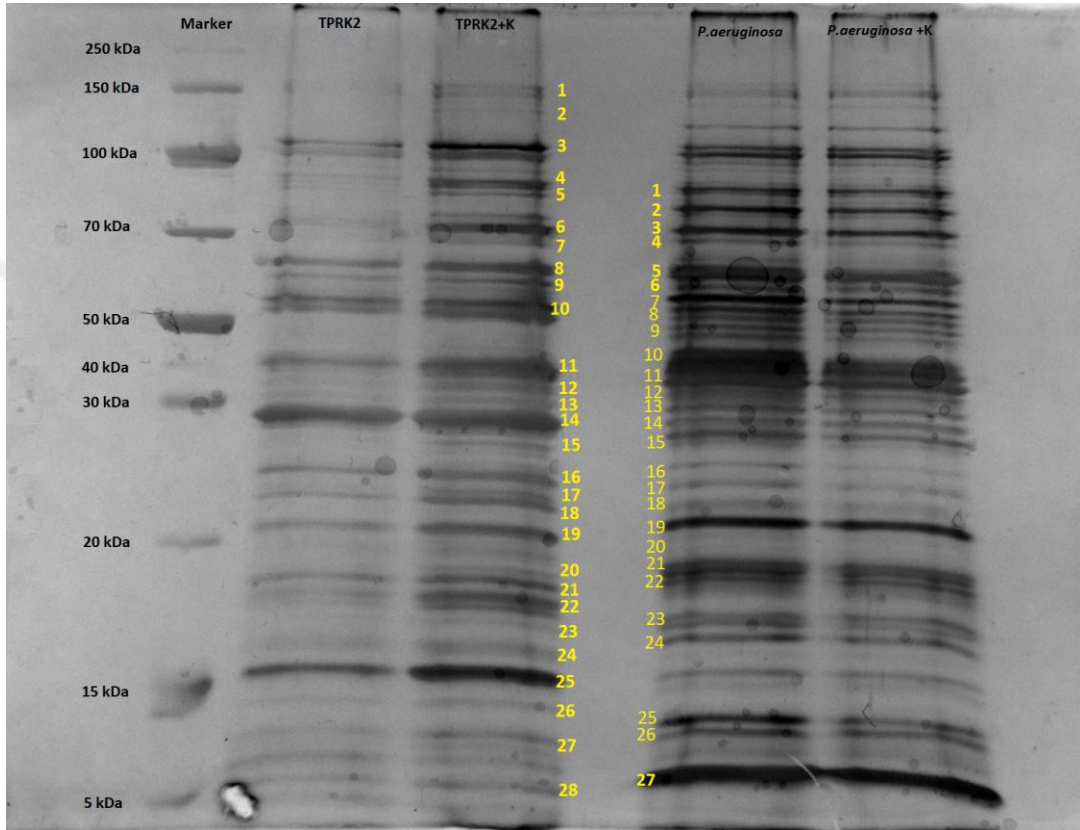
SU1 kodlu mikroorganizma % 99 oranında NR117678.1 accession numaralı *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 ile benzerlik gösterdiği için, bu mikroorganizma *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmıştır.

4.6. Mikroorganizmaların Protein Profillerinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların protein profillerinin belirlenmesi amacıyla her bir mikroorganizmadan 3 paralel ve 1 kontrolden olmak üzere elde edilen proteinler SDS-PAGE' de yürütülmüştür. Gümüş boyama, fosfo protein boyama ve toplam protein boyama metodları kullanıldı, daha detaylı analiz için proteinler İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezinde yürütülmüştür.

Proteinlerin SDS-PAGE Profillerinin Eldesi

Proteinler SDS-PAGE’ de yürütüldükten sonra jel gümüş boyama prosedürüne tabii tutulup görüntüler elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 TPRK2 ve *P. aeruginosa*’ ya ait SDS-PAGE protein profilleri
Kuyucuklarda sırasıyla (soldan sağa) Marker (5-250 kDa), TPRK2 (kontrol), TPRK2+K (kurşunlu), *P. aeruginosa* (kontrol), *P. aeruginosa* +K (kurşunlu).

TPRK2 ve *P. aeruginosa*’ nın SDS-PAGE’ de elde edilen protein profilleri karşılaştırıldığında mikroorganizmalar arasında benzerlik ve farklılıklar gözlenmiştir. 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa, ~65 kDa, ~55 kDa ve ~22 kDa da bulunan protein bantlarının her iki mikroorganizmada olduğu görülmüştür. Buna karşılık TPRK2’ nin kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerde bant yoğunluğu artarken, *P. aeruginosa* proteinlerinde bant yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir.

TPRK2’ nin kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerin bantlarında yoğunluklar referans alındığında 28 adet farklı protein bandı tespit edilmiştir. Kurşunlu besi yerinden elde edilen protein bantları genel olarak daha yoğun olmakla birlikte 1, 2

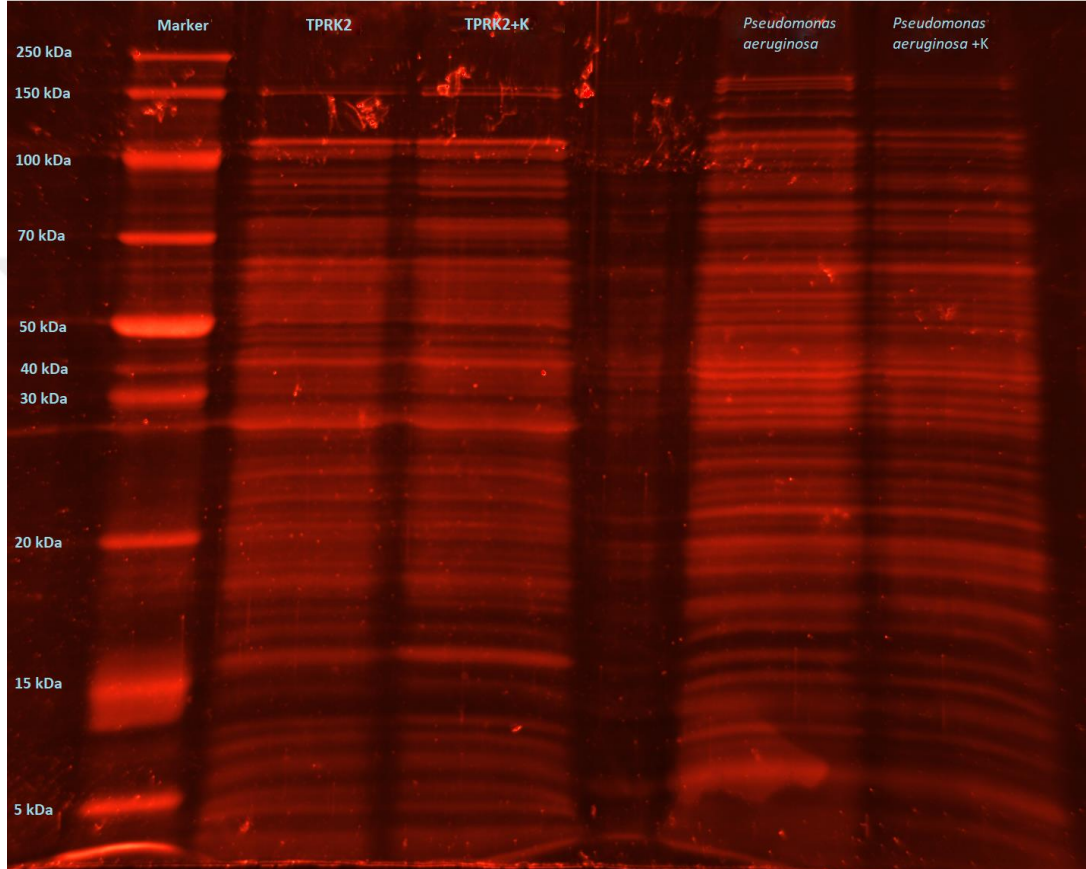
ve 14 numaralı protein bantlarında daha az 3, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27 ve 28 numaralı protein bantlarında daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 17, 20 ve 23 numaralı protein bantları sadece kurşunlu besi yerine ait kuyucukta gözlenmiştir.

TPRK2' de 28 adet protein bandı elde edilirken *P. aeruginosa* 'nın kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerin bantlarında, yoğunluklar referans alındığında 27 adet farklı protein bandı tespit edilmiştir.

P. aeruginosa 'nın kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerin bantları karşılaştırıldığında, 1 numaradan 27 numaraya kadar işaretlenmiş protein bantlarında farklılıklar gözlenmiştir. İşaretli olan tüm protein bantlarının *P. aeruginosa* 'nın kontrolünden elde edilen proteinlerin yüklendiği kuyucukta yoğunluğun daha fazla olduğu gözlenmiştir.

