

**AĞIR METALLE KONTAMİNE OLMUŞ TOPRAKLARDAN
METAL İYONLARINA DİRENÇLİ BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BU DİRENÇLİLİĞİN PLAZMİDLERLE OLAN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ERSOY SEVGİ

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

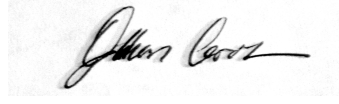
**Biyoloji
Ana Bilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gökhan CORAL**

***MERSİN*
Haziran- 2007**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.



Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gökhan CORAL



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Mustafa ÖZYURT



Jüri Üyesi
Doç. Dr. Münir TUNCER

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.Mahir TURHAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZET

Bu çalışmada, toprak örnekleri Mersin Kazanlı çevresindeki önemli bir sanayi kuruluşunun civarından alınmıştır. Çalışma için seçilen ağır metaller Cu, Ni, Co, Cd, Zn ve Cr dur. Toprak örneklerinin ağır metaller düzeylerinin belirlenmesi için, ICP analizleri yapılmıştır. ICP analiz sonuçları alınan toprak örneklerinde Cd hariç diğer ağır metallerin kontrol toprak örneğine oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Toprak örneklerinden toplam 225 adet *Pseudomonas* sp. ve 101 adet *Bacillus* sp. izole edilmiştir. Ağır metal dirençliliği testi için bakteri hücreleri, CuCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , ZnCl_2 ve $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'nin değişik konsantrasyonlarını içeren Nutrient Agar petrilere çizgi şeklinde ekildi ve 30°C 'ta 24 saat süreyle inkübe edildi, 24 saat sonra ağır metallerin maksimum tolere edilebilir konsantrasyonları (MTC), gelişmeye izin veren en yüksek ağır metal konsantrasyonu olarak gösterildi.

Yüksek MTC değerine sahip bakteriler arasından seçilen suşlarda plazmid DNA varlığını araştırmak için, mini preparasyon metodu kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidler agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Elektroforez sonucunda, A1P41, B2P55, B2P60, B2P77, B2P99, B2P115, B2P117 ve B2P123 suşlarında 1.8 kb ve 2.1 kb büyüklüğünde iki adet, B2P110 suşunda 1.8 kb, 2.1 kb ve 28 kb'lık üç adet plazmid bulunduğu gözlenmiştir.

Pseudomonas sp.'den A1P25, B2P77, B2P99, B3P36 suşları ve *Bacillus* sp.'den B1B7 suşu ağır metallerin biyosorpsiyonu için seçildi. Bakterilerin ağır metal biyosorpsiyonunu belirlemek için de ICP sistemi kullanıldı. ICP analizi sonucuna göre, Zn'nin biyosorpsiyon hızının diğer metallerin biyosorpsiyon hızından daha yüksek olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Ağır metal dirençliliği, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., Biyosorpsiyon

ABSTRACT

In this study, soil samples were collected from industrial zone in Kazanlı / Mersin. Six heavy metals that Cu, Ni, Co, Cd, Zn, and Cr were selected for this study. ICP analyses were carried out for detecting the heavy metals levels of soil samples. Results of ICP analysis showed that the heavy metal concentrations of the soils samples were found to be higher than control soils except to Cd.

A total 225 *Pseudomonas* sp. and 101 *Bacillus* sp. were isolated from soil samples. For testing heavy metal resistance, the bacterial cells were streaked onto Nutrient Agar plates containing various concentrations of CuCl₂, CoCl₂, CdCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ and K₂Cr₂O₇ and incubated at 30 °C for 24 hours. The maximum tolerable concentration (MTC) of heavy metals was designated as the highest concentration of heavy metal which allows confluent growth after 24 hours.

Mini preparation methods were used for plasmid DNA isolation, in selected bacterial strains that had high MTC levels. The isolated plasmids were separated by agarose gel electrophoresis. A1P41, B2P55, B2P60, B2P77, B2P99, B2P115, B2P117, B2P123 strains were found to have 1.8 kb and 2.1 kb two plasmids, and B2P110 strain were found to have 1.8 kb, 2.1 kb, and 28 kb three plasmids.

The strains A1P25, B2P77, B2P99, B3P36 from *Pseudomonas* sp., and the strain B1B7 from *Bacillus* sp. were selected for heavy metal biosorption. For detecting the heavy metal biosorption of bacteria, ICP system was used. According to the results of ICP analysis, it was determined that biosorption speed of Zn was higher than biosorption of other heavy metals.

Keywords: Heavy metal resistance, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., Biosorption

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana sabırla yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Gökhan CORAL'a, çalışmamda emekleri bulunan ikinci danışman hocam Doç. Dr. A.Murat GİZİR teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Yrd. Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN'e yardımlarından dolayı teşekkür borçluyum. Başta ailem olmak üzere bu günlere gelmemde emeği olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii

1. GİRİŞ.....	1
---------------	---

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	4
------------------------------	---

2.1. AĞIR METAL TANIMI.....	4
-----------------------------	---

2.2. BAZI AĞIR METALLERİN KULLANILDIĞI ENDÜSTRİ DALLARI.....	4
---	---

2.3. AĞIR METALLERİN ÖNEMİ.....	6
---------------------------------	---

2.4. AĞIR METALLERİN YARARLI VE ZARARLI ETKİLERİ....	7
--	---

2.5. AĞIR METALLERİN HÜCRE İÇERİSİNE TAŞINIMLARI....	10
--	----

2.6. AĞIR METALLERİN TOKSİK ETKİ MEKANİZMALARI....	10
--	----

2.7. MİKROBİYAL AĞIR METAL DİRENÇLİLİK MEKANİZMALARI.....	11
--	----

2.7.1. Geçirgenlik Bariyeri İle Metallerin Hücre Dışında Tutulması.....	15
--	----

2.7.2 Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu.....	16
---	----

2.7.3 Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması.....	17
---	----

2.7.4 Ekstraselüler Alıkonma.....	19
-----------------------------------	----

2.7.5 Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi.....	20
---	----

2.7.6 Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması.....	24
---	----

2.8. DİRENÇLİLİĞİN GENETİK ÖZELLİKLERİ.....	25
---	----

2.8.1. Plazmidler ve Transpozonlar.....	25
2.9. GEN TRANSFERİ.....	29
2.10. DİRENÇLERİN KÖKENLERİ.....	31
2.11. AĞIRMETAL DİRENÇLİLİĞİNİN SEÇİLİMİ VE TRANSFERİ.....	32
2.12. AĞIR METAL DİRENÇLİLİĞİ, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ VE PESTİSİD DEGREDASYONU ÖZELLİĞİ KARAKTERLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER.....	34
2.13. <i>PSEUDOMONAS</i> GENUS’UNUN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	35
2.14. <i>BACİLLUS</i> GENUS’UNUN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	37
2.15. ADSORBSİYON.....	39
2.15.1. Adsorpsiyonun Sınıflandırılması.....	39
2.15.1.1. Fiziksel adsorbsiyon.....	40
2.15.1.2. Kimyasal adsorbsiyon.....	40
2.15.1.3. İyonik adsorbsiyon.....	41
2.15.2. Adsorbsiyonu etkileyen faktörler.....	41
2.15.3. Adsorbsiyon dengesi ve adsorbsiyon izotermi.....	42
2.15.3.1. Langmuir izoterm modeli.....	44
2.15.3.2. Freundlich izoterm modeli.....	45
2.15.3.3. Redlich – Peterson izoterm modeli.....	46
2.15.3.4. Koble-Corrigan izoterm modeli.....	47
2.15.3.5. Temkin izoterm modeli.....	48
2.15.4. Biyosorpsiyon.....	48
2.15.4.1 Biyosorpsiyon Verimi.....	49
2.15.4.2 Biyosorpsiyon mekanizması.....	49
2.15.4.3 Biyosorpsiyon Termodinamiği.....	49
2.15.4.4 Biyosorpsiyon hızı.....	50
2.16. ÇALIŞMANIN AMACI.....	52
3. MATERYAL ve METOT.....	53
3.1. MATERYALLER.....	53

3.1.1. Kimyasallar.....	53
3.1.2. Kullanılan <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. Suşları.....	53
3.1.3. Cam Malzemeler.....	54
3.1.4. İnkübatörler.....	54
3.1.5. Santrifüj.....	54
3.1.6. ICP cihazı.....	54
3.2. METODLAR.....	55
3.2.1. <i>Pseudomonas</i> ve <i>Bacillus</i> Suşlarının Kültür ve Muhafazası.....	55
3.2.2. Besiyerleri ve Alkali liziz solüsyonları.....	55
3.2.2.1. GSP agar.....	55
3.2.2.2. Nutrient agar.....	55
3.2.2.3 Alkali liziz solüsyonu I.....	56
3.2.2.4 Alkali liziz solüsyonu II.....	56
3.2.2.5 Alkali liziz solüsyonu III.....	56
3.2.2.6 Kral suyu.....	56
3.2.3. Bakteri izolasyonu.....	57
3.2.3.1. <i>Pseudomonas</i> sp. İzolasyonu.....	57
3.2.3.2. <i>Bacillus</i> sp. izolasyonu.....	57
3.2.4. MTC (Maximum Tolerable Concentrations) Değerlerinin Tesbiti.....	58
3.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu.....	58
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	59
3.2.7. Ağır metallerin Biyosorpsiyonu.....	60
3.2.8. Toprak örneklerinin ICP analizi için hazırlanması.....	61
4. BULGULAR ve TARTIŞMASI.....	62
4.1. BULGULAR.....	62
4.1.1. İzole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının özellikleri.....	62
4.1.2. Alınan toprak örneklerinin ICP analiz sonuçları.....	62
4.1.3. İzole edilen bakterilerin ağır metallere karşı	

gösterdikleri direnç değerlerine ait bulgular.....	64
4.1.3.1. A1 bölgesinden izole edilen örneklerin MTC dağılımları.....	64
4.1.3.2. B1 bölgesinden izole edilen örneklerin MTC dağılımları.....	67
4.1.3.3. B2 bölgesinden izole edilen örneklerin MTC dağılımları.....	70
4.1.3.4. B3 bölgesinden izole edilen örneklerin MTC dağılımları.....	73
4.1.4. Ağır metal dirençliliği gösteren bakterilerin plazmid içeriklerine ait bulgular.....	76
4.1.5. Referans olarak kullanılan <i>E.coli</i> ATCC11230 örneklerinin seçilen ağır metaller için MTC değerleri.....	79
4.1.6. Seçilen örnek suşların biyosorpsiyonuna ait bulgular.....	79
4.1.6.1. Seçilen Suşların biyosorpsiyon sonuçları.....	79
4.2 TARTIŞMA.....	83
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
Çizelge 1.1: Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları.....	2
Çizelge 1.2 :Topraklardaki ağır metal sınır değerleri.....	3
Çizelge 2.1 : Bazı ağır metallerin yoğun olarak kullanıldığı endüstri dalları.....	5
Çizelge 2.2: Biyolojik açıdan önemli elementlerin periyodik tabloda gösterimi...	6
Çizelge 2.3: Ağır metallerin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.4: Bakterilerde en çok görülen dirençlilik mekanizmaları.....	12
Çizelge 2.5: Doğada bulunan ve bilinen bakteriyel gen transfer mekanizmaları ve onlar etkiliyken özellikleri.....	31
Çizelge 4.1: Alınan toprak örneklerinin mg/kg türünden sonuçları.....	63
Çizelge 4.2 : Alınan toprak örneklerinin ppm/g cinsinden sonuçları ve pH değerleri.....	63
Çizelge 4.3 : En yüksek ağır metal toleransı gösteren bazı suşların içermiş oldukları plazmid dağılımları.....	78
Çizelge 4.4 : <i>E.coli</i> ATCC 11230 suşunun ağır metal MTC değerleri.....	79
Çizelge 4.5 Ağır metallerin adsorpsiyon hızları.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1: <i>E.coli</i> 'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı.....	17
Şekil 2.2 : Bakterilerde çinko dirençliliğinin mekanizması.....	18
Şekil 2.3: <i>Synechococcus</i> 'ta SmtA ve SmtB genleri ve Zn'yi bağlaması.....	19
Şekil 2.4: Gram negatif bakterilerde Hg(II)'ye enzimatik detoksifikasyon ile metal dirençliliği.....	22
Şekil 2.5 : Adsorbsiyon dengesi.....	43
Şekil 2.6 : Doğrusallaştırılmış Langmuir izoterm model grafiği.....	45
Şekil 2.7: Doğrusallaştırılmış Freundlich izoterm model grafiği.....	46
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan <i>Pseudomonas</i> ve <i>Bacillus</i> örneklerinin izole edildiği toprak örneklerinin alındığı yerler; A1, B1, B2, B3....	52
Şekil 4.1: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $K_2Cr_2O_7$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	64
Şekil 4.2: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CdCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	64
Şekil 4.3: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $ZnCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	65
Şekil 4.4: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $NiCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	65
Şekil 4.5: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CoCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	66
Şekil 4.6: A1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CuCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	66

Şekil 4.7: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $K_2Cr_2O_7$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	67
Şekil 4.8: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $ZnCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	67
Şekil 4.9: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $NiCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	68
Şekil 4.10: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CoCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	68
Şekil 4.11: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CuCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	69
Şekil 4.12: B1 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CdCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	69
Şekil 4.13: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $K_2Cr_2O_7$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	70
Şekil 4.14: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $CdCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	70
Şekil 4.15: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $ZnCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	71
Şekil 4.16: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $NiCl_2$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	71

Şekil 4.17: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının CoCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	72
Şekil 4.18: B2 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının CuCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	72
Şekil 4.19: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	73
Şekil 4.20: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının CdCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	73
Şekil 4.21: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının ZnCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	74
Şekil 4.22: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının NiCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	74
Şekil 4.23: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının CoCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	75
Şekil 4.24: B3 bölgesinden izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. ve <i>Bacillus</i> sp. suşlarının CuCl_2 için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı.....	75
Şekil 4.25: En yüksek MTC değerine sahip suşlardan bazılarının plazmid profilleri	76
Şekil 4.26: Plazmid içermeyen yüksek MTC değerine sahip bazı suşların elektroforetik profili	77
Şekil 4.27: <i>Pseudomonas</i> sp. B2P99 nolu suşunun Cu elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi.....	79

Şekil 4.28: <i>Pseudomonas</i> sp. B2P77 nolu suşunun Zn elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi.....	80
Şekil 4.29: <i>Pseudomonas</i> sp. A1P25 nolu suşunun Ni elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi.....	80
Şekil 4.30: <i>Bacillus</i> sp. B1B7 nolu suşunun Cr elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi.....	81
Şekil 4.31: <i>Pseudomonas</i> sp. B3P36 nolu suşunun Co elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

ICP	: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
SDS	: Sodyum dedosil sülfat
DNA	: Deoksiribonikleikasıit
PİT	: İnorganik fosfat alımı
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FAD	: Okside flavin adenin dinükleotid
MTC	: Maksimum tolere edilen derişimi
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
UV	: Ultra viole
a_{RP}	: Redlich Peterson Eşitliğı'ndeki bir sabit (L/mg) ^β
b	: Langmuir Eşitliğı'nde biyosorplananın biyosorbente ilgisini gösteren bir sabit (L/mg)
C_{ad}	: Dengede çözeltide biyosorplanan metal iyon derişimi (mg/L)
C_d	: Dengede çözeltide biyosorplanmadan kalan metal iyon derişimi (mg/L)
C_o	: Başlangıçtaki metal iyon derişimi (mg/L)
$k_{1,ad}$	: Yalancı (Pseudo) 1. mertebe hız sabiti (1/dak.)
$k_{2,ad}$	: Yalancı (Pseudo) 2. mertebe hız sabiti (g/mg.dak)
K_c	: Biyosorpsiyon denge sabiti ($C_{ad,d}/C_d$)
K_f	: Freundlich Eşitliğı'ndeki biyosorpsiyon kapasitesini gösteren bir sabit (mg metal / g hücre) (mg metal / L) ^{-1/n}
K_{RP}	: Redlich Peterson Eşitliğı'ndeki biyosorpsiyon kapasitesini gösteren bir sabit (L/g)
n	: Freundlich Eşitliğı'ndeki biyosorpsiyon şiddetini gösteren bir sabit
q_d	: Dengede birim hücre kütleinde biyosorplanan metal iyonu miktarı (mg metal / g hücre)
Q^0	: Langmuir Eşitliğı'ndeki yüzeyde tek bir tabaka oluşturmak için hücrenin birim kütleinde adsorblanan metal miktarı (mg metal / g hücre)
R	: Evrensel gaz sabiti (8,314 j/mol K)
R^2	: Regrasyon katsayısı
β	: Redlich Peterson Eşitliğı'ndeki bir sabit
t	: Zaman (dak.)
ΔG^0	: Biyosorpsiyon prosesi için serbest Gibb's enerji değışimi (kJ/mol)
ΔH^0	: Biyosorpsiyon prosesi için Entalpi değışimi (kJ/mol)

1.GİRİŞ

İnsan var oluşundan itibaren çevreyi kendi istekleri doğrultusunda kullanmakta ve değiştirmektedir. Nüfusun hızla artışı ve sanayinin hızlı gelişimi çevre sorunlarını gündeme getirmiş; nehirlere, göllere, denizlere arıtılmadan akıtılan bol miktardaki evsel ve sanayi atıkları çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmuştur. Diğer taraftan su ve karasal ekosistemler bilinçsiz ve aşırı kullanılarak önemli ölçüde zarar görmüştür. Tüm bunların sonucu olarak dünya aşırı ve hızlı bir şekilde kirlenmiş olup, çevre sorunları acil çözüm bekleyen problemler haline gelmiştir. Günümüzde dünya ölçeğinde ya da uluslararası boyutlarda dikkati çeken başlıca çevre sorunu örnekleri; hava kirlenmesi, su kirlenmesi, toprak kirlenmesi, ses ve gürültü kirlenmesi, yeşil alan kaybı, sera etkisi, ozon tabakasının delinmesi, biyolojik çeşitliliğin azalması, nükleer kirlilik, asit yağmurları, çölleşme, ağır metaller başta olmak üzere zehirli atıkların yayılması şeklinde sıralanabilir.

Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler. Çizelge 1.1’de yer kabuğunda en bol bulunan 12 element ile daha az bulunan bazı elementler gösterilmiştir (bu elementlerin arasında metal olmayanlar da vardır). En bol bulunan bu 12 elementin toplam kütlesi, yer kabuğu kütlesinin %99,4’ü kadardır. Eser elementler veya metaller çevre kirlenmesi bakımından, bol bulunan elementlerden çok daha tehlikelidir [1].

Ağır metallerin jeolojik nedenlerle oluşan çevredeki doğal dağılım deseni son yıllarda antropojen etki ile önemli ölçüde değişmeye başlamıştır [2]. Antik çağlarda metal cevherlerinin işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimler dışında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamışlardır.

Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metalleri etkilerini bilmeden takı, silah, su borusu vb çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Örneğin; bakır çok kolay işlenir: dövme suretiyle kolaylıkla biçim verilebilir. İyi bir elektrik iletkeni olduğundan,

elektrik telleri ve kabloları bakırdan yapılır. Aynı zamanda iyi bir ısı iletkenidir ve uzun süre ev işlerinde kullanılmıştır (tabaklar, tencereler, kazanlar v.b.). Başka madenlerle karıştırılınca bakır, alaşımlar meydana getirir; bunların en önemlileri pirinç ve bronzdur. Başka bir örnek olarak kromu verebiliriz. Krom çeliğin sertleştirilmesinde, paslanmaz çelik yapımında ve daha birçok yararlı alaşım yapımında kullanılır. Bu alaşımlar sert ve parlak bir yüzeye sahip olup kaplamada ve paslanmayı engellemede kullanılır. Krom camların yapısına katılarak onlara zümrüt yeşili rengini verir. Ayrıca yüksek erime sıcaklığı, yeterli ısısal genleşme ve kararlı bir kristal yapıya sahip olduğundan tuğla yapımında da kullanılır.

Çizelge 1.1: Başlıca elementlerin yer kabuğundaki konsantrasyonları [1].

Element	Konsantrasyon (ppm)	Sırası
Bol oranda bulunanlar		
*Oksijen	466000	1
*Silisyum	277200	2
Alüminyum	81300	3
Demir	50000	4
Kalsiyum	36300	5
Sodyum	28300	6
Potasyum	25900	7
Magnezyum	20900	8
Titan	4400	9
*Hidrojen	1400	10
*Fosfor	1180	11
Mangan	1000	12
Eser oranda bulunanlar		
Baryum	425	14
Vanadyum	135	19
Nikel	75	23
Çinko	70	24
Bakır	55	26
Kurşun	12,5	36
Berilyum	2,8	46
Uranyum	2,7	48
Kalay	2	51
Kadmiyum	0,2	63
Civa	0,08	67
Gümüş	0,07	68
Altın	0,004	71
* Metal olmayanlar		

Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmış ve ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk tanımlanan zehirlenmeler Japonya’da ortaya çıkmıştır. Ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil, aynı zamanda besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Topraklardaki ağır metal kirliliği, endüstrinin ve madencilik aktivitelerinin gelişmesiyle ve atık suyla yapılan sulamaların ve arıtma çamuru uygulamalarının yaygınlaşmasıyla global bir problem haline almaktadır [3].

Topraklardaki ağır metallerin, eğer miktarları topraktaki normal başlangıç değerlerinden fazla ise mikro kirlleticiler olarak bilinirler. Topraktaki ağır metallerin en tehlikeli yanı, bitkilerin yapısına girmeleri, hareketli hale geçtiklerinde (serbest iyon haline geçtiklerinde) taban suyuna karışarak suyun niteliğini bozmaları, mikroorganizmalara zarar vermeleri ve besin zinciri ile diğer canlılara geçerek dolaylı yollardan zararlı olmalarıdır. Ağır metallerin özellikle belirli dozlardan itibaren canlılardaki fizyolojik fonksiyonları ve biyokimyasal olayları direkt veya dolaylı olarak etkilediği bilinmektedir. Çizelge1.2’de topraklardaki ağır metal sınır değerleri verilmektedir.

Çizelge 1.2 :Topraklardaki ağır metal sınır değerleri [4].

Ağırmetal	pH≤6 mg/kg fırın kuru toprak	pH>6 mg/kg fırın kuru toprak
Kobalt	20	20
Kadmiyum	1**	3**
Krom	100**	100**
Bakır*	50**	140**
Nikel*	30**	75**
Çinko*	150**	300**
Civa	1**	1,5**

* pH değeri 7’den büyük ise Bakanlık sınır değerleri %50’ye kadar arttırabilir.

** Yem bitkileri yetiştirilen alanlarda çevre ve insan sağlığına zararlı olmadığı bilimsel çalışmalarla kanıtlandığı durumlarda, bu sınır değerlerin aşılmasına izin verilebilir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. AĞIR METAL TANIMI

Bütün elementlerin çok büyük bir kısmı, onların oksitler ve hidroksitler gibi kararlı olan ve katyonik özellikli formlarına göre karakterize edilirler. Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ten daha yüksek olan ($\rho > 5 \text{ g/cm}^3$) metaller için kullanılır. Bu gruba; kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak ve bakteriyel hücreye girebilenler katyon ve oksianyon (As, Cr, U) olarak bulunurlar.

2.2. BAZI AĞIR METALLERİN KULLANILDIĞI ENDÜSTRİ DALLARI

Ağır metaller ve tuzları çevresel kirleticilerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayılımı söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton kadmiyum, 18800 ton arsenik, 3600 ton civa, 332000 ton kurşun atmosfere atılmakta iken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selen (19 kat), kadmiyum (8 kat), civa, kurşun, kalay (6 kat), arsenik, nikel ve krom (3 kat) daha fazladır [5, 6].

Ağır metallerin özellikle sucul ortamlara hem doğal kaynaklardan, hem de insan aktiviteleri sonucu evsel ve endüstriyel atıklarla ulaşabildiği bilinmektedir [7]. Doğa için en önemli kirliliklerden biri ağır metaller tarafından meydana getirilmektedir. Bugün sanayide 40'dan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir. Ağır metaller tarafından meydana getirilen kirlilik insan sağlığını tehdit eder bir seviyeye ulaşmıştır [7]. Ağır metallerin çevreye yayılımında etken

olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir.

Çizelge 2.1 : Bazı ağır metallerin yoğun olarak kullanıldığı endüstri dalları [8].

Endüstri Dalı	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt, Karton ve Selüloz Sanayii	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Organik Kimyasallar, Petrokimya Sanayi	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Alkaliler, Klor, İnorganik Kimyasallar	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Kimyasal Gübreler	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Petrol Rafinerileri	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Demir, Çelik Dökümhaneleri	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Demir, Çelik Dışındaki Metal Sanayi	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Motorlu Taşıt ve Uçak Kaplamasında	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Cam, Çimento ve Asbest Üretiminde	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tekstil Sanayi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Deri Tabaklaması	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Buhar Gücüyle Çalışan Elektrik Sanayii	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi metaller ve özellikle de ağır metaller endüstriyel açıdan çok kullanılan elementlerdir. Örneğin; kurşun dünya çapında çok fazla işlenip rafine edilen bir elementtir. Rafine edilen kurşunun %40’ı akümülatör yapımında kullanılmaktadır. Kadmiyum, mil yataklarında sürtünmeye karşı, boyacılıkta kurşun ve bakırla alaşım yapmada kullanılmaktadır [9].

Ağır metaller, su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir.

Doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerin kullanımı ile insanlar bütün organizmaların seçici çevresini değiştirmiştir. Bu, özellikle bakteriler gibi çok kısa üreme zamanlarına sahip organizmalar üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Ağır metallerin ve bazı organik bileşiklerin yaygın üretimi ve kullanımı; çeşitli organik

bileşikleri parçalayabilme yeteneği ile ağır metallere karşı direnç içeren belirli genotipler için seçici olarak bakteriyel çevreyi değiştirmiştir [10].

2.3. AĞIR METALLERİN ÖNEMİ

Peryodik tabloda (Çizelge 2.2) bulunan elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal olarak rol oynarlar. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, işte o zaman katalitik olarak rol oynarlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin sentezinde pek çok element gereklidir. Bu ise elementlerin yapısal fonksiyonudur ve element, son ürünün vazgeçilmez bileşenidir [11].

Grup	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Peryod																		
1	H																	He
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn

	Önemli temel elementler, bütün yaşam türleri
	Önemli katyonlar, bütün yaşam türleri
	Önemli anyonlar, bütün yaşam türleri
	Gerekli iz elementler, bütün yaşam türleri
	Özel kullanımlarda gerekli, bazı yaşam türleri
	İndirgenmiş ve/veya metillenmiş durumda transfer edilebilir, bazı mikroorganizmalar
	Etkisi bilinmeyen veya bilinmeyen biyolojik fonksiyonlara sahip elementler
	Biyolojik açıdan önemli geçiş elementleri

Çizelge 2.2: Biyolojik açıdan önemli elementlerin peryodik tabloda gösterimi [12]

Ağır metallerin bolluğunun temeli, fizyolojik durumlarına bağlı olarak çözünürlük ve toksisitedir. Metallerin indirgenmesini 3 grupta inceleriz. Çizelge 2.3'te de görüldüğü gibi ağır metaller; önemli düşük toksisiteli iz elementler, orta önemlilikteki toksik iz elementler ve sınırlı faydası olan toksik elementler olarak üç gruba ayrılması mümkündür.

Çizelge 2.3: Ağır metallerin sınıflandırılması [13]

Önemli iz elementler/düşük toksisiteli	Fe,Mo,Mn
Yüksek/orta önemlilikteki iz elementler/toksik	Zn,Ni,Cu,V,Co,W,Cr
Sınırlı faydası olanlar/toksik	As,Ag,Sb,Cd,Hg,Pb,U

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve bir çok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır [14]. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi biyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan cıvadır [15].

2.4. AĞIR METALLERİN YARARLI VE ZARARLI ETKİLERİ

Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır. Örneğin; hegzavalent krom (Cr^{6+}) trivalent kroma (Cr^{3+}) göre daha toksiktir [16,17]. Krom üç bileşikleri kullanılan işletmelerde çalışan insanlarda kanser vakalarına rastlanmamıştır, ayrıca Cr^{3+} ile yapılan testlerde deney hayvanları üzerinde herhangi bir negatif etki gözlenmemiştir. Kimyasal ve biyolojik olarak kararlı özellik gösteren Cr^{3+} (oksidant değildir, tahrip edici değildir, hücre zarına geçmez...) kanserojen bir madde olarak düşünülmemektedir. Ancak Cr^{6+} hücre zarından kolaylıkla geçerek Cr^{3+} a indirgenir. Hekzavalent kromun biyolojik

etkisi bu indirgenme reaksiyonundan kaynaklanır. Cr^{6+} hücre içindeki öğelere Cr^{3+} gibi bağlanarak bu öğelerin fonksiyonlarına zarar verdiği ve bu redüksiyonun toksik özellik taşıdığı varsayılmaktadır [18].

Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin, nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması derişime bağlı olarak değişir. Örneğin, krom başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine ve oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metallerin derişimi dikkate alınmalıdır. Örneğin, metaller mikroorganizmaların yaşamlarında önemli roller alırlar. Kalsiyum, kobalt, krom, bakır, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi bazı metaller ihtiyaç duyulan besinler olduğundan gereklidirler. Bunların dışında kalanların (gümüş, alüminyum, kadmiyum, kurşun ve civa) herhangi bir biyolojik fonksiyonları yoktur. Hücre için en önemli olan metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesinde rol alırlar. Bazıları proteinlerin yapısına katılır, bazıları da bakteri duvarında yer alarak ozmotik balansın korunmasında görev yapar [19,20]. Demir, bakır ve nikel gibi metaller redoks prosesinde görev yaparlar. Bunun dışında magnezyum ve çinko gibileri çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize eder. Demir, magnezyum, nikel ve kobalt çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. Sodyum ve potasyum, intraselüler ozmotik basıncın düzenlenmesi için gereklidir.

Metaller yüksek derişimlerde olduklarında mikroorganizmalar ve diğer organizmalar için toksiktir. Toksisite gerekli metallerin kendi doğal bağlanma yerlerinin değiştirilmesi sonucu gerçekleşmektedir [19]. Gerekli olmayan metaller tiol taşıyan gruplara ve oksijen bulunan bölgelere, gerekli olan metaller yerine yüksek bir affinite ile bağlanırlar. Nükleik asitlerin ve proteinlerin konformasyonlarının bozulması oksidatif fosforilasyon ve ozmotik dengede oluşan bozukluklar sonucu hücrede toksisite görülür. Örneğin, aşırı dozda kadmiyum alınımları (60-480 $\mu\text{g/g}$ böbrek) böbrekler üzerinde tahrip edici etkinin ortaya

ıkmasına yol açmaktadır ve etki kuşlarda dahil olmak üzere tüm canlılarda görülmektedir. Kadmiyum zehirlenmesine bağlı olarak kemik erimesi ve buna bağlı hastalıklar da görülür. Diğer taraftan kansızlık, dişlerin dökülmesi ve koku duyumunun yitilmesi de önemli etkilerdir [21,22]. Dünya sağlık örgütünün 1993 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre kurşun 1. sınıf kansorejendir [15]. Kurşunun çoğu kemiklerde depolanmasına rağmen beyne, anne karnındaki cenine ve anne sütüne de geçebilmektedir. Bebekler ve çocuklarda düşük olan kurşun oranı, ilerleyen yaşla beraber, kurşuna maruz kalınmasıyla artış göstermektedir. Kanda 40 mg/L seviyesini aşınca tansiyon artırıcı etki de ortaya çıkar. Diğer taraftan kronik kurşun alınımlı ile sperm sayısı ve morfolojisi de sınırlanır.