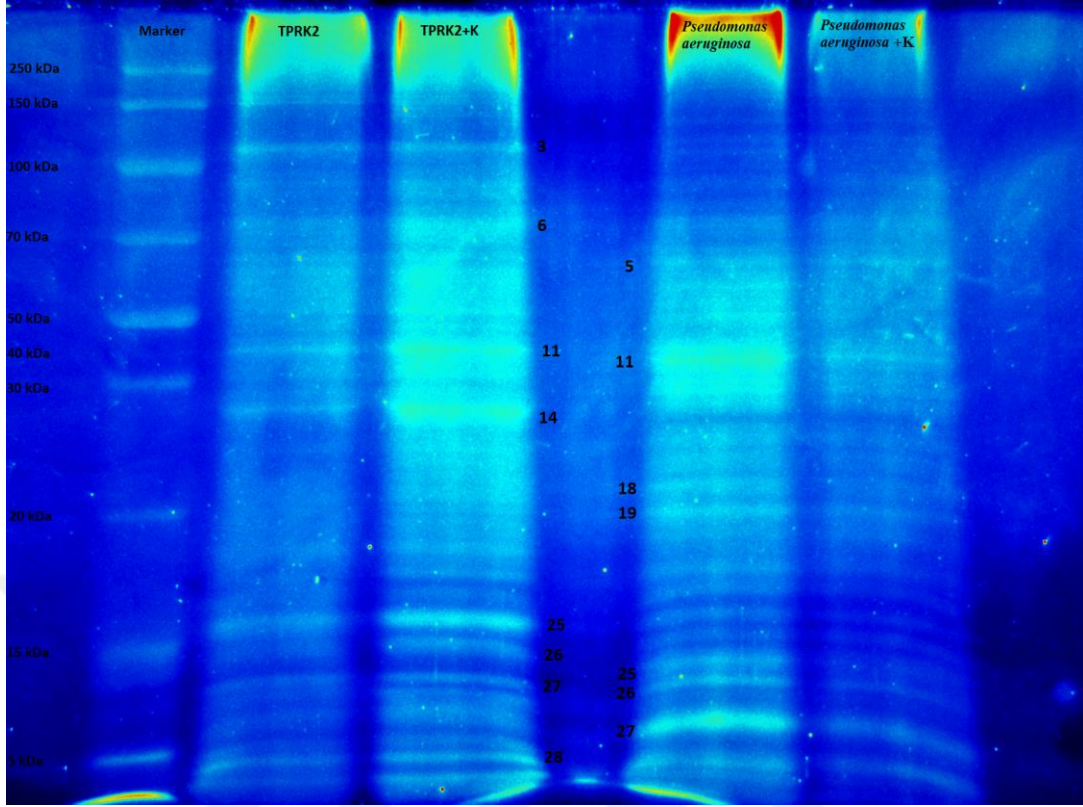
Toplam Protein ve Fosfo Protein Boyama

Toplam protein boyama sonucunda belirlenen bantlar SDS-PAGE gümüş nitrat boyama sonucu ile örtüşmektedir.



Şekil 4.8 TPRK2 ve *P. aeruginosa*' ya ait SDS-PAGE toplam protein profilleri
Kuyucuklarda sırasıyla (soldan sağa) Marker (5-250 kDa), TPRK2 (kontrol), TPRK2+K (kurşunlu), *P. aeruginosa* (kontrol), *P. aeruginosa* +K (kurşunlu).

Toplam protein bantları (Şekil 4.8) ve SDS-PAGE bantları (Şekil 4.7) karşılaştırıldığında jellerde kullanılan boyaların hassiyeti sebebiyle bant profilleri aynı olmakla beraber protein bant yoğunluklarında farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.9 TPRK2 ve *P. aeruginosa*' ya ait SDS-PAGE fosfo protein profilleri
Kuyucuklarda sırasıyla (soldan sağa) Marker (5-250 kDa), TPRK2 (kontrol), TPRK2+K (kurşunlu), *P. aeruginosa* (kontrol), *P. aeruginosa* +K (kurşunlu).

TPRK2' nin kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen fosfoprotein bantları SDS-PAGE (Şekil 4.7)' e göre numaralandırılmıştır ve 8 adet fosfoprotein gözlenmiştir. TPRK2' nin kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen fosfoprotein bantları karşılaştırıldığında her iki kuyucukta da fosfoprotein varlığı tespit edilmiştir. TPRK2' nin kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerin yüklendiği kuyucukta bulunan fosfoprotein yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmiştir.

TPRK2' nin kurşunlu besi yerinden elde edilen proteinlerin yüklendiği kuyucukta bulunan 6, 11, 14, 25 ve 28 numaralı bantlar karşılaştırıldığında fosfoprotein yoğunluklarının, 3, 26 ve 27 numaralı fosfoprotein bantlarının yoğunluğundan daha fazla olduğu gözlenmiştir.

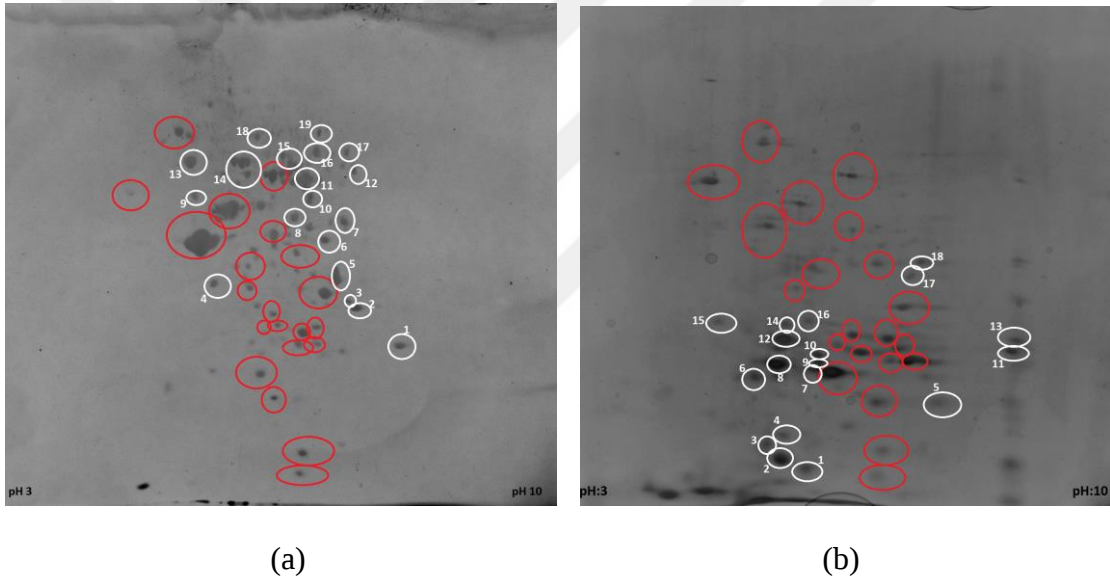
P. aeruginosa ' nın kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen fosfoprotein bantları SDS-PAGE (Şekil 4.7)' e göre numaralandırılmış ve 7 adet fosfoprotein gözlenmiştir. *P. aeruginosa* ' nın kontrol ve kurşunlu besi yerinden elde edilen fosfoprotein bantları karşılaştırıldığında her iki kuyucukta da fosfo protein varlığı tespit edilmiştir. *P.*

aeruginosa’nın kontrolünden elde edilen proteinlerin yüklendiği kuyucukta bulunan fosfoprotein yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmiştir.

P. aeruginosa’nın kontrolünden elde edilen proteinlerin yüklendiği kuyucukta bulunan 11, 18, 19, 25, 26 ve 27 numaralı bantlar karşılaştırıldığında fosfoprotein yoğunluklarının, 5 numaralı fosfoprotein bandının yoğunluğundan daha fazla olduğu gözlenmiştir.

2D-PAGE

2D-PAGE sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Görüntülerin analizi sonrasında spotlar Çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.10 TPRK2 kodlu mikroorganizmanın NB besi yerinde 2D-PAGE görüntüsü (a), TPRK2 kodlu mikroorganizmanın 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besi yerinde 2D-PAGE görüntüsü (b)

Kırmızı halka içinde bulunan protein spotları her iki jelde bulunmaktadır. Beyaz halka içinde bulunanlar ise tek jelde karşılaşılan protein spotlarıdır.

Şekil 4.10’a bakıldığında (a) ve (b) 21 adet aynı protein spotu tespit edilmiştir. Bu protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirilmiş ve aşağıda ifade edilmiştir.

Aynı protein spotlarının değerlendirilmesi

8 kDa pH 7, 10 kDa pH 7, 16 kDa pH 6,5, 17 kDa pH 6,5, 19 kDa pH 7’de iki adet protein spotu, 20 kDa pH 7, 21 kDa pH 7, 21 kDa pH 6,5’te iki adet protein spotu, 22

kDa pH 6,5, 25 kDa pH 7-7,5, 25 kDa pH 6, 27 kDa pH 6, 28 kDa pH 7, 35 kDa pH 5,5, 40 kDa pH 6,5, 45 kDa pH 6, 50 kDa pH 4,5, 65 kDa pH 6,5, 80 kDa pH 5-5,5 arasında aynı protein spotları gözlenmiştir.

Aynı protein spotlarının 2 jel üzerindeki protein yoğunluklarının değerlendirilmesi aşağıda verilmiştir.

8 kDa pH 7, 10 kDa pH 7, 35 kDa pH 5,5, 45 kDa pH 6 ve 65 kDa pH 6,5 bulunan protein spotları karşılaştırıldığında Şekil 4.10.a' da bulunan protein spotlarının yoğunluklarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

16 kDa pH 6,5, 17 kDa pH 6,5, 19 kDa pH 7, 20 kDa pH 7, 21 kDa pH 6,5' te iki adet protein spotu, 22 kDa pH 6,5, 25 kDa pH 7-7,5, 28 kDa pH 7, 40 kDa pH 6,5, 50 kDa pH 4,5 ve 80 kDa pH 5-5,5 arasında bulunan protein spotları karşılaştırıldığında Şekil 4.10.b' de bulunan protein spotlarının yoğunluklarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

19 kDa pH 7, 21 kDa pH 7, 25 kDa pH 6 ve 27 kDa pH 6' da bulunan protein spotları karşılaştırıldığında Şekil 4.10.a ve Şekil 4.10.b' de bulunan protein spotlarının yoğunluklarının eşit miktarda olduğu tespit edilmiştir.

Cizelge 4.5 TPRK2' nin 2D-PAGE aynı protein spotlarının karşılaştırılması

pH/ Moleküler Ağırlık (kDa)	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7
8 kDa						●
10 kDa						●
16 kDa					●	
17 kDa					●	
19 kDa						● ●
20 kDa						●
21 kDa					● ●	●
22 kDa					●	
25 kDa				●		●
27 kDa				●		
28 kDa						●
35 kDa			●			
40 kDa					●	
45 kDa				●		
50 kDa	●					
65 kDa					●	
80 kDa		●				

Siyah spotlar 4.10 (a)' da bulunan ve miktar olarak yoğun olan spotlardır.

Kırmızı spotlar 4.10 (b)' de bulunan ve miktar olarak yoğun olan spotlardır.

Sarı spotlar 4.10 (a) ve 4.10 (b)' de bulunan ve miktar olarak eşit olan spotlardır.

Farklı (Şekil 4.10.a) protein spotlarının değerlendirilmesi

İki jel karşılaştırıldığında (Şekil 4.10.a) 19 adet adet farklı protein tespit edilmiştir. Tespit edilen protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirilmiş ve aşağıda ifade edilmiştir.

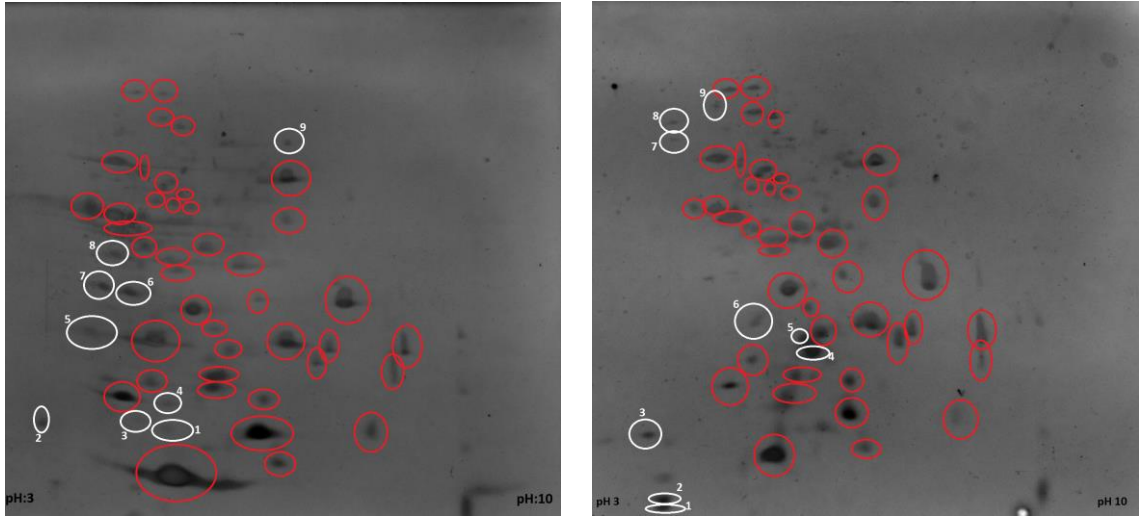
19 kDa pH 8,5, 25 kDa pH 7,5, 26 kDa pH 7,5 27 kDa pH 5,5, 28 kDa pH 7,5, 37 kDa pH 7, 40 kDa pH 7,5, 43 kDa pH 7, 50 kDa pH 5,5 ve pH 7, 55 kDa pH 7, 57 kDa pH 7,5, 65 kDa pH 5,5, 67 kDa pH 6,5, 69 kDa pH 7 ve 7,5, 70 kDa pH 6,5, 72 kDa pH 7 olmak üzere 19 adet farklı protein spotu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

İki jel karşılaştırıldığında (Şekil 4.10.b) 18 adet adet farklı protein tespit edilmiştir. Tespit edilen protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirilmiş ve aşağıda ifade edilmiştir.

Çizelge 4.6 TPRK2 kodlu mikroorganizma' nın (solda kontrol, sağda kurşunlu) 2D-PAGE farklı protein spotlarının karşılaştırılması

Moleküler Ağırlık (kDa)	pH Aralığı (3-10)	Moleküler Ağırlık (kDa)	pH Aralığı (3-10)
19 kDa	8,5 (1)	8 kDa	6 (1)
25 kDa	7,5 (2)	10 kDa	5,5 (2)
26 kDa	7,5 (3)	12 kDa	5,5 (3)
27 kDa	5,5 (4)	14 kDa	5,5 (4)
28 kDa	7,5 (5)	16 kDa	8 (5)
37 kDa	7 (6)	17 kDa	5,5 (6)
40 kDa	7,5 (7)	18 kDa	6 (7)
43 kDa	7 (8)	19 kDa	5,5 (8) ve 6,5 (9)
50 kDa	5,5 (9) ve 7 (10)	20 kDa	6,5 (10) ve 9 (11)
55 kDa	7 (11)	22 kDa	5,5 (12) ve 9 (13)
57 kDa	7,5 (12)	24 kDa	5,5 (14)
65 kDa	5,5 (13) ve 6 (14)	26 kDa	5 (15) ve 6 (16)
67 kDa	6,5 (15)	28 kDa	7,5 (17)
69 kDa	7 (16) ve 7,5 (17)	29 kDa	7,5 (18)
70 kDa	6,5 (18)		
72 kDa	7 (19)		

8 kDa pH 6, 10 kDa pH 5,5, 12 kDa pH 5,5, 14 kDa pH 5,5, 16 kDa pH 8, 17 kDa pH 5,5, 18 kDa pH 6, 19 kDa pH 5,5, 19 kDa pH 6,5 20 kDa pH 6,5 ve pH 9, 22 kDa pH 5,5-6 arası ve pH 9, 24 kDa pH 5,5-6 arası, 26 kDa pH 5 ve pH 6, 28 kDa pH 7,5 ve 29 kDa pH 7,5 olmak üzere 18 adet farklı protein spotu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).



(a)

(b)

Şekil 4.11 *P. aeruginosa*'nın NB besi yerinde 2D-PAGE görüntüsü (a), *P. aeruginosa*'nın 10^{-3} M kurşun ağır metali içeren NB besi yerinde 2D-PAGE görüntüsü (b)
Kırmızı halka içinde bulunan protein spotları her iki jelde bulunmaktadır. Beyaz halka içinde bulunanlar ise tek jelde karşılaşılan protein spotlarıdır.

Şekil 4.11' e bakıldığında (a) ve (b) 41 adet aynı protein spotu tespit edilmiştir. Bu protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirildi ve aşağıda ifade edilmiştir.

Aynı protein spotlarının değerlendirilmesi

7 kDa pH 5,5, 13 kDa pH 6,5-7 arasında, 15 kDa pH 3, 15 kDa pH 6,5 ve pH 8' de, 16 kDa pH 4,5 ve 6,5' de, 17 kDa pH 5-6' da, 18 kDa pH 6-8,5' de, 18 kDa pH 7,5, 19 kDa pH 5, 6, 7, 7,5 ve 8,5' de, 21 kDa pH 5,5, 22 kDa pH 7,5-8 arası, 25 kDa pH 5-5,5 arası, 26 kDa pH 5-5,5 arası ve 6,5, 35 kDa pH 4,5, 37 kDa pH 7, 40 kDa pH 4-4,5, 50-51 kDa pH 5-5,5 arası 5' li protein spot, 55 kDa pH 7, 60 kDa pH 4,5-5, 88 kDa pH 5,5, 90 kDa pH 4,5, 100 kDa pH 4,5-5' te aynı protein spotları gözlenmiştir.

Aynı protein spotlarının 2 jel üzerindeki protein yoğunluklarının değerlendirilmesi aşağıda verilmiştir.

7 kDa pH 5,5, 15 kDa pH 6,5, 16 kDa pH 4,5, 17 kDa pH 6' da, 18 kDa pH 6 ve 22 kDa pH 7,5-8 arasında bulunan proteinler karşılaştırıldığında Şekil 4.11.a' da bulunan protein spotlarının yoğunluklarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

15 kDa pH 3, 16 kDa pH 6,5, 90 kDa pH 4,5 ve 100 kDa pH 4,5-5' te bulunan proteinler karşılaştırıldığında Şekil 4.11.b' de bulunan protein spotlarının yoğunluklarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

13 kDa pH 6,5-7 arasında, 15 kDa pH 8' de, 17 kDa pH 5, 18 kDa pH 8,5' de, 18 kDa pH 7,5, 19 kDa pH 5, 6, 7, 7,5 ve 8,5' de, 21 kDa pH 5,5, 25 kDa pH 5-5,5 arası, 26 kDa pH 5-5,5 arası ve 6,5, 35 kDa pH 4,5, 37 kDa pH 7, 40 kDa pH 4-4,5, 50-51 kDa pH 5-5,5 arası 5' li protein spot, 55 kDa pH 7, 60 kDa pH 4,5-5 ve 88 kDa pH 5,5' te bulunan protein spotları karşılaştırıldığında Şekil 4.11.a ve Şekil 4.11.b' de bulunan protein spotlarının yoğunluklarının eşit miktarda olduğu tespit edilmiştir.