Dünya sağlık örgütünün 1995 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre kurşun 2. sınıf kansorejen gruptadır [23]. Kkrtdioksinin gllerde parazit olarak yaşayan *Diplocarpon rosae* ve *Sphaerotheca pannosa* funguslarının görülme sıklıklarını azalttığı saptanmıştır [9]. Yapılan çalışmalarda bitki dokularında ağır metal birikimi fazla olursa mineral besin alımı [24], transpirasyon [25], fotosentez [26], enzim aktivitesi [27], nükleik asit yapısı [28], klorofil biyosentezi [29] ve çimlenme [30] gibi çok sayıda olay olumsuz yönde etkilenir. Bunlara membranlarda hasar [31], hormon dengesinin bozulması, su ilişkisinin değişmesi gibi fizyolojik olaylar da eklenebilir. Yapılan başka bir çalışmada ise ağır metal iyonlarının *Clivia* sp. bitkisinin polenlerinin çimlenmesini ve tp büyümesini azaltıcı etkileri olduğu rapor edilmiştir [32]. Özellikle hava kirleticilerinin makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal seviyede bitkilerde vejetatif organları önemli derecelerde etkilediği çok sayıda çalışma ile tespit edilmiştir [33, 34, 35, 36]. Fakat kirlilik sadece vejetatif organları değil, aynı zamanda generatif organları da etkilemektedir. Polenler hava kirleticilerinden en çok etkilenen yapıların başında gelir. Toksik seviyedeki kirleticilerin polen çimlenmesi ve tp gelişimi üzerinde önemli etkileri vardır. Kadmiyum, kobalt, bakır, çinko, kurşun, demir ve civa gibi ağır metal iyonlarının polen çimlenmesi ve tp büyümesini engellediği, polen tüpünün ultrastrktrn bozduğu çeşitli araştırıcılar [37, 38, 39, 40, 41] tarafından rapor edilmiştir. Laboratuvar şartlarında kkrtdioksinin polen çimlenmesini ve tp büyümesini engellediği çok sayıda çalışmayla [42, 43, 44, 45] tespit edilmiştir.

Yine çeşitli hava kirleticilerinden hidrojen floridler (HF)'in [46,47], eksoz gazlarının [48], asit yağmurlarının [49] ve azot oksitleri (NOx)'nin [50] değişik bitki polenlerinde gerek çimlenme ve gerekse tüp büyümesini engellediği rapor edilmiştir. Yapılan araştırmalarda özellikle bakterilerin metallere karşı kromozomal, plazmid ve transpozon kökenli direnç mekanizmaları geliştirmiş oldukları rapor edilmiştir.

2.5. AĞIR METALLERİN HÜCRE İÇERİSİNE TAŞINIMLARI

Katyonların çoğu benzer büyüklükte oldukları için (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} “ hepsi 138-160 pm arasında değişen çaplara sahiptirler) hücreler genelde alım boyunca, fizyolojik istekleri ile toksik metaller arasında ayırım yapmazlar. Metal katyonların çoğu, hücre membranlarından içeriye özgül olmayan ve hızlı kemoosmotik alım sistemleri çalıştırılarak veya Mg alım sistemi aracılığı ile taşınır. Bunlar spesifik olmayan taşıyıcılarla oluşturulur. Bir toksik metalin ekstraselüler konsantrasyonu yüksek olduğundan dolayı o metal yüksek konsantrasyonlarda biriktirilebilir. Bu açık kapı ise ağır metal toksisitesinin nedenidir [51, 52, 53, 54].

Oksianyonlar (AsO_4^{-3} , CrO_4^{-2}) spesifik olmayan PİT (Phosphate Inorganic Transport = inorganik fosfat alımı) ve sülfat alım sistemi aracılığı ile yapısal ve yüksek benzerliklerden dolayı alınır.

Düşük derişimlerde, hücreler indüklenmiş metal taşıma sistemleri içerir, bu genelde sınırlı koşullar altında ifade edilir.

2.6 AĞIR METALLERİN TOKSİK ETKİ MEKANİZMALARI

Metal katyonlar aminoasitlerin içinde bulunan SH gruplarını bağlayabilir, bu nedenle enzim inhibe olur. Bir benzer eğilim de, çeşitli metal katyonların toksisitesinin metalsülfit çözünürlüğünün ürünü olduğu sonucu çıkarılabilir. Örneğin toksisite durumunda; HgS ($6,38 \times 10^{-53}$), CdS ($1,4 \times 10^{-29}$), ZnS ($2,91 \times 10^{-25}$).

Katyonik metal, fizyolojik iyonlarla etkileşime girerek toksisiteye etki yapabilir: Cd^{+2} - Zn^{+2} veya Ca^{+2} ile, Ni^{+2} ve Co^{+2} ise Fe^{+2} ile, Zn^{+2} 'da Mg^{+2} ile inhibisyona girerek uygun fizyolojik katyonun fonksiyonunu durdurabilir. Oksianyonlar, krom ve arsenat, sülfat ve fosfat ile etkileşime girebilirler [51, 52, 53, 54]. Laboratuvar denemelerinde Cr^{6+} nın kanserojen özelliği tespit edilmiştir ve kanserojen etkinin özellikle bronş sisteminde etkili olduğu bildirilmiştir. Krom ile uzun süreli temas durumunda kimyasal kanserojendir. Kromatlama yapan ve krom üretiminde çalışan işçiler üzerinde yapılan araştırmalarda, cevherden dikromatların ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) üretilmesinde ve izolasyonunda çalışan işçilerde bronşit kanserinin arttığı tespit edilmiştir. Kanser oluşum mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber Cr^{6+} 'nın çift-iplikli deoksiribonükleik asit (DNA) ile bağlandığı kabul edilmektedir. Dolayısıyla, Cr^{6+} gen kopyalanmasını, onarımını ve duplikasyonunu değiştirmektedir [18].

Gram-negatif bakterilerde, metal katyonlar glutatyona bağlanabilirler. Bisglutasyonun moleküler oksijenle etkileşime girerek bisglutatonat bileşiklerinin oluşmasının nedeni, metal katyon ve hidrojen peroksit'tir. Bisglutasyonun glutatyona geri indirgenmesi için NADPH-ağır metal kompleksinin yüksek oranda oksidatif stres yapması gerekir.

2.7. MİKROBİYAL AĞIR METAL DİRENÇLİLİK MEKANİZMALARI

İnsanlar dünya üzerinde baskın bir etken olarak bir çok organizmanın evrimine şekil vermiştir. Bazı durumlarda, organizmaların evrimsel cevabındaki sapmaların insanlar ve çevresel sağlık için anlamları çok derin olmuştur. Hiçbir yerde bu etki, bakterilerin; antibiyotiklere, ağır metallere ve pestisidlere olan evrimsel yanıtından daha belirgin olmamıştır [10]. Bakteriler aynı biyokimyasal ve genetik prensiplere uygun olarak çalışırken, daha hızlı evrimleşme için ayırıcı olan belirli özellikler açısından çok hücreli ökaryotlardan farklıdırlar. Bakterilerin sadece üreme zamanları kısa değildir (*Escherichia coli*'nin optimum şartlar

altındaki duplikasyon süresi 20 dakikadır), ayrıca genetik farklılıkları da yüksektir [55]. Bakterilerdeki dirençlilik biçimleri kısaca Çizelge 2.4’da gösterilmiştir.

Çizelge 2.4: Bakterilerde en çok görülen dirençlilik mekanizmaları [10].

Degredasyonun ve dirençliliğin en çok rastlanan bakteriyel mekanizmaları					
Ajanlar	Ajanın inaktivasyonu	Hedefin modifikasyonu	Ajanın aktif akımı	Ajanın hücre içine girme yeteneğinin azaltılması	Hücre içinde ajanın tutulması
Antibiyotikler	X	X	X	X	X
Ağırmetaller	X		X	X	X
Pestisidler	X				

Metal ihtiva eden çevrelerdeki selektif baskılar, tüm toksik metallere karşı belli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır[56]. Bu direnç mekanizmalarının büyük bir kısmı plazmid kökenlidir. Bu konuda çalışılan mikroorganizmalar daha çok, *Staphylococcus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* türlerini kapsamaktadır [57]. Dirençlilik *Bacteroides* ve *Clostridium* türlerinde de civa ve organo civalar için dirençlilik bildirilmiştir.

Metallere karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayat başladıktan hemen sonra gelişmiştir. Çünkü bakterilerin geliştiği ortamlarda metaller her zaman var olmuşlardır [58]. Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir [57,59]. Çünkü her iki tip dirençde organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik kullanımından önce rapor edilmiştir [58].

Hücre için besin olarak alınan bazı metaller yüksek derişimlerde olduğunda ise hücre için toksik etkiler yapmaktadır. Örneğin kobalt, nikel, bakır ve çinko böyledir [58]. Hücre için gerekli olan bu metaller;

- Pek çok enzimin yapısındaki kofaktörleri oluştururlar.
- Bazı metaller, hücrenin oksidasyon- redüksiyon sistemlerinde kullanılır.

- Bazı metaller, gen ekspresyonunda ve biyomoleküllerin aktivitesi için önemli görevler üstlenmişlerdir.

Bir metalin yükünün veya değerliğinin oksidoredüksiyon aracılığı ile değişimi, düzenleme ve direnç için gereklidir. Bu, hücre dış yüzeyinde elektron taşıma sistemleri ve indirgeyici enzim sistemleri aracılığı ile başarılı ki bakterilerde metal iyonlarının hareketini ayarlamaya ve detoksifiye etmeye izin verirler. Kromun $[Cr^{6+}]$ indirgenmesi buna bir örnektir. Bakteriler Cr^{6+} 'yı aerobik ve anaerobik şartlar altında, elektron taşıma sistemleri aracılığıyla sitokromlarda tutarak indirgeyebilirler. Bu direnç, plazmid veya kromozomun her ikisinden birinde şifrelenmekte ve çoğunlukla fakültatif anaeroplarda bulunmaktadır.

Hücre içi metal konsantrasyonunu düzenlemek için ana yol membran taşıma mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Normal şartlarda, gerekli olan ve olmayan metal iyonlarının her ikisi de bir organizmanın içine spesifik olmayan alım sistemleri aracılığı ile taşınabilir. Fakat ortamda metal iyonlarının fazla olduğu bir durumda gerekli olmayan metallere spesifik iyon akış (efflux) sistemleri aracılığı ile o metalin hücre içine alınması engellenir. Gerekli olan fosfatların alınımı sırasında, zehirli metal olan arsenatın dışarıda bırakılması buna bir örnektir. Hücre normal mekanizmalardan yüz kat daha büyük bir spesifikite ile fosfat alırken, daha spesifik bir sistemin aracılığı ile arsenata karşı ayırt edebilir. Diğer organizmalar arsenat (As^{5+}) veya Cd^{2+} akış pompaları gibi çok daha spesifik bir düzeyde metal direnç mekanizmaları geliştirebilirler.

Metal iyonlarının varlığı, genlerdeki enzimatik detoksifikasyon özellikleri aracılığı ile metal dirençliliğini başlatmayı daha fazla düzenleyebilir [60,61]. En önemli örnek, civa dirençliliğinde mer operon'undaki Hg^{2+} direnç kodudur. Civa, tiyollere son derece affinite gösterdiğinden dolayı son derece zehirlidir. Enzimlerin bir kısmı ve diğer gerekli hücresel proteinler için gerekli olan tiyolleri inaktive eder. Bakteriler bir direnç operonundan kaynaklanan genlerin bir grubunun yavaş yavaş gelişmesi aracılığıyla Hg^{2+} nin varlığına adapte olabilmektedirler. Bu

operonun gen ürünleri sadece Hg^{2+} detoksifiye etmekte etkili değil, ayrıca taşınmada ve kendi kendine düzenlenmede de etkilidir [62,63].

Kromozomal ve plazmide dayalı temel metal dirençlilik sistemleri arasında bazı farklar vardır. Temel metal dirençlilik sistemleri genelde kromozom kökenlidir ve plazmid sistemlerinden daha komplekstir. Diğer organizmalara hızlı bir şekilde taşındıkları için ve gen üzerinde ki taşıma yükünü azalttıkları için iyon akış mekanizmalarının plazmidler üzerinde taşınmaları çok büyük bir olasılıktır.

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

Metallere direnç içeren altı mekanizmanın olduğu varsayılır [56]. Bazı araştırmacılar intra- ve ekstrasellüler alı koymayı mekanizmanın bir tipi olarak sınıflandırır. Doğal direnç metaller veya hücre membran bileşenlerinde değişiklikler ile etkileşimi önlemek için, hücresel bileşenlerde mutasyonal formları alabilirler [56]. Mikroorganizmalar bir veya birkaç direnç mekanizmasının bir kombinasyonuna sahip olabilmektedirler.

Mikroorganizmaların geliştirdikleri metal dirençlilik mekanizmaları;

- 1) Geçirgenlik bariyeri ile metallerin dışarıda tutulması,
- 2) Metallerin hücreden dışarı doğru aktif transportu (Efflux)
- 3) Metalin proteine bağlanması yolu ile hücre içinde alıkonması,
- 4) Ekstrasellüler alıkonma,
- 5) Metallerin daha az toksik formlara dönüştürüldüğü enzimatik detoksifikasyon,
- 6) Metallerin etki ettiği hücresel komponentlerin metal hassasiyetinin azaltılması.

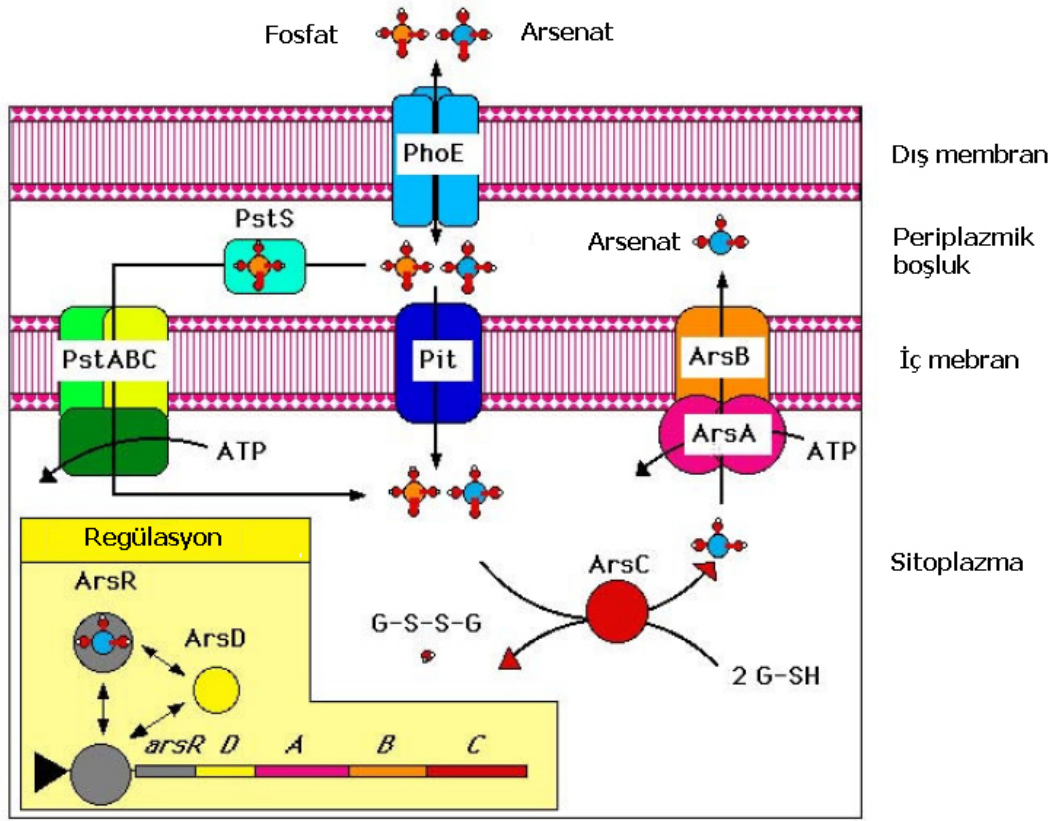
2.7.1 Geçirgenlik Bariyeri İle Metallerin Hücre Dışında Tutulması