Çizelge 4.7 *P. aeruginosa*'nın 2D-PAGE aynı protein spotlarının karşılaştırılması

pH/ Moleküler Ağırlık (kDa)	pH 3	pH 4	pH 4,5	pH 5	pH 5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8
7 kDa				●						
13 kDa							● ●			
15 kDa	●									●
16 kDa			●				●			
17 kDa				●		●				
18 kDa						●			●	●
19 kDa				●		●		●	●	●
21 kDa					●					
22 kDa									●	
25 kDa				●						
26 kDa				●			●			
35 kDa			●							
37 kDa								●		
40 kDa		●	●							
50-51 kDa				●						
55 kDa								●		
60 kDa			●							
88 kDa					●					
90 kDa			●							
100 kDa			●	●						

Siyah spotlar 4.11 (a)'da bulunan ve miktar olarak yoğun olan spotlardır.

Kırmızı spotlar 4.11 (b)'de bulunan ve miktar olarak yoğun olan spotlardır.

Sarı spotlar 4.11 (a) ve 4.11 (b)'de bulunan ve miktar olarak eşit olan spotlardır.

Farklı (Şekil 4.11.a) protein spotlarının değerlendirilmesi

İki jel karşılaştırıldığında (Şekil 4.11.a) 9 adet farklı protein tespit edilmiştir. Tespit edilen protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirilmiş ve aşağıda ifade edilmiştir.

15 kDa pH 5,5, 16 kDa pH 3 ve 4,5, 17 kDa pH 5,5, 20 kDa pH 4, 23 kDa pH 4,5, 24 kDa pH 4, 26 kDa pH 4,5 ve 70 kDa pH 7 olmak üzere 9 adet farklı protein spotu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

İki jel karşılaştırıldığında (Şekil 4.11.b) 9 adet farklı protein tespit edilmiştir. Tespit edilen protein spotları kDa ve pH cinsinden değerlendirilmiş ve aşağıda ifade edilmiştir.

Çizelge 4.8 *P. aeruginosa* ‘nın (solda kontrol, sağda kurşunlu) 2D-PAGE farklı protein spotlarının karşılaştırılması

Moleküler Ağırlık (kDa)	pH Aralığı (3-10)
15 kDa	5,5 (1)
16 kDa	3 (2) ve 4,5 (3)
17 kDa	5,5 (4)
20 kDa	4 (5)
23 kDa	4,5 (6)
24 kDa	4 (7)
26 kDa	4,5 (8)
70 kDa	7 (9)

Moleküler Ağırlık (kDa)	pH Aralığı (3-10)
4 kDa	4 (1)
5 kDa	4 (2)
15 kDa	3 (3)
20 kDa	6 (4)
22 kDa	5,5-6 arası (5)
23 kDa	5 (6)
70 kDa	4 (7)
75 kDa	4 (8)
80 kDa	5 (9)

4 kDa pH 4, 5 kDa pH 4, 15 kDa pH 3, 20 kDa pH 6, 22 kDa pH 5,5-6 arası, 23 kDa pH 5, 70 kDa pH 4, 75 kDa pH 4, 80 kDa pH 5 olmak üzere 9 adet farklı protein spotu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik olarak "kurşun" metali ifadesinin karşılığı "kurşun (II)" iyonudur ve redoks reaksiyonlarına doğrudan katılmamaktadır. Bu nedenle, lipid peroksidasyonuna yol açan ve hücrelerde reaktif türlerin oluşumuna etki eden kurşun, kurşunun biyolojik moleküllere bağlanarak ya reaktif türler üreten bir prosesi aktif hale getirmesinden ya da normal olarak reaktif türleri söndüren redoks enzimleri inhibe etmesinden kaynaklanan dolaylı bir eylem olmalıdır (Maret, 2017).

Civa, kadmiyum veya talyum ile karşılaştırıldığında kurşun, toksikolojide daha önemli bir konudur çünkü kurşun (Pb) yeryüzünde doğal olarak bulunduğu kadar bol olanda bir elementtir. İnsan etkinlikleri sebebiyle çevrede erken kullanımlarından kaynaklı olarak kurşun miktarı hızla artmıştır (Patterson, 1965). Jeolojik kayıtlara göre, toprağın orijinal değerinden (0,4 ng Pb / m³) en az 100 kat artış gerçekleşmiştir. Ölçümlere göre, yoğun nüfuslu ve sanayileşmiş bölgelerde kurşun değeri artık 500 ila 10.000 ng Pb / m³tür (Wixson ve Davies, 1993; Nriagu, 1998). 2012 yılında dünya çapındaki kurşun üretimi 10 milyon tona ulaşmıştır (Anonim, 2019). Tüm metallerde olduğu gibi, iki ana üretim yolu vardır. Kurşun maden cevherinden elde edilen birincil üretim elbette tüm kurşunların orijinal kaynağıdır, ancak geri dönüştürülmüş ürünlerden veya üretim sürecinden kaynaklanan kalıntılardan geri kazanıldığı ikincil üretimde çok önemlidir. İkincil kurşun üretimi şimdi dünya genelinde üretilen tüm kurşunların yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Kurşunun ABD'de % 80'inden fazlası, Avrupa'da ise % 60'ından fazlası ikincil üretimden elde edilmektedir (Anonim, 2019). Ancak, tüm geri dönüşüm çabalarına rağmen ya çevrede ya da organizmalarda yolculuğunu tamamlamaktadır. Diğer bir ifadeyle, endüstriyelleşme ile birlikte tükettiğimiz yiyecekler, içtiğimiz su ve soluduğumuz hava aracılığıyla insanlar ve diğer canlılar Pb'ye maruz kalmaktadır (Maret, 2017).

Pb'nin herhangi bir maruziyet eşik değeri belirlenmemiş olup, tamamen toksik kabul edilmektedir. Kurşun genel olarak kemikte birikmesine rağmen (yarı ömrü 30 yıldır) farklı fizyolojik ve patofizyolojik nedenlerle mobilize olabilmektedir. Yetişkinlerde, kurşuna maruz kalmanın kronik etkileri arasında yüksek tansiyon, kanser gelişimi ve daha yakın zamanda önerildiği gibi nörodejenerasyon bulunur. Çocuklar özellikle

maruz kalma riskine karşı savunmasızdır ve öğrenme yeteneğini ve davranışını etkileyen geri dönüşü olmayan nörolojik zararlara maruz kalırlar (Maret, 2017).

Kurşun ve bileşikleri, boyalarda, bazı kristal camların imalatında, cam sırlamalarında, seramik ve çömlekçilikte ve bazı kalaylama işlemlerinde de kullanılmaktadır (Barwinska-Sendra ve Waldron, 2017) Asitli içecekler veya yiyeceklerle birlikte kullanıldığında kurşun bu malzemelerden serbest hale gelmektedir. Kurşun nanopartiküller, çeşitli uygulamalar için kurşun içeren malzemeler üreten yeni bir alandır ve sağlığımız için potansiyel olarak yeni bir tehdit oluşturmaktadır (Maret, 2017).

Kurşun zehirlenmesine dair bilgiler 6000 yıldan daha eski bir kayıta geçmesinin yanında daha yakın zamanlarda en büyük sanatçıların bazılarında (Montes-Santiago, 2013) hastalığın veya hatta ölümün nedeni olduğunda kayıtlarda mevcuttur (Nriagu, 1983; Lessler, 1988). Kurşun zehirlenmesi ayrıca saturnizm (Saturn kurşunu ilk bulup adlandıran kişi) veya plumbizm (plumber: kurşun işçisi) ve boyadan kaynaklanan zehirlenmelerden dolayı ressam koliği olarakta bilinmektedir (Maret, 2017).

Endüstriyel hijyen, gelişmiş ülkelerde önemli ölçüde iyileşmiş olsa da, ciddi kirlilik sorunları devam etmektedir. Kurşunun toksisitesi hakkındaki bilginin çok uzun bir geçmişe dayanmasına rağmen, ne yazık ki, insanın kurşuna maruz kalması sorun olmaya devam etmektedir. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) toksik bir maddenin maksimum kabul edilebilir oral dozu olan RfD'nin (referans dozu) olamayacağını ifade ederek, kurşun için güvenli maruz kalma sınırının olmadığı sonucuna varmıştır (Maret, 2017).

Pb (II) 'nin bazı sistemik ve hücrel metabolizma yolları bilinmekle birlikte, δ -aminolevulinat dehidratazdaki etkisi dışında, moleküler toksikolojisi spesifik hedefler bakımından büyük ölçüde kanıtlanmamıştır. En çok üzerinde durulan ve kanıtlanmış olan mekanizmalarından birisi çinko proteinlerinde fonksiyonel sonuçları olan çinkonun kurşun ile değişmesidir. Kalsiyum bağlayıcı proteinler de olası hedefler olarak tartışılmaktadır. Ancak, kurşunun proteinlerin içindeki kalsiyum bölgelerine olan afinitesi, çinko bölgelerine göre daha düşüktür (Maret, 2017).

Kurşun (Pb), Kadmiyum (Cd), cıva (Hg) ve talyum (Tl) gibi önemli toksisiteye sahip metaller periyodik tablonun bir alanında kümelenirler. Bu metallere en yakın metal çinko (Zn) esansiyel besindir. Toksisitesi yüksek olan bu elementlerin paylaştığı bir

kimyasal özellik tiyofilisiteleridir, yani ligandların kükürt verici atomları için yüksek bir afiniteye sahip olmalarıdır. Bu metallerin sülfidlerinin çözünürlük sabitleri ($-\log K$): CdS: 27; HgS: 52; Tl₂S: 22; PbS: 28-29' dur. Bizmut (Bi) için bu değer daha da yüksektir (Bi₂S₃: 96). Karşılaştıracak olursak, ZnS'nin değeri 25'tir. Bununla birlikte, kadmiyum ve kurşunun kükürt için benzer afiniteleri olmasına rağmen, insanlardaki toksik etkileri birbirinden farklıdır (Maret ve Moulis, 2013). Çinkoya göre kadmiyum ve kurşunun ligand donörleri için afinitelerini karşılaştırdığımızda, azot koordineli ortamlar için Cd < Pb < Zn, oksijen koordineli ortamlar için Cd < Zn < Pb ve kükürt koordineli ortamlar için Zn < Cd < Pb' dir (Martin, 1987). Dolayısıyla, üç metal arasında kurşun, oksijen ve kükürt koordineli ortamlarda afinitesi daha yüksek olan metaldir (Maret, 2017).

Bakterilerde Pb detoksifikasyon üç temel yöntemden birisi ile gerçekleşir: hücre içi çöktirme, atım (efflux: hücre dışına atma) ve bazı durumlarda Pb²⁺ nin organik kurşun bileşiklere metilasyonundan oluşur (Jarosławiecka ve Piotrowska-Seget, 2014). Pb' nin hücre içerisinde çöktirme yöntemi genel olarak fosfat ile bileşik oluşturması şeklinde gerçekleşir ve yaygın bir ayrıştırma (Pb'nin hücre içerisinde diğer metallerden ayrıştırılması) mekanizması olarak işlev gördüğü düşünülmektedir ve çöktirilen kurşun fosfat tuzu genellikle türe özgüdür. Örneğin, *Staphylococcus aureus*, hücre içi Pb'yi Pb₃(PO₄)₂ (Levinson, 1998) olarak çöktirirken, *Vibrio harveyi*, hücre içi Pb'yi Pb₉(PO₄)₆ olarak ayrıştırır (Mire ve ark., 2004). *Burkholderia cepacia*, Pb'yi Pb₅(PO₄)₃⁺¹ olarak ayrıştırır (Templeton ve ark., 2003) Farklı hücre içi Pb fosfat türleri, muhtemelen detoksifikasyonda yer alan farklı türlere özgü alt-hücrel işlemlerden kaynaklanmaktadır. Ancak, bilinen farklı detoksifikasyon yollarıyla fosfat çöktirme tiplerini karşılaştıran bilinen sistematik bir çalışma yoktur. Hücre içi çöktirme ayrıca kükürt ile de gözlenmiştir. Fosfat sınırlayıcı koşullar altında Pb'yi alırken, *Klebsiella aerogenes* NCTC418'de PbS bulunmuştur (Aiking ve ark., 1985) Ayrıca XRD ile sülfat indirgeyen bakterilerin PbSO₄'ü PbS oluşturmak için elektron alıcısı olarak kullanabildiği gösterilmiştir (Karnachuk ve ark., 2002).

Ayrıştırmanın diğer bir şekli Metalotiyonin proteinleri tarafından gerçekleştirilir (Maret, 2017). Ağır metale maruz kalma uzun zamandır metalotiyonin (MT) düzenlemesi ve fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Metalotiyoninler, sistein bakımından zengin olan metaloproteinlerdir ve Grup 11 ve 12 metallerine iki metal tiyolat kümesinden oluşan

iki bölge ile bağlanır. Metalotiyoninler, düşük molekül ağırlıklı bir kütle (memeli proteini için 6000-7000 Da), yaklaşık % 30 sistein bölgesi (memeli MT'sinin 62'de 20 si sisteindir) ve birincil dizilimde hiç bir aromatik amino asitin olmaması ile karakterize edilir. MT'ler çinko ve bakır esansiyel metallerinin homeostatik metal tepkisinde ve kadmiyum gibi ağır metallerin detoksifikasyonunda görev alırlar. Genel olarak, MT'nin metal bağlayıcı sistein köklerinin metallere afinitesi, metallerin tiyollere olan afinitilerine benzemektedir: Zn (II) <Pb (II) <Cd (II) <Cu (I) <Ag (I) <Hg (II) <Bi (III) (Wong ve ark., 2017). Her ne kadar MT'ler detoksifikasyonda görev alsalarda, bu mekanizma bakteriler arasında birincil ağır metal detoksifikasyon stratejisi değildir (Stewart, 2017).

Diğer bir yöntem bazı bakterilerde gözlemlenen, çeşitli Pb^{2+} türlerini detoksifikasyonda rol oynadığı düşünülen metillenmiş Pb türlerine dönüştürme kabiliyetine sahiptir (Thayer, 2002). Bu işlem biyometilasyon olarak adlandırılır, ancak metil-kurşun bağının dayanıksız yapısının bir sonucu olarak monometil kurşunun (IV) kararsızlığı nedeniyle kesin mekanizmalar oluşturulamamıştır (Thayer, 2002). Hem tetrametil (Me_4Pb) hem de trimetil (Me_3Pb) kurşun, mikrobiyal biyometilasyon ürünleri olarak tanımlanmıştır. *Aeromonas sp.* nin kurşun asetatı Me_4Pb 'ye dönüştürdüğü gösterilmiştir (Silverberg ve ark., 1976). Başka bakterilerde de benzer dönüştürme yetenekleri gösterilmiştir, ancak Pb biyometilasyonunun tamamen ortamda gerçekleştiğini sorgulayan kanıtlarda vardır (Wong ve ark., 1975; Hughes ve Poole, 1989). Bu iddialara rağmen, bir tür kutup deniz bakterisinin Me_3Pb ürettiği bildirilmiştir (Pongratz ve Heumann, 1999).

Son yöntem ise hücre dışına atım mekanizmasıdır. Bakteriler P tipi ATPase aracılı taşınımında içeren dışarı atma sistemleri aracılığıyla Pb'yi hücre dışına atabilirler (Apell, 2004). Hücre içi Pb^{2+} 'yi uzaklaştıran Pbr atım sistemi ilk olarak *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Borremans ve ark., 2001)' de rapor edilmiştir ve kurşun detoksifikasyonunda çökeltmeyi atım ile birleştirdiği bilinen tek sistemdir. *C. metallidurans* CH34, metal tolerans çalışmaları için sıklıkla kullanılan ve özellikle hücre içi Pb ayrıştırma ve detoksifikasyonu bağlamında ilgi çeken model bir bakteridir. Belirlenen atım sistemi pbr tarafından kodlanır ve PbrT (bir zar proteini), PbrA (bir PIB tipi ATPase), PbrB (bir fosfataz zar proteini), PbrC (varsayılan bir sinyal peptidaz), PbrD (bir varsayılan hücre içi Pb bağlayıcı protein) ve PbrR (pozitif regülatör) içerir (Borremans ve ark., 2001). PbrT, Pb^{2+} 'nin sitoplazmaya alınmasından kısmen

sorumludur, bu nedenle, PbrD proteinin Pb'yi bağlayıp onu hassas sub-hücrel hedeflere daha az erişilebilir hale getirirken aynı zamanda PbrA'yı aktive ettiği düşünülmektedir. PbrA, Pb'nin periplazma içine atımından sorumludur ve inorganik fosfatın periplazmik boşluğa salınması ve Pb fosfatların çökmesinde görev alan PbrB ile birlikte çalışır. Bu periplazmik çökeltmenin Pb'nin sitozole tekrar girmesini önlediği düşünülmektedir (Hynninen ve ark., 2009).

Metal dirençliliğini aktive eden ana genler kromozomal olup geniş metal dirençliliği megaplazmitlerinden kaynaklanmaktadır. denedikleri 16 farklı metalin transkriptomik verilerini incelediklerinde bakterinin tepkisini 3 ana grupta toplamışlar ve Pb Cd, Ni, Cu ve Zn ile aynı grupta yer alırken Hg'den farklı bir grupta yer almıştır (Monsieurs ve ark., 2011).

Genel olarak metale maruz kaldığında bakteride sülfür ve ilişkili yollar metalleri tutmak amacıyla aktive olurken yine gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla karbonhidrat parçalayıcı yollar da aktive olmaktadır (Monsieurs ve ark., 2011).

Dikkat edilmesi gereken hususlardan bir tanesi aktive olan yolağın direkt olarak metal dirençliliğinde rol almıyor olabileceğidir. Bunun sebeplerinden birisi, yüksek konsantrasyonda bulunan metal hücre içerisindeki metal iyon havuzunda oluşturacağı yükselme sebebiyle metal bağlama bölgelerinde bir kaymaya sebep olarak proteinlerin metal bağlama bölgelerini doldurup hücre için gerekli olan iz elementlerin sağlanmasını sağlayacak ve bu iz elemente afinitesi yüksek yeni proteinler için yolları aktive edebilir. Ancak aktive olan bu yolağın buna sebep olan metale karşı dirençlilikle direkt ilişkisi yoktur. Diğer bir sebep ise, metal dirençlilikte rol alan genlerin promotor bölgelerine bağlanan transkripsiyonel faktörlerin esnekliği olabilir. Bakterinin maruz kaldığı metale karşı en verimli detoksifikasyon sistemi öncelikli olarak aktive edildikten sonra metalin fazla olması sebebiyle ilgili promotor bölgesi tamamıyla işgal edildiğinde transkripsiyonel faktörler diğer ama daha az verimli metal dirençlilikte görev alan bölgelerin promotor bölgelerine bağlanarak aktive edebilirler. Bu genler direkt olarak ilgili metalin detoksifikasyonunda görev almıyor olsalarda hücrenin detoksifikasyonuna yardım etmiş olurlar (Monsieurs ve ark., 2011).