Hücre duvarında ya da hücre zarında metale karşı bir geçirgenlik bariyeri oluşturularak metaller hücre dışında tutulur. Böylece metale hassas hücresel komponentler korunmuş olur. Buna en güzel örnek *E.coli*'deki Cu^{2+} dirençliliğidir. *E.coli*'de bir membran kanal proteini olan porin proteinleri'nin üretimi değiştirilerek Cu^{2+} 'nin hücreye girişi engellenir [56]. Bu tek bir gen mutasyonu sonucu membranın metal iyonlarına karşı permeabilitesinin azaltılması ile gerçekleşmektedir [58]. Diğer bir örnek, dış membran veya zarf tarafından spesifik olmayan metallerin bağlanmasıdır. Bu örnekler bağlayıcı yerlerin doygunluğu nedeniyle kısıtlı metal koruma sağlamaktadır. Tamamen ispatlanamasa da bakır dirençliliğinin bazı biçimlerinin periplazmik bağlayıcılık özelliği üzerine kurulu olduğuna inanılmaktadır [64]. Diğer taraftan mikroorganizmaların dış yüzeyini kuşatan ekstraselüler polisakkarit tabakası da metal iyonlarını absorblayarak hücre içine girişini engellemektedir [65]. Bu ekzopolisakkarit tabakasının metal iyonlarını bağlayıcı grupları vardır. Bu özellik *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus* gibi bakterilerde gösterilmiştir. Diğer bazı bakterilerdeki Cd^{2+} dirençliliği de böyledir. Ekzopolisakkaritten oluşan bir koruyucu tabaka Cd^{2+} çözeltilerinde *K. aerogenes* türlerinin hassasiyetini düzenlemektedir. Ekstraselüler koruyucu tabakası olmayan türlerde de Cd^{2+} birikimi ispatlanmıştır [66]. *K. aerogenes*'in ekstraselüler kapsülü kapsülsüz formlara benzediği zaman Cd'un 1 nM'nın girişini engelleyebilmektedir. *P. putida* etsuyuna eklenen 2,5 mg/L derişimindeki Cd^{2+} un tamamını bağlayabilmekte olduğu [65], *A.viscosus*'un türleri etsuyuna 100 mg/L katıldığı zaman Cd^{2+} 'un 30 mg/g'ını biriktirebildiği rapor edilmiştir. Her iki durumda bağlayıcı özellik pH'ya bağımlıdır ve optimum pH 4-9 arasındadır. Eksopolisakkarit tabaka tek başına Cd^{2+} bağlayıcılığında, ekstrasellüler tabakası sağlam bir mikroorganizma gibi verimli değildir. Bu koruyucu tabaka, duyarlı hücresel bileşenler için metal iyonlarını tutarak alımı önlediği görülmektedir.

Pseudomonas sp.'de bulunan bir operonda kodlanmış olan dört genin Cu^{2+} 'nin periplazmik bağlayıcı özelliğinin kodları olduğu bulunmuştur. Bunlar; *copA*, *copB*, *copC*, *copD*'dir. Cu^{2+} dirençliliği; *copA*, *copB* ile *copC*, *copD*'nin özelliklerinin toplamının eklenmesi şartıyla sağlanmaktadır. *copA* ve *copC* proteinleri iç ve dış membranlar arasında ve *copB* ise dış membranda bulunmaktadır. Bu proteinlerin lokalizasyonu, periplazmik bağlayıcı veya ekstrasellüler alıkoyma her ikisinden dolayı direnç hipotezini destekler görünmektedir. *Staphylococcus aureus*'un bazı türlerinde, peniklinaz'ın kodlarını bulunduran plazmidler, hücre membranı değişimi aracılığı ile Cd^{2+} geçirgenliğini engellemede diğer metaller kadar iyi direnç oluşturmada araç olabilmektedir. Bu durum metal iyonlarının girişini engellemek için zardaki uyumsal değişimler olarak görülmektedir. Bu Cd^{2+} un 0,01-0,1 nM seviyelerinde genelde düşük düzeyde direnç olarak görülür [59].

2.7.2 Metallerin Hücre Dışına Doğru Aktif Transportu

Aktif transport ya da akış sistemleri metal dirençlilik sistemleri arasında en yaygın olan mekanizmalardır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transport mekanizmasını kullanırlar. Bu mekanizma, kromozomal ya da plazmid kodlu olabilir. Hücre için gerekli olmayan metaller hücreye normal besin transport sistemleri ile alınır, ancak hemen dışarıya atılır. Bu pompalama sistemleri ATPaz'a bağımlı yada ATPaz'dan bağımsız sistemler olabilir [67]. Bakterilerdeki arsenat, kadmiyum, bakır dirençlilikleri çoğunlukla bu tip dirençlilik mekanizmaları ile gerçekleşir. Örneğin arsenat dirençliliği için *ars* operonu aracılığı ile *E.coli* (Şekil 2.1) ve *S.aerous*'ta; Cd(III) direnç kodu *cad* operonu aracılığı ile *S.aureus*, *Bacillus* sp., ve *Listeria* sp'de, veya *Alcaligenes eutrophas*'ta *eze* operonu bulunmuştur. Pb^{2+} direnci *zntA* aracılığı ile *E.coli*'de ve *cadA* ise *S.aureus* ta bulunmuştur. Bu tip dirençlilikte kromozomal, plazmid ya da transpozon kodlu bazı genler rol oynamaktadır [58].



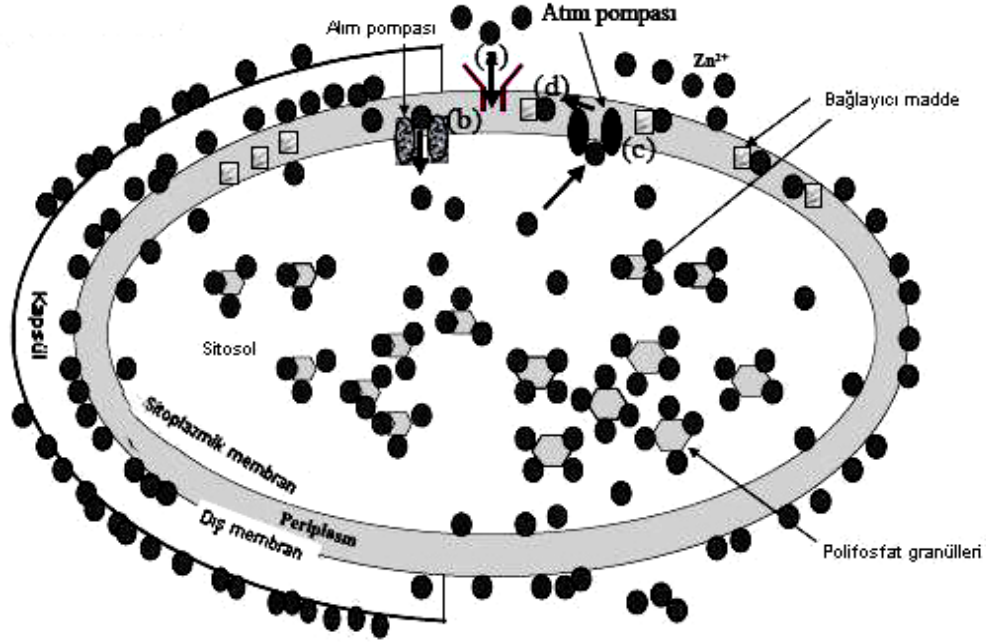
Şekil 2.1: *E.coli*'de arsenik'in hücre dışına aktif taşınımı [68]

Bakır mikroorganizmaların çoğu için gerekli bir besindir, bununla birlikte, (Cu^{2+}) serbest iyonik formu yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Bu çift etkinin ışığında, bakteriler orta seviyelerdeki hücre içi konsantrasyonlarda yaşayabilme yeteneğindedirler. *Pseudomonas syringae pv tomato*'da bakırın tutulması da dahil diğer mekanizmalar tanımlanmasına rağmen bakır dirençlilik mekanizmalarının en iyi çalışılanı hücreden bakırın pompalanması sistemine dayanmaktadır. (Örneğin; *E. coli* ve *Enterococcus hirae*) [69]. Bakır dirençliliğinin başka bir potansiyel mekanizması, kapsülasyon aracılığı ile hücreden çıkarma yoluyla olmaktadır [10].

2.7.3 Metallerin Proteinlere Bağlanarak Hücre İçinde Alıkonması

Hücre içi alıkonma, metallerin birikiminde sitoplazma içindeki gerekli olan hücresel bileşimlerin etkilenmesini engellemektedir. Bu mekanizma ile genellikle Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} metalleri alıkonmaktadır (Şekil 2.2). Bu tip metal dirençliliğine 2 örnek bulunmaktadır.

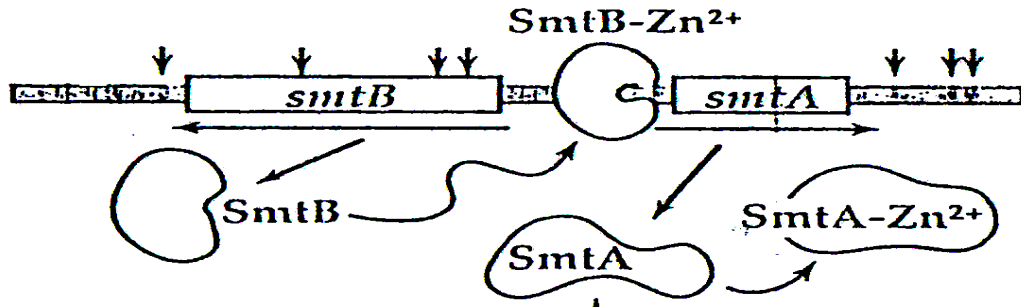
- a) *Synechococcus* cinsinde metallothionein üretimi,
b) *Pseudomonas* cinsinde sistein bakımından zengin proteinlerin üretimi [70].



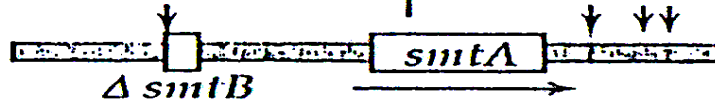
Şekil 2.2 : Bakterilerde çinko dirençliliğinin mekanizması; dış membran üzerinde ekstrasellüler bağlama; spesifik ve non-spesifik yollarla alındıktan sonra çinko iyonlarının akış pompası (P-tipi ATPaz veya Proton antiporterları) aracılığı ile dışarı aktif taşınımı; periplazmik, sitoplazmik proteinler veya diğer polifosfat granülleri gibi ligandlar aracılığı ile alıkoyma [71].

Synechococcus denizlerde yaşayan bir Cyanobacteria'dır. Bu mikroorganizmada *smtA* ve *smtB* olmak üzere iki gen bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bunlardan *SmtA*, Cd²⁺ ve Zn²⁺'ye bağlanan bir metallothioneini kodlamaktadır. Bu gen yüksek düzeydeki Cd²⁺, Zn²⁺ ve Cu²⁺ konsantrasyonlarında indüklenmektedir. *smtB* geni de *smtA* geninin repressörü olan *smtB* proteinin üretilmesinden sorumludur. Bu repressör protein metallothionein üretimini transkripsiyon aşamasında durdurmaktadır.

A. İndüksiyon



B. Delesyon



Şekil 2.3: *Synechococcus*'ta *smtA* ve *smtB* genleri ve Zn'yı bağlaması [72]

Prokaryotlarda metallothionein üretimi sadece *Synechococcus* türlerinde görülmektedir. Bu tip metallothionein ökaryotlardaki metallothionein'lerde bulunanlardan daha az sistein kalıntıları içermektedir. SmtA'daki metalothioneindeki sistein kalıntıları, çok zehirli katyonlar için bir azaltıcı olarak davranabilmektedir. Son zamanlarda SmtB'nin yapısı belirlenmiştir. SmtB proteini DNA'nın diğer bağlayıcı proteinlerine benzer motifli döner sarmal yapılu bir dimerdir. Yapı analizi proteinde dört Zn^{2+} bağlayıcı yer göstermektedir [73]. Metallerin hücre içinde alıkonmasına ilişkin diğer bir örnek de *Pseudomonas putida*'da görülmektedir. Bu bakteri metallothioneinlere benzeyen 3 farklı sistein bakımından zengin protein üretmektedir. *Mycobacterium scrofulaceum*'da siyah bakır sülfat formunun çökmesinde alıkoyma aracılığı ile hücre içi birikimi de ispatlanmıştır [64].

2.7.4 Ekstraselüler Alıkonma

Bu tip metal dirençliliğinin önceleri sadece bakterilerde olduğu düşünülmüşse de, daha sonraları, maya ve funguslarda da bulunmuştur [74]. *Saccharomyces cerevisiae*'deki Ni^{2+} dirençliliğinin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* fazla miktarda glutatyon üreterek Ni^{2+} absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Glutatyon ağır metallere çok yüksek bir affinite ile bağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar mayaların metalce zengin besi ortamlarına ekstraselüler glutatyon salgıladıklarını göstermektedir. Toksik metaller glutatyon ile

birleşerek hücre membranından geçememektedir. Benzer bir mekanizmada Cu^{2+} dirençli mantarlarda görülmektedir [75]. Bu funguslar metal-okzalat formunda okzalat bileşikleri salgılamaktadırlar. Mayalar gibi diğer organizmalar ve *Citrobacter* sp. türleri kalsiyum fosfatın çözünmez bileşik formlarına direnç göstermektedirler [59]. Maya formları hidrojen sülfid üretimi boyunca çeşitli kompleksler kullanırken *Citrobacter* sp. fosfat kullanmaktadır. *K.aerogenes*'in bir türü sülfür çıkararak sınırlı miktardaki metali içeri alırken, yakınında dış çöktürme aracılığı ile Cd^{2+} iyonlarını etrafını çevreleyen ortamdan kaldırma yeteneğini göstermektedir [65,76].

2.7.5 Enzimatik Detoksifikasyonla Metallerin Daha Az Zararlı Fonksiyonlara Dönüştürülmesi

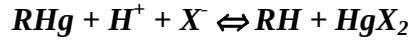
Tanımlanmış olan birçok bakteriyel ağır metal dirençliliği içinde, civa dirençliliği en iyi incelenmiş olanıdır. Civa geniş bir yayılma alanına sahiptir ve diğer ağır metal dirençliliklerinden farklıdır, civa dirençli mikroorganizmaların izole edildikleri yerler ile memelilerin florası hemen hemen aynıdır [77]. Civa dirençlilik mekanizması için yapılan çalışmaların çoğu reaktif iyonik Hg^{2+} formundan elementel ve daha az reaktif Hg^0 formuna detoksifikasyonuna bağlıdır. Bazı civaya dirençli bakteriler civaya geniş spektrumlu dirençli esas bileşiklere sahiptirler [77]. Detoksifikasyona ilave olarak, civa bileşiklerinin tutulması ve dimetillenmesi ile hücresel geçirgenliğin azalmasından dolayı civa iyonlarının alınımının azaldığı rapor edilmiştir [78].

Mikroorganizmalarda enzimatik detoksifikasyonun en iyi örneği civa dirençliliğidir. Bu dirençlilik tipi hakkında diğerlerine nazaran çok daha fazla bilgi mevcuttur. Gerek Gram + gerekse de Gram – bakterilerde Hg^{2+} 'ya karşı dirençlilik gösterilmiştir [61]. Civa hücrede enzimlerin ve proteinlerin yapılarında bulunan tiollere bağlanarak inaktive olmaları nedeni ile toksik etkiye sahiptir. Bazı bakterilerde Hg^{2+} dirençliliği ile ilgili genlerin yer aldığı *mer* operonu bulunmaktadır. Bu operon sadece Hg^{2+} 'nin detoksifikasyonundan değil aynı

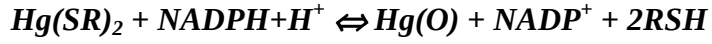
zamanda transferinden ve direncin ayarlanmasından da sorumludur [61,62]. Civanın bulunmadığı zamanlarda düzenleyici proteinler için operon kodları transkripsiyon düzenlenmesini azaltmaktadırlar. Bu genler bir periplazmik bağlayıcı proteinin üretimini ve membran bağlantılı taşıma proteinlerini de şifrelemektedirler. Detoksifikasyon için etrafını çevreleyen ortamdan periplazmik bağlayıcı proteinler ve taşıma proteinleri aracılığı ile Hg^{2+} 'yı sitoplazmaya taşımaktadırlar.

Hg^{2+} dirençliliğinden sorumlu olan mer operonu aynı zamanda detoksifikasyonda kullanılan 2 enzimi de kodlamaktadır. Bu enzimler; organomerküriyal liyaz, merkürük redütaz'dır [61,63].

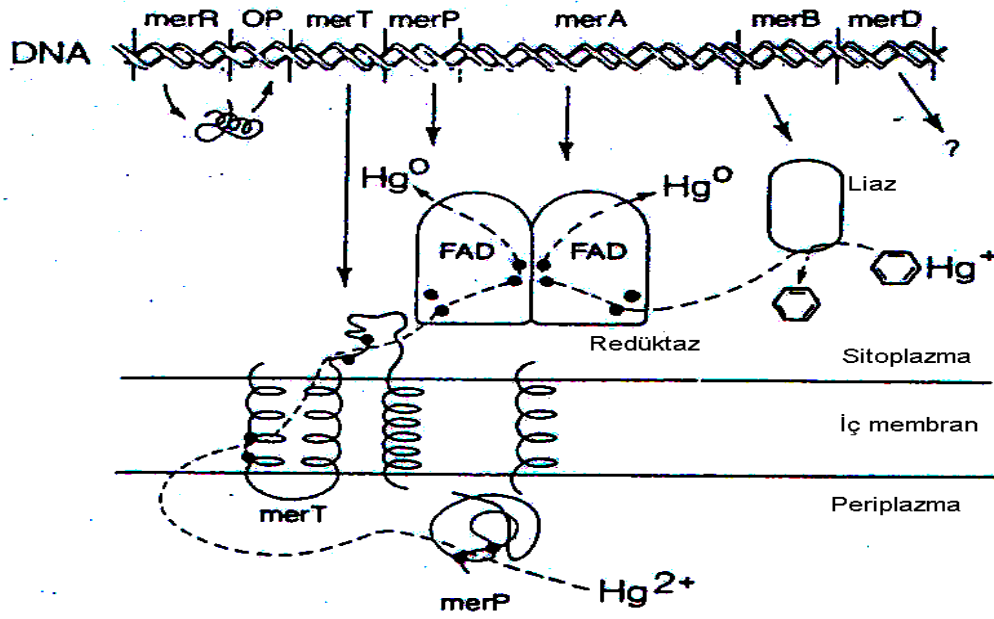
Organomerküriyal liyaz aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir:



Merkürük redütaz ise şu reaksiyonu katalizlemektedir [61,63]:



Organomerküriyal liyaz, stabil durumdaki civa-karbon bağı üzerine etki etmektedir. Enzim kofaktöre gerek olmaksızın sistein sülfohidril kalıntılarının bulunduğu aktif bölgesi ile Hg^{2+} 'ye bağlanmaktadır. Enzimin ürünü civa tiyolattır. Merkürük redütaz elektron taşıyan NADPH'tan flavine hidrid taşımayı gerektiren bir yöntem ile Hg^{2+} 'yi Hg^0 'a (metalik cıvaya) indirgemektedir [61]. Metalik civa hücre zarı ve etrafını çevreleyen ortam arasında difüze olarak dışarı verilir (Şekil 2.4). Mikroorganizmalarda civa direnci dar spektrum ve geniş spektrum olmak üzere iki kategoride olabilir. Dar spektrumlu organizmalar organomerküriyal enzim kodlu genden yoksundurlar ve bu nedenle, bu organizmaların çoğu organomerküriyal enzim kodlu dirence sahip değildirler. Geniş spektrumlu organizmalar hem enzimleri hem de yüksek oranlarda civa içeren bileşiklere dirençliliğin her ikisini de içermektedirler. Mer operonu kapsamlı olarak birkaç mikroorganizmanın plazmidlerinde çalışılmıştır ve beş altı genden oluştuğu saptanmıştır.



Şekil 2.4: Gram negatif bakterilerde Hg(II)'ye enzimatik detoksifikasyon ile metal dirençliliği [79].

Mer operonunun genleri ilk olarak transpozon mutagenезini kullanan Tn21'de haritalanmıştır [62]. Mer genleri farklı bakterilerde farklı tiplerde bulunmuştur: *Shigella flexneri*'nin Tn21 transpozonunda, *S.marcescens*'in pDU1358 plazmidinde, *P.auerginosa*'nın Tn501 transpozonu üzerinde bulunmuştur. Bu mer operonlarının karşılaştırılmasında bunların operatör-promotor bölgelerinde %95'ten fazla oranda homoloji görülmektedir. Benzerlikler genlerin %85'inden fazlasında farklı mer operonlarındaki ortak fonksiyonlarla bulunmuştur [60]. *merC* ve *merB* gibi bazı genlerin varlığı farklı organizmaların içinde mer operonlarını değiştirebilmektedir.

Mer taşıma genleri; *merC*, *merT* ve *merP*'den meydana gelir. MerC'nin varlığı farklı plazmidlerde değişir. Tn501 ve pDU1358 sadece *merT* ve *merP*'yi kapsar, ancak Tn21 üç genin hepsine sahiptir. Bu genler bakterilerin içine Hg²⁺ taşınımını yöneten proteinleri kodlamaktadır. *merT* ve *merC* gen ürünleri sitoplazmik zar proteinleridir, ancak *merP* gen ürünleri ise periplazmik proteinlerdir. Bu transport proteinlerinin işlevi delesyonlar (çıkarma) ve insersiyonal mutasyonlar (eklemeli mutasyonlar) aracılığı ile ispatlanmaktadır

[60,62]. Delesyonlar ve frameshift mutasyonlar Tn201 operonunun *merT*, *merP* ve *merC*'yi göstermektedir, ki *merT* ve *merP* tam Hg^{2+} direnci için gereklidir [80].

merT'nin mutasyonu veya zarar görmesi Hg^{2+} direncinde *merP*'den daha büyük bir azalma olması ile sonuçlanmaktadır. Bu genler ard arda gelmektedir ve her biri bağımsız fonksiyonlara sahip olarak çalışmamaktadırlar. *merP*, periplazmik boşlukta tiyol proteinlerini içeren koruma sağlarken, sitoplazmik zar bölgelerinde Hg^{2+} 'nin çökeltilerini toplayan bir görev yapmaktadır [80]. *merT* sitoplazmayı benzer bir şekilde koruyabilmektedir. Bu genler operonun bir parçası gibi enzim kodlu genlerle ilişkili bir rol oynayabilir. *merC*'nin işlevi Hg^{2+} 'nin taşınımı için bağlanmak olsa da karışık kalabilmektedir [80].

Merkürük redüktaz civa iyonları için yüksek spesifiteli bir homodimerdir; ayrıca herhangi diğer metallerle oksitlenmez veya indirgenmez. *merB*'de *merA*'nın ve monomer enzim organomerküriyal liyazı kodlayan yeri saptanmıştır. Bu enzim substratların bir türü için, primer, sekonder, tersiyer alkil merkürük halidler, allil, vinil ve aril merkürük halidler kadar iyi ve geniş bir spesifiteye sahiptir. Enzim merkürük redüktaz'dan daha yavaş hareket etmektedir [59].

Mer operonunun en çok çalışılmış alanı *merR* genidir [81, 82, 83, 84, 85, 86]. Bu gen bir *merR* proteininin ürünü aracılığı ile operonun tamamının düzenlenmesini denetlemektedir. Bu protein Hg^{2+} 'nin varlığında bir pozitif regülatör olarak, Hg^{2+} 'nin yokluğunda bir negatif regülatör olarak hareket etmektedir. Hg^{2+} 'nin varlığında veya yokluğunda kendi kendini otomatik olarak ayarlayarak çalışmaktadır. *merR* proteini *mer* operonunun bölgesel promotörünün bağlayıcı yerleri arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Bu bağlantı Hg^{2+} 'nin varlığı veya yokluğu ile ilişkili değildir [82, 87]. Hücre çevresinde Hg^{2+} olduğu zaman, *mer* proteinini bağlar [80]. Bir Hg^{2+} iyonu *merR*'nin iki alt ünitesi arasındaki sistein rezidülerini *merR* proteinine, üç boyutlu bir biçimde allosterik olarak değişen bağlarla bağlamaktadır. Hg^{2+} 'nin yokluğunda *merR* yapısal olarak değişmemektedir. *merR* sürekli yer değiştirdiğinden dolayı bu allosterik değişiklik içeride *merR*'nin diyardik bağlayıcı yeri DNA'nın yapısal biçimini bozan bir neden olarak ortaya

çıkılmaktadır. Bu yeni düzenleme RNA Polimerazın bağlanma yolunu açarak *mer* operonunun çeşitli gen ürünlerinin transkripsiyonunu başlatır. Bazı araştırmacılar *mer* operonu düzenlenmesinde, *merR*'nin rolünü belirlemek için bağlayıcı bölgede, insersiyon ve delesyon mutasyonlarının her ikisini de kullanmışlardır [86].

Plazmidler aracılığı ile As^{5+} 'nin direncini içeren başka enzimatik detoksifikasyon sistemleri *B. subtilis*, *S. aureus*, ve *E. coli*'de tespit edilmiştir [56,88]. *Ars* operonunun *ArsC* geni As^{3+} 'ten daha zehirli olan intrasellüler As^{5+} 'i indirgeyen arsenat reduktazı kodlamaktadır. As^{3+} *Ars* operonundaki diğer genlerde bulunan kodlanmış bir akış pompası aracılığı ile kaldırılır. Bu enzim kendi kendine çalışmamaktadır. Bu enzim arsenatı indirgemede kendi üzerinde bir bağlama proteinine ihtiyaç duymaktadır. Bu bağlama proteinleri mikroorganizmalar içinde farklılık göstermektedir. Örneğin: *S. aureus*'ta thioredoxin, *E. coli*'de glutaredoxin kullanılmaktadır [88].

2.7.6 Hücresel Komponentlerin Metale Olan Hassasiyetlerinin Azaltılması

Bazı mikroorganizmalar toksik metallerin varlığında, hücresel komponentlerin metale olan hassasiyetlerini değiştirerek adaptasyon sağlamaktadır [58]. Hücre bunu ya mutasyonlar yolu ile belli bazı proteinlerin hassasiyetlerini azaltmak sureti ile ya da metal inaktivasyonunda kullanılan belli bazı hücresel komponentlerin üretimini arttırmak sureti ile gerçekleştirmektedir.

DNA tamir mekanizmaları plazmid ve genomik DNA ile sınırlı koruma sağlamaktadır. Bir de mikroorganizmanın ürettiği metal dirençliliği olan komponentler veya alternatif yollar, duyarlı komponentlerden geçen bir özellik ile kendi kendini koruyabilmektedir. Adaptasyon *E. coli*'de de bulunmuştur. Adapte olmamış *E. coli* Cd^{2+} 'a maruz kaldığında önemli DNA hasarları olduğu bildirilmiştir, ayrıca aynı organizmaların alt kültürlerinde direnç görülmüştür [59].

Cd^{2+} 'ye maruz bırakılan organizmaların büyüme fazının kısaldığı rapor edilmiştir. Uygun bir başlatıcı olarak DNA tamir mekanizmasının, görevinin bir

parçası olarak lag fazın uzatılmasında görev aldığı varsayılmaktadır. Doğal direnç, toleransın temel bir seviyede olmasına izin veren normal hücresel işlevlerden meydana gelebilmektedir [58].

Glutasyon Ag^{1+} , $Cu^{1+,2+}$, Cd^{2+} ve Hg^{2+} gibi metallere koruması için bir örnek teşkil etmektedir [62]. Glutasyon serbest radikalleri bağlayarak Cu^{2+} ve Fe^{2+} 'den korumayı sağlayabilmektedir [58]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde bulunan dirençlilik yetenekleri arasında farklılıklar bulunmaktadır [56]. Cd^{2+} 'nin varlığında protein sentezi Gram negatif bakterilerde, Gram pozitiflerden çok daha iyidir.

Pseudomonas'ın bir türü Gram pozitif bakterilerin (*S.aureus*, *S.faecium*, ve *B.subtilis*) protein sentezinin %50 azaldığı Cd^{2+} 'nin konsantrasyonlarının 5-30 katına kadar dirençlilik göstermektedir. Gram pozitif organizmalar *E.coli* ile karşılaştırıldıklarında 28-30 kez daha fazla Cu^{2+} bağlayabilmektedir [89].

2.8. DİRENÇLİLİĞİN GENETİK ÖZELLİKLERİ

2.8.1. Plazmidler ve Transpozonlar

Plazmidler ilk kez bakteri hücrelerinde esas DNA molekülünün dışında, sitoplazmada çok daha küçük ve sayıları değişken olabilen DNA moleküllerinin varlıklarının ortaya çıkmasıyla bulunmuştur [90]. Plazmidler genel olarak; bakteri hücrelerinde ve bazı ökaryotik hücrelerde bağımsız olarak var olan ve sirküler DNA molekülleri olarak tanımlanmıştır [91]

Plazmidler daima bir ya da daha fazla sayıda gen taşırlar ve bu genler konak hücre tarafından gösterilen önemli bazı özelliklerden sorumludurlar. Örneğin kloramfenikol ya da ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik konsantrasyonlarında

canlı kalma yeteneği, bakterilerin sahip olduğu plazmidler tarafından taşınan antibiyotik dirençlilik genlerine bağlı bir durumdur [91]

Bütün plazmidler replikasyon orjini olarak görev yapan en az bir DNA sekansına sahiptirler. Böylece plazmidler hücre içinde bakteri kromozomundan bağımsız olarak replikasyon yapabilmektedirler. Bazı tip plazmidler, bakteri kromozomuna girerek kendini replike etme yeteneğine sahiptirler. Bu tip plazmidlere integratif plazmidler ya da epizomlar denir. Böylece DNA molekülleri çok sayıda hücre bölünmeleri boyunca stabil biçimde korunurlar fakat bazı durumlarda bağımsız hale geçebilirler [91].

Plazmidler: *konjugatif plazmidler*, *konjugatif olmayan plazmidler* olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Konjugatif plazmidler, bakteri hücreleri arasında meydana gelen konjugasyon olayı ile karakterize edilirler. Bu tip plazmidler konjugasyon olayı sırasında bir hücreden diğerk hücreye geçebilirler. Konjugasyon ve plazmid transferi, konjugatif plazmidler üzerinde bulunan transfer ya da *tra* genleri olarak bilinen bir dizi gen tarafından kontrol edilir. Bu genler konjugatif olmayan plazmidlerde bulunmazlar. Ancak konjugatif olmayan bir plazmid bazı koşullarda, eğer her ikisi de aynı hücre içinde bulunuyorsa, konjugatif bir plazmidle birlikte taşınabilir [91].

Farklı çeşit bazı plazmidler, aynı hücre içinde bulunabilirler. Birden fazla farklı konjugatif plazmid tek bir hücre içinde bulunabilir. Aslında *Escherichia coli* hücrelerinin bir defada yedi farklı plazmidi içerdii bilinmektedir. Farklı plazmidlerin aynı hücre içinde birlikte bulunabilmesi *kompatibilite* ya da *uyuşma* olarak ifade edilir. Eğer iki plazmid birbiriyle uyuşmuyorsa (*inkompabilite*), plazmidlerden biri hızla kaybolur. Bu yüzden farklı plazmid tipleri birlikte bulunup bulunmama özelliklerine göre farklı uyuşmazlık gruplarını (*inkompabilite grupları*) oluşturmaktadır. Tek bir uyuşmazlık grubundaki plazmidler genellikle çeşitli şekillerde birbiriyle ilişkilidir. Ancak uyuşmazlığın temeli iyi anlaşılamamıştır [91].