Pbr mekanizmasında PbrA Pb'yi sitoplazma dışına taşıırken hücre dışında Pb PbrB'nin ürettiği inorganik fosfat ile tuz oluşturarak çöktttiği ifade edilmiştir. Ayrıca bu mekanizmanın birçok bakteride Pb dirençliliğinin temelini oluşturduğunu ifade

etmişlerdir. Fakat, PbrA'nın Pb, Zn ve Cd'yi özgül olmadan hücre dışına attığını ileri sürmüşlerdir (Hynninen ve ark., 2009). Ancak Wong ve ark.(2004), PbrA'nın Pb'ye özgül olduğunu, bunun yanında CadA ve ZntA'nın Pb'yi özgül olmadan hücre dışına atabildiğini ifade etmişlerdir.

Sonuç olarak endüstrinin büyümesiyle endüstriyel atıkların çevreye, özellikle toprak ve suya boşaltılmasında önemli bir artış olmuştur. Bu durum özellikle kentsel alanlarda ağır metallerin birikmesine yol açmıştır. Biyoremediyasyon, bakterileri, mantarları veya bitkileri kullanarak atıkların kontrollü koşullar altında biyolojik olarak zararsız bir hal almasını ve belirlenen yoğunlaşma sınırlarının altındaki seviyelere indirgenmesini sağlar. Bu aşamada bitkiler ve mantarların kullanım alanı kısıtlı olmasına rağmen, bakterilerin her ortama uyum sağlayabilmeleri mikroorganizmaları etkin ve verimli yapmaktadır. Ayrıca adaptasyon koşulları bilinen bakterilerin biyoremediyasyon sonucunda kontrolleri de koşulları değiştirerek sağlanabilmektedir.

Bu çalışma sonucunda iki farklı mikroorganizma kurşun ağır metali biyoremediyasyon uygulamaları için potansiyele sahip bulunmuştur. Mikroorganizmaların protein profilleri sonucunda kurşuna karşı metabolik tepkilerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliği olabilecek transkriptomik ve proteomik çalışmalar ile ağır metal biyoremediyasyonun farklı metabolik yollarına ışık tutulabilir. Dolayısıyla daha etkin bir biyoremediyasyon uygulamaları gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z. ve Wassie, M., 2017. Application of Microorganisms in Bioremediation-Review. *Journal of Environmental Microbiology*, 1(1), 02-09.
- Adenipekun, C.O. ve Lawal, R., 2012. Uses of Mushrooms in Bioremediation: A Review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 7(3), 62-68.
- Aiking, H., Govers, H. ve Riet, J van't., 1985. Detoxification of Mercury, Cadmium, and Lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 Growing in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1262–1267.
- Akshata, N.J., Udayashankara, T.H. ve Lokesh, K.S., 2012. Review on Bioremediation of Heavy Metals with Microbial Isolates and Amendments on Soil Residue. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 3(8), 118-123.
- Anonim, Lead Production & Statistics. www.ila-lead.org/lead-facts/lead-production--statistics- (Erişim Tarihi: 02.02.2019).
- Apell, H.-J., 2004. How Do P-Type ATPases Transport İons?. *Bioelectrochemistry*, 63, 149–156.
- Aşı, T., 1995. Tablolarla Biyokimya Cilt 1. İşstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, 268 s, İşstanbul.
- Banerjee, G., Panbey, S., Ray, A.K. ve Kumar, R., 2015. Bioremediation of Heavy Metals by a Novel Bacterial Strain *Enterobacter cloacae* and Its Antioxidant Enzyme Activity, Flocculant Production, and Protein Expression in Presence of Lead, Cadmium, and Nickel. *Springer International Publishing Switzerland*, 226:91.
- Barker, S., Griffiths, C. ve Nicklin, J., 2013. *Mikrobiyoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık TİC. LTD. şTİ., 351, Ankara.
- Barwinska-Sendra, A. ve Waldron, K. J., 2017. The Role of Intermetal Competition and Mis-Metalation in Metal Toxicity. *Advances in Microbial Physiology*, Editör: Robert K. Poole. Elsevier, 1-379.
- Blum, H., Beier, H. ve Gross, H. J., 1987. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA Polyacrylamid Gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L. ve Lelie, D. van der., 2001. Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology*, 183, 5651–5658.
- Bozanta, E. ve Ökmen, G., 2011. Biyosorpsiyon ve Mikroorganizmalar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 69-77.

- Bradford, M.M., 1976. "A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding". *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Chakraborty, S., Mukherjee, A. ve Das, T.K., 2013. Biochemical Characterization of A Lead-Tolerant Strain of *Aspergillus Foetidus*: An İmplication of Bioremediation of Lead From Liquid Media. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 134-142.
- Chatterjee, S., Mukherjee, A., Sarkar, A. ve Roy, P., 2012. Bioremediation of Lead by Lead-Resistant Microorganisms, İsolated From İndustrial Sample. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 290-295.
- Davis, B. J., 1964. Disc Electrophoresis Method And Application To Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-427.
- Delom F. ve Chevet E., 2006. Phosphoprotein Analysis: From Proteins to Proteomes, *Proteome Science*, 4(15), 1-12.
- Derman, S., 2006. Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Dey, U., Chatterjee, S. ve Kumar-Mondal., 2016. Isolation and Characterization of Arsenic-resistant Bacteria and Possible Application in Bioremediation. *Biotechnology Reports*, 10, 1-7.
- Dindar, E., Şağban, F. O. ve Başkaya, H. S., 2010. "Kirlenmiş Toprakların Biyoremediasyon ile Islahı". *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15(2).
- Dixit, R., Wasiullah., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. A., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H. ve Paul, D., 2015. Review Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, Editör: Vincenzo Torretta. 7, 2189-2212.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2005. Yaşamı Kuşatan Ağır Metal Kurşunun Etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 6, 1-5.
- Engelkirk, P.G. ve Engelkirk, J.D., 2017. Burton *Sağlık Bilimlerinde Mikrobiyoloji*. İstanbul Medikal Yayıncılık, 482, İstanbul.
- EPA, (1995) Contaminants and Remedial Options at Select Metals-Contaminated Sites, EPA/540/R-95/512.
- Ergene, C., 2014. Mikroorganizmaların Yapışmasını Önleyici İnorganik ve Organik Akıllı Yüzeylerin Geliştirilmesi ve İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Atılım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Fischer, E.H. ve Krebs, E.G., 1995. Conversion of Phosphorylase B to Phosphorylase A in Muscle Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 216, 121-132.

- Ghunmi, A.L., Alkhatib, L. ve Alkhawaldeh, M., 2016. *Aspergillus Niger*-mediated Bioremediation of Triton X-100-contaminated Resources. *Desalination and Water Treatment*, 57, 15200-15207.
- Gırma, G., 2015. Microbial Bioremediation of Some Heavy Metals in Soils : An Updated Review. *Indian Journal of Scientific Research*, 6(1), 147-161.
- Gram, H.C., 1884. Über Die Isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-89.
- Hughes, M. N. ve Poole, R. K., 1989. Metals and Micro-Organisms, *Chapman and Hall*, 252–301.
- Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin Lecreulx, D. ve Virta, M., 2009. An Efflux Transporter PbrA and a Phosphatase PbrB Cooperate in a Lead-resistance Mechanism in Bacteria. *Molecular Microbiology*, 74(2), 384–394.
- Jarosławiecka, A. ve Piotrowska-Seget, Z., 2014. Lead Resistance in Micro-organisms. *Microbiology*, 160, 12–25.
- Järup, L., 2003. Hazards of Heavy Metal Contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182.
- Karnachuk, O., Kurochkina, S. ve Tuovinen, O., 2002. Growth of Sulfate-reducing Bacteria with Solid-phase Electron Acceptors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 482–486.
- Kaynar, G., 2013. Fosfopeptitlerin Çözünmeyen Geçiş Metal Oksitleri Üzerinde Seçimli Zenginleştirilmesi ve Maldı-Ms ile Doğrudan Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S. ve Hayes, W.J., 2000. Role of Plants, Mycorrhizae and Phytochelators in Heavy Metal Contaminated Land Remediation. *Chemosphere*, 42(1-2), 197-207.
- Kocabaş, A. ve Ulaşlı, M., 2014. *Bakteri Genetiği. Moleküler Biyoloji*, Editör: Karataş, M. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık TİC. LTD. ŞTİ., Ankara, 173-183.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D. ve Dhewa, T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1, 6.
- Laemmli, U.K., 1970. “Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, P.Y, Costumbrado, J., Hsu, C.Y. ve Kim, Y.H., 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 3923.

- Lessler, M. A., 1988. Lead and Lead poisoning from Antiquity to Modern Times. *The Ohio Journal of Science*, 88, 78–84.
- Levinson, H. S. ve Mahler, I., 1998. Phosphatase Activity and Lead Resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 135–138.
- Li, X., Peng, W., Lu, L. ve Fan, W., 2016. Bioremediation of Lead Contaminated Soil with *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere*, 156, 228-235.
- Liu, H., Guo, S., Jiao, K., Hou, J., Xie, H. ve Xu, H., 2015. Bioremediation of Soils Co-contaminated with Heavy Metals and 2,4,5-trichlorophenol by Fruiting Body of *Clitocybe maxima*. *Journal of Hazardous Materials*, 294, 121-127.
- Luo, X., Zeng, X.C., He, Z., Lu, X., Yuan, J., Shi, J., Liu, M., Pan, Y. ve Wang, Y.X., 2014. Isolation and Characterization of a Radiation-resistant Bacterium from Taklamakan Desert Showing Potent Ability to Accumulate Lead (II) and Considerable Potential for Bioremediation of Radioactive Wastes. *Springer Science+Business Media New York*, 23, 1915-1921.
- Madigan, M.T. ve Martinko, J.M., 2010. *Mikrobiyolojiye Giriş. Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Editörler: Çökmüş, C. Palme, 3-9.
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E. ve Yamamoto, T., 2014. Basics and Recent Advances of Two Dimensional- polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Clinical Proteomics*,
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, F., Solinas, A., Tavera, C., Ibba, A., Tocco, M., Clore, C. ve Randaccio, F.S., 2001. Neurotoxic Effect of Lead at Low Concentrations. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 269-275.
- Maret, W. ve Moulis, J.-M., 2013. The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of its Toxicity. *Metal Ions in Life Sciences*, 11, 1–29.
- Mire, C. E., Tourjee, J. A., O'Brien, W. F., Ramanujachary, K. V. ve Hecht, G. B., 2004. Lead Precipitation by *Vibrio harveyi*: Evidence for Novel Quorum-Sensing Interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 855–864.
- Monsieurs, P., Moors, H., Houdt, R. V., Janssen, P.J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M. ve Leys, N., 2011. Heavy Metal Resistance in *Cupriavidus Metallidurans* CH34 is Governed by an Intricate Transcriptional Network. *Biomaterials*, 24, 1133-1151.
- Montes-Santiago, J., 2013. The Lead-poisoned Genius: Saturnism in Famous Artists Across Five Centuries. *Progress in Brain Research*, 203, 223–240.
- Moubasher, H.A., Hegazy, A.K., Mohamed, N.H., Moustafa, Y.M., Kabil, H.F. ve Hamad, A.A., 2015. Phytoremediation of Soils Polluted with Crude Petroleum Oil Using *Bassia scoparia* and its Associated Rhizosphere Microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 98, 113-120.

- Naik, M.M., Pandey, A. ve Dubey, A.k., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Strain WI-1 from Mandovi Estuary Possesses Metallothionein to Alleviate Lead Toxicity and Promotes Plant Growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 129-133.
- Nriagu, J., 1983. Occupational Exposure to Lead in Ancient Times. *Science of The Total Environment*, 31(2), 105-116.
- O'Farrel, P. H., 1975. High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021.
- Ornstein, L., 1964. Disc Electrophoresis. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 321-49.
- Park, Y.J., Ko, J.J., Yun, A.L., Lee, E.Y., Kim, S.J., Kang, S.W., Lee, B.C. ve Kim, S.K., 2008. Enhancement of Bioremediation by *Ralstonia* sp. HM-1 in Sediment Polluted by Cd and Zn. *Bioresource Technology*, 99(16), 7458-7463.
- Patterson, C. C., 1965. Contaminated And Natural Lead Environments Of Man. *Archives of Environmental Health An International Journal*, 11, 344-369.
- Pongratz, R. ve Heumann, K. G., 1999. Production of Methylated Mercury, Lead, and Cadmium by Marine Bacteria as a Significant Natural Source for Atmospheric Heavy Metals in Polar Regions. *Chemosphere*, 39(1), 89-102.
- Rhodes, C.J., 2014. Mediation (Bioremediation With Fungi) – Growing Mushrooms To Clean The Earth. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(3), 196-198.
- Rodriguez, E.M., Kalks, K.H.M. ve Totola, M.R., 2015. Prospect, Isolation, and Characterization of Microorganisms for Potential Use in Cases of Oil Bioremediation Along the Coast of Trindade Island, Brazil. *Journal of Environmental Management*, 156, 15-22.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E. ve Maizel, J. V., 1967. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-polyacrylamide Gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28, 815-820.
- Silverberg, B. A., Wong, P. T. ve Chau, Y. K., 1976. Ultrastructural Examination of *Aeromonas* Cultured in the Presence of Organic Lead. *Applied Environmental Microbiology*, 32, 723-725.
- Templeton, A. S., Spormann, A. M. ve Brown, G. E., 2003. Speciation of Pb(II) Sorbed by Burkholderia cepacia/goethite Composites. *Progress in Environmental Science and Technology*, 37, 2166-2172.
- Thayer, J. S., 2002. Biological Methylation of Less-studied Elements. *Applied Organometallic Chemistry*, 16, 677-691.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.

- Vural, A., Demir, S. ve Boyno, G., 2018. Biyoremediasyon ve Fungusların Biyoremediasyonda Kullanılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(4), 490-501.
- Wang, S.Y., Kuo, Y.C., Huang, Y.Z. ve Kao, C.M., 2015. Bioremediation of 1,2-dichloroethane Contaminated Groundwater: Microcosm and Microbial Diversity Studies. *Environmental Pollution*, 203, 97-116.
- Weber, K. ve Osborn M., 1968. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 4406-4412.
- Wong, D. L., Merrifield-MacRae, M. E. ve Stillman, M. J., 2017. Lead(II) Binding in Metallothioneins. *Metal Ions in Life Sciences*, 17, 241-269.
- Wong, P. T. S., Chau, Y. K. ve Luxon, P. L., 1975. Methylation of Lead in the Environment. *Nature*, 253, 263-264.

EKLER

EK 1

Kullanılan Besiyerleri

Nutrient Agar Hazırlanışı

8,0 g Nutrient Broth besi yeri ve 15 g agar agar tartılmış 1 L distile suda çözdürüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Nutrient Broth Hazırlanışı

8,0 g Nutrient Broth besi yeri tartılmış 1 L distile suda çözdürüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

EK 2

Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

1 M Lead(II) Acetate Trihydrate Stoğunun Hazırlanışı

19,0 g Lead(II) Acetate Trihydrate tartılmış 50 mL NB içeren erlenin içersine eklenip manyatik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.

% 0,9' luk Sodyum Klorür (NaCl) Solüsyonunun Hazırlanışı

0,9 g (Sodyum Klorür) NaCl tartılmış ve üzerine son hacim 1 L olana kadar distile su eklenip manyatik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.

50 mM pH 7 Sodyum Fosfat Tamponu

7 g (KH_2PO_4) sodyum fosfat tartılmış ve üzerine son hacim 1 L olana kadar distile su eklenip manyatik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Sodyum fosfat tamponu kullanılacağı zaman pH 7' ye ayarlanmıştır.

Bradford Çözeltilisinin Hazırlanışı

12,5 mL % 96' lık etanolde 25 mg Coomassie Brilliant Blue G250 boyası çözdürölüp üzerine 25 mL % 85' lik fosforik asit eklenmiştir. Bir gece karıştırıcıda bekletilmiş ve distile su ile üzeri 250 mL'ye tamamlanmıştır. Süzgeç kağıdından geçirilmiş ve ışık geçirmeyen cam şişe içersinde +4°C' de muhafaza edilmiştir.

% 20 TCA-Aseton

20 g TCA tartılmış ve 100 mL asetonda çözdürölmüştür.

EK 3

Biyokimyasal Analizler İçin Kullanılan Kimyasallar ve Boyalar

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Bakterilerin identifikasyonu amacıyla yapılan biyokimyasal testlerden katalaz testinin ayırıcı olarak % 3' lük H_2O_2 kullanılmıştır.

Tetrametil-p-fenilendiamin ayırıcı (% 0,5' lik)

Bakterilerin identifikasyonu amacıyla yapılan biyokimyasal testlerden oksidaz testinin ayırıcı olarak % 0,5' lik Tetrametil-p-fenilendiamin ayırıcı kullanılmıştır.

Kristal Viyole Boyası

Bakterilerin duvar yapılarına göre ayırımlarının sağlandığı gram boyama çalışmalarında mor renkli primer boya çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti A

Kristal viyole	2,0 g
Etil alkol (%95)	10,0 mL

Çözelti B

Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80,0 mL

Çözelti A ve B karıştırılmış distile su ile 1:10 oranında sulandırılıp filtre kağıdından süzölmüştür.

İyot-Lügol Çözeltisi

Bu madde mordan olarak kullanılır. Mordan, bir boyaya karşı hücrenin eğilimini arttıran bir maddedir. Primer boyaya bağlanarak çözünmez bir bileşik oluşturur. Tüm hücreler bu esnada koyu mor boyanır.

EK 3 (Devam)

Bileşim

İyot	5,0 g
Potasyum iyodit	10 g/L
Distile su	1000 mL

Potasyum iyodit 30 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra iyot çözeltiye eklenip ve çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Bazik Fuksin

Preparatlar etil alkol ile muamele edildikten sonra karşıt boya olarak sulu fuksin çözeltisi ile işleme tabii tutulmuştur.

Bileşim

Bazik fuksin	10 g
% 95' lik etil alkol	100 mL

% 96' lık Etil Alkol

Gram boyamada kullanılan etil alkol piyasada ticari olarak satılan % 96' lık saflıkta temin edilmiştir.

İmmersiyon Yağı (Sedir Yağı)

Gram boyama sonrasında bakterilerin 100 X büyütme objektifte incelenirken kullanılmıştır.

EK 4

PZR İçin Kullanılan Çözeltiler

Mg⁺² Stok Çözeltisi (100 mL)

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g
MgSO ₂ .7H ₂ O	24,65 g

Yukarıda verilen kimyasal maddelere distile su eklenerek 100 mL' ye tamamlanmıştır. Filtre ile sterilize edilmiş ve +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Solüsyonu

Bileşimi:

Trisma base	21,6 g
Borik asit	11 g
EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)	1,86 g

Tartılarak son hacim 200 mL olacak şekilde saf suda çözündürülmüş ve pH 8,3' e ayarlanmıştır.