Doğal oluşumlu plazmidler için en kullanışlı sınıflandırma, plazmid genleri tarafından kodlanan temel özelliklere dayanmaktadır. Bu tip sınıflandırmaya göre plazmidler 5 grup altında toplanır [91]. Bunlar;

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

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

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

d. Parçalayıcı Plazmidler: Bu plazmidler toluen ve salisilik asit gibi sıradan olmayan moleküllerin metabolize edilmesi için kullanılır. Örneğin *Pseudomonas putida*'daki *TOL plazmidi* bu tiptir.

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

Plazmidler genellikle bakteriler arasında yaygındır, ancak diğer bazı organizmalarda da plazmidler bulunmaktadır. En iyi bilinen eukaryotik plazmid *Saccharomyces cerevisiae*'nin pek çok suşunda bulunan *2 mikron plazmidleri*'dir [91].

Transpozonlar; bir bakteri içinde kromozomla veya plazmidle bağlanmış olarak, kromozom veya plazmid üzerinde aynı zamanda karşılıklı olarak yer değiştirebilen, çeşitli antibiyotiklere ve ilaçlara karşı dirençlilikte önemli

fonksiyonları olan özel genler taşıyan, DNA karakterlerinde çift iplikli lineer genetik elementlerdir [92].

Transpozonlar, antibiyotiklere direnç veya toksin üretimiyle ilişkili genler gibi, genetik işaretleri taşıdıklarından kolaylıkla tanımlanabilirler. Transpozonların genomdaki yer değiştirmelerinin, homolog rekombinasyon için gerekli (*recA* geni ürünü) özel protein bulunmayan mutant bakterilerde de meydana gelebildiği bulunmuştur. Bileşik elementler olan transpozonların boyları genellikle 2000 baz çiftinden daha fazladır, iki uçlarında boyları değişken olabilen, aynı yönlü yada çoğunlukla ters yönlü konumlanmış tekrarlanan nükleotid dizileriyle sonlanırlar [90].

Değişik araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla, transpozonlarda çok sayıda antibiyotiğe direnç özelliğini taşıyan genlerin yanı sıra toksik civalı bileşiklere karşı direnç, bakteriyel toksin sentezi, şekerleri parçalama kapasitesi gibi diğer bazı karakterleri şifreleyen genlerin de bulunabildiği saptanmış ve bu genlerin de yer değiştirme yetenekleri gösterilmiştir. Transpozonlar tüm organizmalarda bulunabilmektedir. Ökaryotlardaki transpozonlara örnek olarak, *S.cerevisiae*'deki Ty elementleri, *Drosophila*'daki copia elementleri ve hatta ökaryotik bir çok türdeki retrovirüsler verilebilir [90].

Antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin çoğunun karşılaştırması genellikle bir operonda kümelenmiş, birlikte transkripte olabilen, işlevsel olarak bağlantılı bir çok genlerle yapılmaktadır. Bunlar normalde metal bağlama, taşıma, çıkartma veya detoksifikasyon fonksiyonlarının belirlenmesinde olduğu gibi çok küçük bir düzenleyici gen içerirler. Karakterize edilmiş civa dirençlilik genlerinin çoğu (genelde mer genleri olarak adlandırılırlar) plazmid kökenlidir. Bununla birlikte, homolog kromozomal genlerin çoğunluğu gram-pozitif olan bazı bakterilerde bulunmuştur. Mer dirençlilik genlerinin bir çoğu transpozonlar üzerinde de tespit edilmiştir [10].

Karakterize edilmiş civa dirençliliği kodlu genler, civanın detoksifikasyonu ve taşınmasını kodlayan genlerde olduğu gibi, operonlarda bulunmaktadır. Dirençliliğin temel genetik yapısı korunmuş olmasına rağmen, genlerin regülasyonu ve düzeni çeşitlilik göstermektedir [92]. Gram-negatif bakterilerde mer operonlarının organizasyonları birkaç istisna dışında çok iyi korunmuştur. Analiz edilen az sayıdaki gram pozitif bakteri de nükleotid düzeyinde çok büyük farklılıklar olduğu görülmüştür [10]. Bazı türlerde bakır dirençliliğinin genetiği, civa dirençliliği kadar iyi anlaşılamamış olmasına rağmen, operonlar içindeki genler tanımlanmıştır (örneğin; *E.coli*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas syringae*). Bu genler regülasyon, pompa sistemi ve bakır bağlama sistemleri ile yakından ilgilidir.

E.coli için bakırın toksik seviyelerinde plazmid genlerinin fonksiyonlarının aktif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bakırın düşük seviyelerinin bulunduğu çevrelerde normal metabolizmaya ait kromozomal genlerin fonksiyonları da bildirilmiştir [93]. Diğer bakır operonları, diğer plazmidler (örneğin; *P. syringae*) ve kromozomlar (*E. hirae*) üzerinde bulunmuştur.

Genlerin yapısı, seçici baskılar değiştiği zaman bu özelliklerin gelecekları için değişik anlamlara sahip olabilmektedir. Seçici baskının bulunmadığı durumlarda, önemli hücresel fonksiyonları yapan genlerin değişikliğe uğramış türleri olan dirençlilik özellikleri genomdan kaybolmuş olamazlar. Sadece plazmidler üzerindeki dirençlilik kodlu olan genler daha kolay bir şekilde kaybolabilmektedir [10].

2.9. GEN TRANSFERİ

Doğada bakteriyel genlerin horizontal transferini kolaylaştıran bir çok mekanizma bilinmektedir. Bu mekanizmalar; transpozon, konjugatif transpozon, integron, plazmidler ve transformasyon aracılığı ile gen taşıma mekanizmalarıdır (Çizelge 2.5). Plazmidler ve transpozonlar aracılığı ile transfer belgelenmiştir. Gen

transferi bir bakteriyel tür içinde veya yakın ilişkili türler arasında sınırlı değildir. Transpozonlar ve plazmidler üzerinde olan bir çok ağır metal dirençlilik genleri ve degradasyondan sorumlu genler horizontal gen transferi ile ilişkili bir role sahip olabilir. Dirençlilik veya degradasyon özelliklerinin türü, genomik lokasyonları tarafından belirlendiği için, horizontal gen transferi aracılığıyla yayılma yetenekleri değişmektedir.

Civa dirençlilik plazmidlerinin transferi bazı *in situ* çalışmalarda ispatlanmıştır. mer genleri karakterize edilmiş bir verici suşta, transfer ortaya çıkarılmıştır [94]. Ayrıca transfer doğal izolatlardan mer genleri için alıcı olarak rol alan bir suşta da ortaya çıkarılmıştır [95]. Doğal çevre çalışmalarında, farklı genetik yapılarda mer genleri aynı plazmidler üzerinde bulunmuştur [96].

Transpozonlar ile mer genlerinin arasındaki iş birliği, rekombinasyon ve gen transferinden başka yollarla da olabilmektedir [10]. Taksonomik açıdan birbirine yakın olmayan bakteriler arasındaki değişim potansiyeli belirgin bir şekilde mevcuttur. Gram-negatif ve Gram-pozitif ırklardaki doğal izolatlardan izole edilen merR genlerinin filogenetik analizi ve operon yapısı önemli farklılıklar göstermektedir [10]. Gen transferinde çeşitli engellerin var olduğu çok fazla gösterilememiştir.

Pseudomonas ve *Xanthomonas* türleri arasında bakır dirençliliğinin transferini belirleyen etkenler, genlerinin önemli benzerliklerinden dolayı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *P. syringae* genleri kromozomal homologlara sahip görünürken, *Xanthomonas* türleri içinde hiçbirinde kromozomal homologlar bulunamamıştır. Bu sebepten dolayı *Pseudomonas* kaynak olarak gösterilmektedir [97].

ABD’de armut fidanlıklarından izole edilen *P.syringae* suşlarının kullanıldığı bir çalışmada doğal çevrede bakır dirençliliği genleri taşıyan bir plazmidin transfer edildiği rapor edilmiştir. Çalışılan bakterilerin çoğunda

dirençlilik ve degradasyon özelliklerinin gen transferi ispatlanmıştır. Başlıca transfer mekanizmaları plazmidler ve transpozonlardır [10].

Çizelge 2.5: Doğada bulunan ve bilinen bakteriyel gen transfer mekanizmaları ve onlar etkiliyken özellikleri [10].

Transformasyon	-Çıplak DNA'nın alınımı; DNA homolog rekombinasyonlar aracılığı ile birleşir. -Yakın ilişkili türlerle sınırlı. -Doğal olarak yetenekli bakteriler dışında nadiren görülür.
Plazmidler (A, M, P)	-Alıcı ve verici bakteri arasında transfer edilen ekstra kromozomal genetik elementler. -Özel olarak kopyasını yapabilme yeteneği. -Bazıları kromozom içine entegre olabilme yeteneğindedir. -Bazıları Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler arasında bile gömülü bir biçimde transfer olabilir.
Konjugatif- Transpozonlar (A, M, P)	-Kendi transferine aracılık eden bir kısmı şifrelemekte; Gram-negatif ve Gram-pozitif her ikisinde de bulunmakta. -Enzim kodlu bir karakter kullanarak plazmidlerde veya kromozomlarda çıkabilen ve girebilen genetik elementler. -Genellikle başka bir yere kopya yerleştirme özelliği; bozulmamış orjinal elementin ayrılması ve yer değiştirme prosesi esnasında kopyalanma. -Kromozom ve plazmidler arasında veya plazmidler arasında gen transferine yol açan, kesme/ekleme esnasında diğer genler mobilize olabilir.
Konjugatif Transpozonlar (A)	-Konjugatif aparatlı genetik elementler: Gram-pozitiflerden bulunan ve Gram-negatiflere transfer olabilen. -Konjugatif plazmidlere benzer fakat sadece kromozom üzerinde bulunan ve kendi kendine replike olma yeteneği olmayan. - Kopyalanmamış hedef sekans denetiminde non-konjugatif transpozonlardan farklı yer değiştirme mekanizması.
İntegronlar içinde kasetler (A)	-Bazı Gram-negatif bakterilerde bulunan transfer yeteneği olan genetik elementler. -Kendi kendine mobilize olma yeteneği olmayan ayrı genetik üniteler ve mobilize integronlar içeren sistemler. -Bazı integronlar aynı zamanda genom içinde hareket edebilir; diğerleri aktif transpozon içinde bulunur.
A, antibiyotik; H, ağır metaller; P, Pestisidler	

2.10. DİRENÇLERİN KÖKENLERİ

Ağır metal dirençliliği insanın aracılık ettiği seçilimin bir sonucu olarak son yıllarda artmaya başlamış eski karakterler olabilirler. Civa dirençliliği ön

alışmalarında homolog *mer* genlerindeki önemli sekans farklılıkları Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler arasındaki farklılıklara kanıt olarak ileri sür÷lm÷ştür [98]. Bazı *mer* genleri ile diğerk fonksiyonel ve düzenleyici genler arasındaki benzerlikler dikkati çekmektedir. İşlevini kaybetmiş potansiyel *mer* genleri *Haemophilus influenzae*'da tanımlanmıştır [99]. *E. coli* ve *P. Syringae*'de bakır dirençlilik genlerinin kromozomal homologlarının bulunmaması, bu türlerde direnç genlerin kromozomal genlerden evrimleşme olasılığının çok düşük olduğunu göstermektedir. Mer genlerine benzer olan bakır dirençlilik genlerinin eski bir kökene sahip oldukları belirtilmektedir [100]. Sekans ve gen organizasyonundaki farklar uzun bir ayrılma zamanını belirtirken, *E. coli* ve *P. syringae* genleri arasındaki benzerlik ortak bir kökene işaret etmektedir.

Dirençlilik ve degradasyon yeteneklerinin bir çoğunun eski kökenlere sahip olduğu homolog genler arasındaki farklılıklarla ve paleontolojik kanıtlarla da desteklenmektedir. Bu dirençlilik özelliklerin yaşı insanın sanayileşmesinin bakteriler üzerindeki seçilime etkileri ile ilgili hipotezi desteklemektedir. Bununla birlikte, son günlerde gen transferinin diğerk özelliklerin kökenlerini açıkladığına inanılmaktadır [10].

2.11. AĞIR METAL DİRENÇLİLİĞİNİN SEÇİLİMİ VE TRANSFERİ

Bakteriyel direnç ve degradasyon özelliklerinin insanın etkisi ile seçilimi ve yayılımı iki yolla olabilmektedir. Birincisi, bu genlerin insan aktiviteleri aracılığıyla seçilmiş olması, ikinci ise bu genler insanların, çeşitli taşıtların ve eşyaların hareketleri ile coğrafik olarak taşınmasıdır [10].

Ağır metaller; madencilik, endüstri ve tarımda özellikle antibiyotiklerin yerine sıklıkla kullanılarak insan aktiviteleriyle çevreye ve dünyaya yayılmıştır. Bakterilerde civa dirençlilikleri; topraklarda, sedimentlerde, tatlı sularda ve deniz ortamlarında oldukça geniş çapta yayılmıştır. Özdeş *mer* sekansları farklı coğrafik alanlardaki popülasyonlardan izole edilmiştir [78]. Özdeş sekansları kapsayarak bakterilerin veya *mer* genlerinin hareketinin var olduğu belirtilmektedir. Son

bulgular Gram-negatif bakterilerin çok küçük bir kısmında dünya çapında civa dirençliliğinin baskın olduğuna işaret etmektedir [100]. Bakır dirençliliği olan bakteriler; hastalık etkeni mikropları kontrol etmek için bakır ile işlem yapan fabrikalardan, bir besin maddesine eklemeler yapmak için bakır sülfat kullanılmış tarımsal artıklardan ve metallerle kirlenmiş yerlerden izole edilmiştir [100]. Kaliforniya, Florida ve Oklahoma'dan çeşitli bölgelerden izole edilen *X. campestris* pv. *vesicatoria*'nın dirençli suşlarında bakır genlerinde türdeşlik, *Xanthomonas campestris*'in suşlarında bakır dirençliliği seyrek olmasına rağmen gösterilmiştir [97]. Kirli fabrika materyallerinin uzun mesafeli taşınımı bakıra dirençli bakterilerin yayılmasından sorumlu olabileceği bildirilmiştir [100].

Ağır metal dirençlilik genlerinin eski olması bir görüştür, fakat son zamanlarda insan kaynaklı seçilim için bazı kanıtlar bulunmuştur. Civa konsantrasyonu ile mer genlerinin frekansı arasında ve izolatlarda bulunan civa dirençli fenotipler arasında güçlü pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir [102]. *Bacillus* suşlarındaki civa dirençli izolatların çoğunluğu büyük ölçekli metil civa zehirlenmesinin olduğu Japonya'daki Minimata Körfezi'nden izole edilmiştir [103]. Bu bölgede ağır metaller aracılığı ile oluşan seçilimin bir sonucu olarak bakteriyel yayılmanın olduğu görülmüştür [78]. Civa dirençliliği bulunan operonlardaki (*merC*) genlerden birinin kirli çevrelerle ilgili olduğu rapor edilmiştir [78, 92]. Civanın çevresel kaynaklara yayılması ile birlikte, insan barsak sistemide bakterilerin civa'ya maruz kalması için büyük bir kaynak oluşturmuştur. Diş dolgularında %50 metalik civa içeren bir metal karışımı materyal kullanılmaktadır. Diş fırçalama veya çiğneme sonucunda insanlardaki bu metal karışımlı diş dolgularından yaklaşık olarak günde 10 µg civa emilmektedir. Yapılan bir çalışmada metal karışımlı diş dolgularının yerleştirilmesinden sonra maymunların organlarında civanın yüksek konsantrasyonlarının akümüasyonu ve civa'ya dirençli bakterilerin düzeylerindeki yüksek artış ispatlanmıştır [104]. Doğada bakır dirençliliği için seçilim ispatlanmıştır. Beş yıldan fazla süren bir periyotta içinde bakır bulunan domuz kaynaklı gübrelerle yapılan gübreleme sonucunda toprakta, bakıra dirençli aerobik bakterilerde 10 kat ile 1000 kat arasında artış olduğu gözlenmiştir [105].