Agaroz jel (% 3) 50 mL

Agaroz	1,5 g
5X TBE Solüsyonu	5 mL
Distile su	45 mL

Agaroz, homojen bir karışım oluşuncaya kadar ısıtılarak eritilmiştir.

Örnek Yükleme Tamponu

Brom fenol mavisi	% 0,25
Gliserol	% 10

100 mL saf suda çözülerek elde edilmiştir.

EK 4 (Devam)

DNA Ladder (Thermo Scientific™ GeneRuler 25 bp)

Ticari olarak sağlanan ladder DNA' lar, PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) ve DNA dizileme sırasında kullanılmıştır. DNA dizileme işlemi hizmet alımı Iontek A.Ş. tarafından yapılmıştır.

Stok Boyama Solüsyonu

Ethidium bromür	1 mg
Distile su	100 mL

Boya tamamen çözündükten sonra koyu renkli şişede +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

6x Loading Dye Solution

Tris-HCl	10 mM, pH 7,6
Bromofenol Blue	% 0,03
Xylene cyanol	% 0,03
Gliserol	% 60
EDTA	60 mM

EK 5

SDS-PAGE İçin Kullanılan Reaktifler ve Jellerin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

Stok özeltiler

Akrilamid/Bisakrilamid Hazırlanışı

300 mL distile su içerinde 87,6 g akrilamid ve 2,4 g bisakrilamid tartılıp özdürölmüştür. Çözünmenin tam olabilmesi için hafif şekilde ısıtılıp filtre kağıdı ile süzölüp, ışık geçirmeyen cam şişe içerisinde +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Yükleme (örnek) Tamponun Hazırlanışı

3,55 mL saf su, 2,5 mL gliserol, 1,25 mL 0,5 M tris (pH 6,8), 2 mL % 10' luk SDS, 0,2 mL % 0,5' lik bromfenol mavisi karıştırılıp yükleme tamponu hazırlanmıştır.

Tris Hazırlanışı

12,14 g tris-baz tartılıp son hacim 200 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir (pH 6,8).
36,342 g tris-baz tartılıp son hacim 200 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir (pH 8,8).

% 10' luk SDS'in Hazırlanışı

100 mL distile su içerisinde 10 g SDS tartılıp özdürölmüştür.

% 10' luk APS (Amonyum persölfat) Hazırlanışı

100 µL distile su içeresinde 100 mg APS tartılıp özdürölmüştür.

5X ERB (Elektroforez Tamponu) Hazırlanışı

15 g tris-baz ve 72 g glisin tartılıp 1 L distile su içerisinde özdürölmüştür.

EK 5 (Devam)

SDS Jel Çözeltilerinin Hazırlanması

Alt (Separating) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, % 2,67 C)	% 12
Akrilamid/bis (% 30 T, % 2,67 C stok)	4,0 mL
Saf su	3,35 mL
1,5 M Tris-Baz, pH 8,8	2,5 mL
% 10 SDS	100 µL
% 10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED (N,N- tetrametilen etilendiamin)	5 µL

Üst (Stacking) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, % 2,67 C)	% 7
Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C stok)	2,3 mL
Saf su	5,1 mL
0,5 M Tris-Baz, pH 6,8	2,5 mL
% 10 SDS	100 µL
% 10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED (N,N- tetrametilen etilendiamin)	10 µL

EK 6

2D-PAGE İçin Kullanılan Reaktifler ve Jel Hazırlanması

Çözeltiler

% 1 Bromofenol Blue Stok Solusyon

100 mg bromofenol blue ve 60 mg tris-baz tartılıp son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

Rehidrasyon Buffer

4,2 g üre, 1,52 g thioüre, 0,4 g CHAPS, 1 M DTT, 50 µL % 100 IPG buffer (amfolit) ve 200 µL % 1 bromofenol blue tartılıp son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

% 1 Agaroz Jel

1 g agaroz, 100 mL 1X TBE tamponu ve % 1 30 µL bromofenol blue içerisinde çözdürölüp mikrodalga ile eritilmiştir.

1. Dengeleme Tamponu

3,6 g üre, 0,6 g trisHCl, 0,2 g SDS, 2 mL gliserol, 0,2 g DTT eklenip son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

2. Dengeleme Tamponu

3,6 g üre, 0,6 g trisHCl, 0,2 g SDS, 2 mL gliserol, 0,25 g akrilamid eklenip ve son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

1X Yürütme Tamponu

5X ERB (Ek 5) hazırlanmış ve 5 kat seyreltilmiştir.

EK 6 (Devam)

% 12 SDS Poliakrilamid Jel

3,3 mL distile su, 4 mL % 30 akrilamid, 2,5 mL 1,5 M Tris, pH 8, 100 μ L % 10 SDS, 100 μ L % 10 APS ve 4 μ L TEMED karıştırılmıştır.

Mini-protean Tetra Cell (Biorad, Almanya) elektroforez düzeneğine ait cam plakalar ve aparatlar kullanılarak jel dökme düzeneği oluşturulmuştur. Hazırlanan % 12 SDS poliakrilamid jel cam plakalar arasına 4,5 mL dökülüp üzeri distile su ile tamamlanmış ve polimerleşmesi için bekletilmiştir.



EK 7

SDS-PAGE Boyama Çözeltileri

Gümüş Nitrat Boyama Yöntemi

Fiksasyon Çözeltisi

50 mL metanol, 12 mL asetik asit, 50 µL % 37' lik formaldehit karıştırılıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir.

Gümüş Nitrat Çözeltisi

0,2 g AgNO_3 tartılıp 100 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür, çözünme sağlandıktan sonra üzerine 75 µL % 37' lik formaldehit eklenmiştir.

Ön İşlem Çözeltisi

0,02 g sodyum tiyosülfat tartılıp 100 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür.

Geliştirme Çözeltisi

4,5 g potasyum karbonat tartılıp 100 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. Üzerine 4 mL ön işlem çözeltisi ve 150 µL % 37' lik formaldehit eklenip ve karıştırılmıştır.

% 50 Etanol

50 mL etanol üzerine 50 mL distile su eklenmiştir.

Durdurma Çözeltisi

62,5 mL metanol ve 15 mL asetik asit karıştırılıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile su eklenmiştir.

EK 7 (Devam)

Yürütme işlemi tamamlanan jel cam plakalar arasından alınmış ve seramik tabla içeresine yerleştirilmiştir. Üzerine 60 mL fiksasyon çözeltisi eklenip ve MR-1 Mini Rocker-Shaker (biosan) üzerinde 60 rpm' de 1 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda 3 defa % 50' lik etanol ile yıkanıp ve ön işlem çözeltisinde 60 rpm' de 1 saat muamele edilmiştir. Sonrasında 3 defa saf su ile yıkanmış, gümüş nitrat çözeltisinde 20-40 saniye arasında bekletilmiştir. İki kere saf su ile yıkanmış, geliştirme çözeltisi ile 40-45 saniye muamele edilip ve iki kere saf su ile yıkanmıştır. Durdurma çözeltisi ile 5 dakika muamele edildikten sonra saf su ile iki defa yıkanmıştır. ChemiDoc MP Imaging System (BIO RAD) cihazı ile görüntülenmiştir.

Fosfoprotein ve Toplam Protein Boyama

Çizelge EK7 1 Fosfoproteinlerin tespiti için boyama protokolü

	Reaktif	Protokol
Düzeltilme (Fikse etme)	50 mL metanol 10 mL asetik asit 40 mL saf su	100 mL, 30 dakika
		100 mL, 30 dakika
Yıkama	Ultra saf su	100 mL, 10 dakika
		100 mL, 10 dakika
		100 mL, 10 dakika
Boyama	Phos-Tag™ Phosphoprotein Jel Stain (P005A)	40-60 mL 60-90 dakika
Boya giderme	Phos-Tag™ Phosphoprotein Destain Solution (P005B)	60 mL, 30 dakika
		60 mL, 30 dakika
		60 mL, 30 dakika
Yıkama	Ultra saf su	100 mL, 5 dakika
		100 mL, 5 dakika

Çizelge EK7 2 Toplam proteinlerin tespiti için boyama protokolü

	Reaktif	Protokol
Boya çözeltisi	1 mL 1000xLuminol boya 600 mL saf su 300 mL metanol 100 mL asetik asit	4 °C'de plastik şişede ışıktan korunmuş şekilde saklanır.
Boyama	1x eLuminol™	50 - 80 mL 90 dakika
Yıkama	10 mL metanol 7 mL asetik asit 83 mL saf su	20 dakika

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Merve Ezgi ESKİ
Doğum Tarihi ve Yer : 06/10/1992, Aksaray
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dil : İngilizce
Telefon : (544) 298 22 63
e-mail : merveezgi.92@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji	2019
Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji	2014
Lise	Füsun Yönder Anadolu Lisesi	2010

Proje ve Kongreler

Küften Elde Edilen Antimikrobiyal Maddenin Kısmi Saflaştırılması 4th. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DEVELOPMENT OF KOP REGION Uluslararası, Poster, Kasım, 2016

Isolation of Microorganisms from Soil Resistant to Lead Heavy Metal INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGICAL SCIENCES (ICBS) Uluslararası, Poster, Kasım, 2016

Eski, M.E., 2019. Kurşun Ağır Metali Biyoremediyasyon Potansiyeline Sahip Mikroorganizma İzolasyonu ve Adaptasyonu. Yüksek lisans tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.