Ağır metal dirençlilikleri ve pestisid degradasyon özellikleri hakkında daha az şey bilinirken, bu özelliklerin plazmidler üzerinde ve coğrafik açıdan geniş alanlara yayılmaları, onların transfer olabildiklerini göstermektedir.

2.12. AĞIR METAL DİRENÇLİLİĞİ, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ VE PESTİSİD DEGRADASYONU ÖZELLİĞİ KARAKTERLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER

Birçok bakteride bazı antibiyotiklere karşı dirençlilik tespit edilmiştir. Bazı dirençlilik genlerinin kodları bir kez aynı transpozon, integron veya plazmid üzerinde bulunmaya başladığı zaman, birlikte transfer olabilmektedirler. Aynı zamanda bakterilerin bir çoğunda ağır metal dirençlilik genlerinin plazmidler üzerinde kodlanmış olarak bulundukları bilinmektedir. Bunlardan en iyi çalışılmış olanları; nikel, kobalt, çinko, krom, civa, telleryum, kadmiyum, bakır ve kurşun dirençlilikleri bulunduran 150 kb'ın üzerinde iki megaplazmid taşıyan *Alcaligenes eutrophus* suşlarıdır [106]. *Alcaligenes* türlerindeki diğer ağır metal dirençlilikleri bakır dirençliliği birlikte bulunmasına rağmen *P. syringae* ve *E. coli*' de bakır dirençliliği diğer ağır metal dirençlilikleri ile birleşmiş olarak bulunamamıştır [107].

Antibiyotik ve ağır metal dirençlilikleri arasındaki benzerliklere ek olarak, direncin iki tipi birlikte bulunabilmektedir. Bir kaç bakteriyel türün klinik izolatlarında civa dirençliliği, antibiyotik dirençliliği ile birlikte tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* (MRSA)'da metisilin kodlu genler civa ve kadmiyum'da olduğu gibi diğer antibiyotiklerin birkaçına direnç gösterdiği rapor edilmiştir [108]. İnsan florasında bulunan bakterilerde özellikle de civa-metal karışımli dolgulardan dolayı antibiyotik dirençliliği için civa dirençliliği seçici olarak kullanılabilmektedir.

İnsansı olmayan primatlarda yapılan çalışmalarda civa-metal karışımli dolguların yerleştirilmesinden sonra antibiyotik dirençliliğinin ve aynı bakteriyel

gruplardaki aynı konjugatif plazmidler üzerinde bulunan civa ve antibiyotik dirençliliklerinin artmış olduğu bildirilmiştir [66]. Maymunların ve insanların bakteriyel floralarının incelendiği bir çalışmada, antibiyotik dirençliliklerinin civa'ya dirençli suşlarda civa'ya duyarlılardan daha yüksek frekanslarda olduğu rapor edilmiştir [109]. Yapılan başka bir çalışmada, civaya dirençli toprak bakterilerinin çoğunun en az bir antibiyotiğe karşıda dirençli olduğu tespit edilmiştir [110].

Benzer şekilde fitopatojenik *P. syringae*'de streptomisin dirençliliği kodlu transpozonun üzerinde bakır dirençliliği kodlu sekanslar birlikte bulunmuştur. Bu durum muhtemelen kültür bitkilerinin patojenlerinin kontrolü için streptomisin ve civanın kullanımıyla ilgili olduğu düşünülmektedir [111]. Domuz besininde bir katkı maddesi olarak kullanılan bakırın yüksek konsantrasyonlarının kloramfenikole dirençli *E.coli*'nin seçilimini desteklediği görülmüştür [112]. Pestisid degradasyon özelliklerinin de sıklıkla ağır metal dirençlilik genleri gibi aynı plazmidler üzerinde birlikte bir bakteriyel suş'ta bulunabilmektedir (örneğin 2,4-D genleri) [113] .

Fiziksel bağlantılar yoluyla transfer olabilen genetik öğelerin üzerinde bulunan dirençlilik özellikleri arasındaki benzerliklerin büyük bir kısmı tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençlilikleri; ağır metal dirençliliği ve pestisid degradasyon özellikleri arasındaki benzerlikler tespit edilmiştir [50]. Ağır metal dirençliliklerinin pestisid degradasyon özellikleri ile birlikte bulunduğunu bildirilmiştir. Bu durum, bir özellik için seçilimin diğer özelliklerin seçilimini de zorunlu kılıyor olabileceği anlamına gelmektedir.

2.13. *PSEUDOMONAS* GENUS'UNUN GENEL ÖZELLİKLERİ

Pseudomonas'lar çomak şeklinde bir yapıya sahip olup, türlerinin çoğu hareketlidir. Hareketli olanlarda hareket monotrik veya lofotrik flagellerle olmaktadır. Yeşilimsi-mavi bir pigmente sahiptirler. Katı ortamlarda 24 saatte yaklaşık olarak 5 mm çapta, konveks, türe göre değişen özel renkte, aromatik

kokulu koloniler oluştururlar. *Pseudomonas*'ların literatürde 84 türüne rastlanmaktadır. Bu türlerin hepsi de Gram-negatif'tir. Bu türlerin çoğu fluoresan pigment sentezlerler. Bazı türler bu sarımtırak yeşil pigmente ek olarak diğer renklerde bazı pigmentleri de sentezlerler. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* çözünebilen ve rengi mavi olan bir pigment daha sentezler [114]

Pigmentasyon genusun genel özelliklerinden biridir. Ancak bazı türler pigmentasyon göstermezler. *Pseudomonas*'ların en çok bilinen pigmentleri; piyoverdin ve piyosiyanın'dir. Piyosiyanın'ın yapısı iyi bilinirken, piyoverdinler sadece kısmen karakterize edilmişlerdir. Floresan pigmentler çoğunlukla düşük demir içerikli besiyerlerinde üretilirler. Floresan pigmentler ultraviyole ışık altında, beyazdan maviye doğru değişir [115].

Pseudomonas genusu türleri katalaz pozitif olup, bazı türleri insanlar, hayvanlar ve bitkilerde patojendir. Pek çok tür, sınırlı besin koşullarında geliştiğinde büyük miktarlarda β -hidroksibütirat biriktirirler. *Pseudomonas* türlerinin hücre duvarları Gram-negatif bakterilerle benzerdir. Ancak kimyasal kompozisyonunda önemli farklılıklar bulunabilmektedir. En çok çalışılmış olan tür *Pseudomonas aeruginosa*'dır [115].

Pseudomonas genusunu oluşturan türlerin büyük çoğunluğu kemoorganotrofik olup, bazıları fakültatif kemolitotrof'tur. H_2 ve CO_2 'i enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Pek çok *Pseudomonas* türü, amonyum iyonları veya nitrat ile tek karbon ve enerji kaynağı olarak organik bir bileşik içeren mineral besiyerlerinde gelişebilmektedirler. Sadece birkaç tür ilave organik faktöre ihtiyaç duyarlar. Tek bir karbon bileşiği içeren çok basit bir mineral besiyerinde gelişme kapasitesi, *Pseudomonas*'lar için temel bir beslenme karakteristiğidir [115].

Pseudomonas'ların genetiği, bakteriyel genetikçilerin dikkatlerini üzerlerine çekmektedir. Bunun nedenleri çok çeşitli habitatlarda yaşayabilmeleri, biyolojik ve tıbbi önemleri, besinsel ve biyokimyasal becerileri ve laboratuarda kültürünün oluşturulması için çok basit koşullara gereksinim duymasıdır [115].

Plazmidler, *Pseudomonas*'ların genetik yapılarının önemli komponentleridirler. Bu plazmidlerden bazıları; fertilite faktörü olarak, bazıları çeşitli ajanlara karşı direnç kazandırarak, bazıları ise genus üyelerinin alışılmadık karbon kaynaklarını kullanma kapasitelerini kazanmalarını ve bazıları da çeşitli ağırmetallere direnç kazanmalarını sağlayarak etkili olmaktadır. *Pseudomonas*'ın plazmidlerini, plazmidlerin aynı hücrede bulunabilmelerini ifade eden uyumluluk/kompabilite özelliğine dayalı olarak sınıflandırılması daha uygun olacaktır. Belli başlı *Pseudomonas* suşlarında pek çok alışılmadık bileşiği parçalama yeteneği plazmidler üzerinde taşınmaktadır [116].

Bakteriosinler; bazı bakterilerin suşları tarafından üretilen, aynı türün diğer suşları üzerinde letal etki gösteren proteinlerdir. Bakteriyosinler, *Pseudomonas* suşlarında sıklıkla bulunmaktadır. Antibiyotik duyarlılığı; pek çok *Pseudomonas* türü birçok antibakteriyel ajana karşı dirençliliğe sahiptirler. Antibiyotik ve ilaç duyarlılığı pratikte yeni türlerin tanınmasında da önem arz etmektedir [115].

2.14. *BACILLUS* GENUS'UNUN GENEL ÖZELLİKLERİ

Bacillus genusu üyeleri çomak şeklinde bakterilerdir. Mikroskopla incelendiklerinde tek tek veya çoğalma esnasında birbirlerine yapışık kaldıklarından zincir halinde görülebilirler. Flageller çomak şeklindeki hücrelerin çevresinde yer alırlar. *Bacillus* türlerinde çeperin dışında gerçek bir kapsüle de rastlanabilir. Bu kapsülün kimyasal yapısını polipeptidler oluşturur. Spor veren *Bacillus* türlerinin spor çimlenmesi esnasında protoplastın spor dışına çıkabilmesi, çeperde bir açıklığın oluşması ile mümkündür. Nitekim *Bacillus cereus* üzerinde yapılan bir araştırma, bu türün hücrelerinde çeperi sindirebilen enzimleri çıkarabildikleri tespit edilmiştir. Bu enzimlerin diğer bir çok türün çeperlerini de sindirdikleri ayrıca tespit edilmiştir.

Aerobik, spor veren *Bacillus* türleri sporun şekli ve sporun içinde meydana geldiği hücre ile olan durumuna göre üç grupta toplanırlar. Üyeleri arasında

B.megaterium, *B.mycoides* ve *B.subtilis* gibi türlerin yer aldığı 1. grupta sporu meydana getiren vejetatif hücre spor meydana getirirken herhangi bir büyüme veya şişme göstermez ve hücre içinde oluşan sporun şekli ovaldir. *Bacillus polymyxa*'nın örnekoluşturduğu 2. grupta, spor şekli yine ovaldir. Fakat vejetatif hücre içinde oluşan sporun genişliği hücrenin çapından daha büyüktür. Bu sebeple hücre içinde sporun bulunduğu kısım şişkince durur. *Bacillus pasteurii*'nin güzel bir örneğini bulunduran 3. grupta ise spor şekli diğer iki gruptan farklı olarak küresel olup, çapça da içinde bulunduğu vejetatif hücrenin çapından daha büyüktür. Bu grupta da 2. grup ta olduğu gibi sporun hücre içinde bulunduğu kısım şişkince görünür [114].

Bacillus türlerinin geneli kendi bünyelerinde B vitaminlerini sentezleyemezler. Üreme ve gelişme için ihtiyacı olan bu vitaminleri bulundukları ortamdan alırlar. Bazı türler hayatsal faaliyetlerini devam ettirmek için bazı aminoasitleri veya hem aminoasitlere ve hem de B vitaminlerine ihtiyaç duyarlar. Bu bakımdan *Bacillus* türlerini içinde bir tek organik madde bulunduran mineral bir ortamda üretmek mümkün değildir. Onlar ancak mutlaka ihtiyaç duydukları yukarda bahsedilen maddeleri onlara verebilen; maya ekstaktı, pepton gibi maddeleri bulunduran kompleks ortamlarda üreyebilirler [114].

Genelde *Bacillus* türleri aéroptur, anaerobik olanlar şekerlerin fermentasyonu ve denitrifikasyon sonucunda oluşan enerjiden yararlanarak ürerler. *Bacillus* türleri Gram-pozitif olup katalaz enzimine sahiptirler. Bazı *Bacillus* türleri yüksek ısıya dayanıklıdır. Örneğin *Bacillus stearothermophilus* 60° C'de normal olarak büyüeyebilen bir türdür. Fakat *Bacillus* türlerinin geneli mezofil olup, orta derecede bir ısıya ihtiyaç gösterirler [114].

Bazı *Bacillus* türleri toprakta bulunur ve saprofitik bir hayat sürdürürler. Bunlar arasında *Bacillus brevis* bir antibiyotik çağının açılmasında önemli yer alır. Toprakta çok görülen ve *Bacillus*'un tip türü olan *Bacillus subtilis*'den de subtilin antibiyotiği elde edilir. Bu antibiyotik de yine bazı Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir [114].

Bacillus türleri sporlu olduklarından ısıya dayanıklıdır. Toprakta izole etmek istediğinden toprak parçası önce 80°C’de 5-10 dakika tutulmak suretiyle toprakta bulunan sporsuz diğer türler elimine edilir. Daha sonrada aerobik şartlar altında kültür yapılarak *Bacillus* türleri izole edilir. Doğada sayısı çok az da olsa patojenik *Bacillus* türleri de vardır. Bunlar arasında *Bacillus anthracis* en önemlisidir. Bu basil genellikle hayvanlarda şarbon hastalığına sebep olur, fakat bazen insanda da aynı hastalığın oluşmasına neden olabilir [114].

2.15. ADSORBSİYON

Adsorbsiyon, akışkan fazda çözünmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı adsorbent yüzeyine tutunmasına (transferine) dayanan ve faz yüzeyinde görülen bir ayırma yöntemidir. Katı matriks yüzeyinde bulunan iyonlar, çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözeltideki maddeleri katı yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözeltideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Katı yüzeyinde tutunma işleminin gerçekleşebilmesi için, çözünmüş maddenin çözeltiden uzaklaştırılması, çözücünün katı yüzeyden uzaklaştırılması ve çözünmüş maddenin yüzeye tutunması gerekmektedir. Yüzeye tutunan madde adsorblanan, yüzeyinde tutunmanın gerçekleştiği madde ise adsorbent olarak adlandırılır [117, 118].

Günümüzde adsorbsiyon, bir çok doğal fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemde önem taşımaktadır. Ayrıca adsorbsiyon prosesi, atık sulardaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine tutularak giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır [11].

2.15.1. Adsorpsiyonun Sınıflandırılması

Adsorblayan madde yüzeyi ile adsorplanan kimyasal arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen üç tür adsorbsiyon işlemi tanımlanmaktadır.

2.15.1.1. Fiziksel adsorbsiyon

Katı yüzey ile adsorblanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorbsiyon olayıdır. Adsorbsiyon sonucu yoğunlaşma enerjisinden biraz fazla ısı açığa çıkar. Adsorbsiyon ısı 4 kcal/mol (20 kJ/mol)'den düşük etkileşimler sonundaki tutunmalara fiziksel adsorbsiyon denir. Fiziksel adsorbsiyon sırasında atom, molekül ya da iyon şeklindeki adsorblanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında uzun mesafeli, fakat zayıf olan van Der Waals çekim kuvvetleri etkindir.

Fiziksel adsorbsiyonda gaz ya da sıvı moleküllerinin katı yüzeyine van Der Waals kuvvetleriyle tutunması çok tabakalı olabilmektedir. Tüm fiziksel adsorbsiyonlar ekzotermiktir. Adsorblayan-adsorblanan ikilisinin türüne bağlı olmayan fiziksel adsorbsiyon tersinir bir olaydır; yani adsorbsiyon meydana geldikten sonra desorpsiyon da meydana gelir. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştiğinden, sıcaklık arttıkça adsorbsiyon hızı azalır [119, 120, 121].

2.15.1.2. Kimyasal adsorbsiyon

Adsorblanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorbsiyondur. Adsorbsiyon sırasında açığa çıkan ısı tepkime ısısından daha büyüktür. Kimyasal adsorbsiyon sırasında tanecikler ile yüzey arasında bir kimyasal bağ oluşmaktadır. Bu bağ genellikle kovalent bağdır. Çoğu kimyasal adsorbsiyonlar ekzotermik olduğu halde hidrojen gazının cam üzerinde tutulması gibi bazı kimyasal adsorbsiyonlar endotermik olabilmektedir.

Kimyasal adsorbsiyon yalnızca tek tabakalı olarak gerçekleşmektedir. Adsorblanan-adsorblayan ikilisinin türüne bağlı olan kimyasal adsorbsiyon, tersinmez bir olaydır. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiğinden, sıcaklık arttıkça adsorbsiyon hızı da artar [119, 121, 122].

2.15.1.3. İyonik adsorbsiyon

Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisi ile iyonlar yüzeydeki yüklü bölgelere tutunmaktadır. Burada adsorbsiyon ile adsorblananın iyonik güçleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tercihi olarak yüzeye tutulur [121].

2.15.2. Adsorbsiyonu etkileyen faktörler

Adsorbsiyonu etkileyen en önemli faktörler ortam pH'ı, ortam sıcaklığı, adsorbent ve adsorblananın başlangıç derişimi, karıştırma hızı, adsorblanan madde ve adsorbentin özellikleridir.

a) Ortam pH'ı: Hidronyum ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorplandıklarından dolayı diğer iyonların adsorbsiyonu çözelti pH'ından etkilenir. Ayrıca asidik ya da bazik bileşiklerin iyonizasyon dereceleri de adsorbsiyonu etkiler.

b) Sıcaklık: Adsorbsiyon işlemi genellikle ısı veren bir tepkime (ekzotermik) biçiminde gerçekleşir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile adsorbsiyon büyüklüğü artar. Açığa çıkan ısıнын genellikle fiziksel adsorbsiyonda yoğunlaşma ve kristalizasyon ısıları mertebesinde, kimyasal adsorsiyonda ise kimyasal tepkime ısısı mertebesinde olduğu bilinmektedir.

c) Yüzey alanı: Adsorbsiyon bir yüzey işlemi olduğundan, adsorbsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorblayıcının geniş bir yüzey alanına sahip olması tercih sebebidir. Gözenekli ya da parçacıklı bir yapının yüzey alanının daha fazla olduğu bilinmektedir.

d) Adsorblanan madde türü: Adsorbentin hidrofobik (suyu sevmeyen) olduğu durumlarda, çözünenin sudaki çözünürlüğü ile adsorblama kapasitesi arasında ters orantı vardır. Metal iyonlarının hücre duvarı yüzeyine bağlanmasında, duvar yüzeyinde mevcut bulunan bazı polisakkaritler, proteinler ve lipidler ile

bunların içinde mevcut bulunan karboksil, hidroksil, fosfat, ve amino gruplarının etkin oldukları bilinmektedir.

e) Çözücü türü: Çözeltideki çözünürlük arttıkça çözücü-çözünen bağı kuvvetlenir, adsorbsiyon derecesi düşer. İnorganik bileşikler hidrofilik yapılarından dolayı az adsorplanırken, hidrofob maddeler tercih olarak adsorblanırlar.

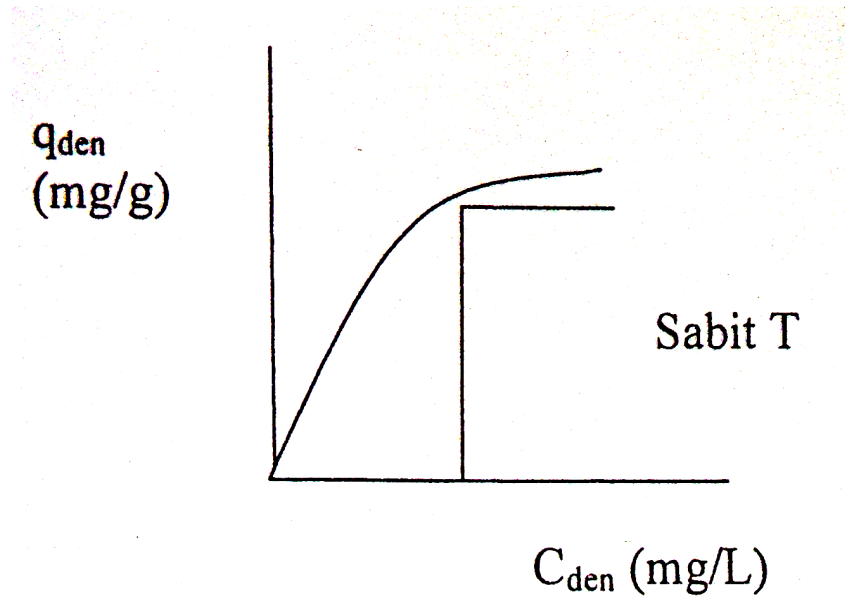
f) Polarite: Kutuplaşmanın genel prensibinden dolayı, polar bir çözünen polar bir adsorbent tarafından, polar olmayan bir çözücüden daha çok adsorblanacaktır [119,120].

2.15.3. Adsorbsiyon dengesi ve adsorbsiyon izotermi

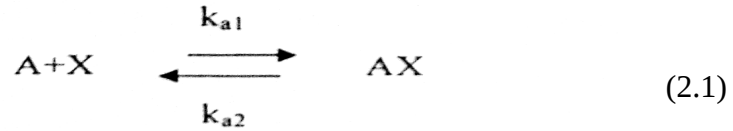
Adsorbsiyon bir denge tepkimesine benzerdir ve çözeltide kalan “çözünen derişimi” ile yüzeyde tutulan ”çözünen derişimi” arasında dinamik bir dengeye ulaşınca kadar sürer. Bir adsorbentte adsorblanan madde miktarı, adsorblanan derişimi ve sıcaklığa bağlıdır. Genellikle sabit sıcaklıkta adsorblanan madde miktarı, derişimin fonksiyonu olarak saptanır.

Dengenin bu durumda çözünen katı ve sıvı fazlar arasında dağılımı, sabit sıcaklıkta dengedeki çözeltide kalan çözünen derişimi C_{den} ' ye (mg metal iyonu/L atık su) karşı, katı adsorbentin birim ağırlığında adsorbe edilen çözünen miktarı, q_{den} (mg metal iyonu / g kuru mikroorganizma) grafiğe alınarak gösterilebilir. Genellikle doğrusal olmayan bu eğriler adsorbsiyon izotermi olarak adlandırılır.

Adsorbsiyon dengesi kurulduktan sonra adsorblanan maddenin çözelti fazındaki derişiminde bir değişiklik gözlenmez. Adsorbsiyon prosesine ait örnek denge grafiği Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.5 : Adsorbsiyon dengesi



$$K_c = k_{a1} / k_{a2}$$

K_c = Adsorbsiyon denge sabiti

Hazırlanan izoterm eğrileri sayesinde etkin ayırma sağlanıp sağlanmadığı; hangi adsorbentin daha verimli olduğu anlaşılır. Adsorbsiyon izotermelerini tanımlamak için birçok matematiksel model geliştirilmiştir [119].

Bu adsorbsiyon izoterm modellerinden, en çok kullanılanlar aşağıdadır.

- 1- Langmuir izoterm modeli,
- 2- Freundlich izoterm modeli,
- 3- Redlich-Peterson izoterm modeli
- 4- Koble-Corrigan İzoterm modeli
- 5- Temkin Denklemi izoterm modeli.

2.15.3.1. Langmuir izoterm modeli

Tek tabaka adsorbsiyonu için uyarlanmış teorik bir modeldir ve aşağıdaki varsayımları içerir:

- Adsorblanan moleküller arasında etkileşim yoktur, adsorblanmış madde miktarının birim yüzeye olan adsorbsiyon hızına herhangi bir etkisi yoktur.
- Katı yüzeyine adsorblanan moleküller tek tabaka şeklindedir.
- Adsorbsiyonun tamamı aynı mekanizma ile gerçekleşir, adsorplanmış yapılar birbirinin aynısıdır.
- Adsorblayan katının tüm konumları aynı aktiviteye sahiptir.
- Adsorbent homojendir.

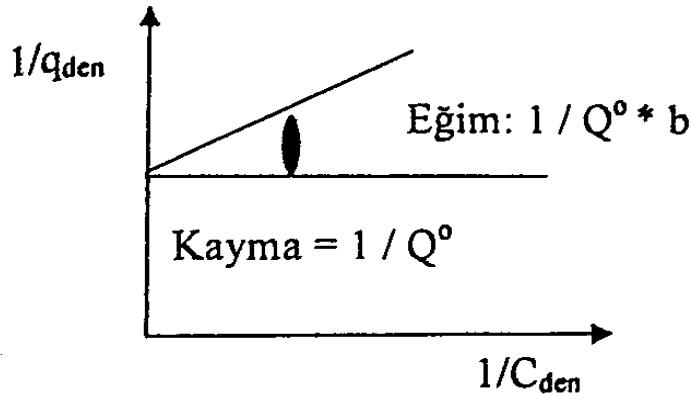
Bu varsayımlara göre yapılan teorik model Eşitlik 2.2’de görülmektedir

$$q_{den} = (Q^0 * b * C_{den}) / (1 + b * C_{den}) \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte q_{den} (mg/g), dengede birim adsorblayıcı kütleinde adsorblanan madde miktarı, C_{den} (mg/L) dengede çözeltide adsorblanmadan kalan madde derişimi, Q^0 (mg/g) yüzeyde tam bir tabaka oluşturmak için adsorblayıcının birim kütleinde adsorblanan madde miktarı, b (L/mg) adsorbsiyon entalpisi ile ilgili bir sabittir.

Eşitlik 2.2’den de anlaşılacağı gibi $(b * C_d) \ll 1$ ise özgül adsorbsiyon çözeltideki adsorsiyonun son derişimi ile orantılı, $(b * C_d) \gg 1$ ise $q_{den} = Q^0$ ’dır. Langmuir denklemi doğrusallaştırılırsa, Eşitlik 2.3 elde edilir.

$$1/q_{den} = (1 / Q^0 * b) * (1 / C_{den}) + (1 / Q^0) \quad (2.3)$$



Şekil 2.6 Doğrusallaştırılmış Langmuir izoterm model grafiği

Şekil 2.6'den görüldüğü gibi, $1/C_{den}$ 'e karşı $1/q_{den}$ grafiğinin y eksenini kesim noktası $1/Q^0$, doğrunun eğimi ise $1/Q^0 b$ 'yi verir. Q^0 ve b 'nin büyüklüğü yüksek adsorbsiyon kapasitesine işaret eder [119, 120, 123].

2.15.3.2. Freundlich izoterm modeli

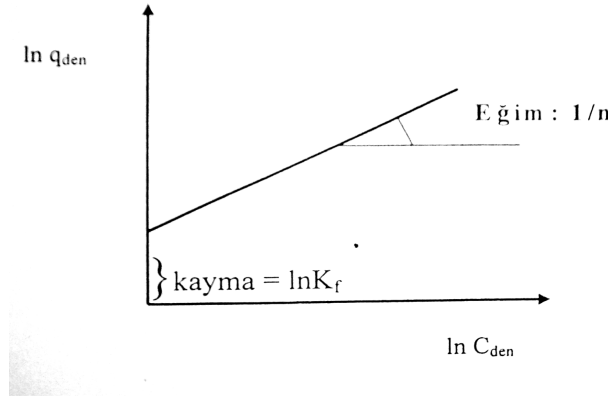
Biyosorbsiyon ısisına bağlı olarak değişen heterojen yüzey enerjileri için Freundlich modeli tanımlanmıştır. Bu model, Langmuir modelindeki enerji ile ilgili terimin (b) , yüzey örtüsünün (q) bir fonksiyonu olarak değiştiği özel bir durumu ifade eder. Teorik olarak bu ifade ile sonsuz miktarda adsorbsiyona ulaşılabilir ve Freundlich izoterm modeli Eşitlik 2.4 ile tanımlanır:

$$q_{den} = K_F \cdot C_{den}^{1/n} \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.4'de, K_F , sıcaklığa, adsorbente ve adsorblanan bileşene bağlı olarak, adsorbsiyon kapasitesinin büyüklüğünü gösteren adsorbsiyon sabiti ve n , adsorbsiyon şiddetini gösteren adsorbsiyon derecesidir [119, 120].

Eşitlik 2.4'ün doğrusallaştırılmış şekli Eşitlik 2.5 ile verilir.

$$\ln q_{den} = \ln K_F + (1/n) * (\ln C_{den}) \quad (2.5)$$



Şekil 2.7: Doğrusallaştırılmış Freundlich izoterm model grafiği.

Şekil2.7’den görüldüğü gibi, $\ln C_{den}$ ’ ye karşı $\ln q_{den}$ grafiğinin eğiminden $1/n$, y eksenini kesim noktasından ise $\ln K_F$ bulunur. Freundlich eşitliğinde $n > 1$ olup n ve K_F parametreleri genellikle sıcaklık artışıyla azalır. K_F ve n değerlerinin büyük olması, adsorbentin, adsorbsiyona eğilimli adsorblama kapasitesinin yüksek olduğunu gösterir.

Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri matematiksel olarak seyreltik çözeltilerden biyosorpsiyonu karakterize ettiklerinden, ortalama derişim aralıklarında adsorbsiyon verileri her iki izoterme de uygunluk gösterir. Heterojen yüzeylerdeki değişik aktif bağlanma merkezlerini içerdiğinden, Freundlich modeli, Langmuir modelinden daha gerçekçi bir yaklaşımdır. Bu izoterm türü heterojen sistemlerin tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır [117, 123, 124].

2.15.3.3. Redlich – Peterson izoterm modeli

Redlich-Peterson modeli, biyosorpsiyon dengesinin diğer iki modelle uyum sağlamadığı durumlar için geliştirilmiş, üç farklı parametre içeren denklem olarak bilinen ampirik eşitlik, geniş derişim aralıklarında adsorbsiyon dengesini ifade etmekte kullanılabilir. Eşitlik 2.6 ile tanımlanır:

$$q_{den} = (K_{RP} \cdot C_{den}) / 1 + (a_{RP} \cdot C_{den}^{\beta}) \quad (2.6)$$

Bu eşitlikte; K_{RP} (L/g) ve a_{RP} (L^β/mg^β) Redlich-Peterson izoterm sabitleri, β ise Redlich-Peterson üsteli 0 ile 1 arasında değer alan üs $0 \leq \beta \leq 1$ olarak tanımlanır. Redlich-Peterson eşitliği, $\beta=1$ ise, Langmuir izoterm modeline, yüksek adsorblanan derişimlerinde ise Freundlich izoterm modeline dönüşür. Eşitlik 2.6'nın doğrusal hale getirilmesiyle aşağıdaki ifade elde edilir:

$$\ln[K_{RP} C_{den} / q_{den} - 1] = \ln a_{RP} + \beta \ln C_{den} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.7 yardımıyla, $\ln C_d$ 'ye karşı $\ln[K_{RP} C_{den} / q_{den} - 1]$ grafiğe geçirildiğinde eğimi β ve kesim noktası a_{RP} olan bir doğru elde edilir [118]

2.15.3.4. Koble-Corrigan izoterm modeli

Biyosorpsiyon dengesini ifade etmek için kullanılan ve üç farklı parametre içeren bir başka modeldir. Eşitlik 2.8 ile ifade edilir.

$$Q_{den} = (A C_{den}^n) / (1 + B C_{den}^n) \quad (2.8)$$

Eşitlik 2.8'de;

A: Koble-Corrigan izoterm sabiti ($L^n mg^{1-n}/g$)

B: Koble-Corrigan izoterm sabiti (L^n /mg^n)

N: Koble-Corrigan üsteli

olarak tanımlanır.

Koble-Corrigan eşitliğinde, $n = 1$ ise, eşitlik Langmuir izoterm modeline dönüşür ve eşitlik 2.9 ile ifade edilir. Adsorbsiyon kapasitesi çok az, yani $B C_{den}^n \ll 1$ ise; eşitlik Freundlich modeline dönüşür ve aşağıdaki eşitlik 2.10 ile gösterilen şekli alır.

$$Q_{den} = (A C_{den}) / (1 + B C_{den}) \quad (2.9)$$

$$Q_{den} = A C_{den}^n \quad (2.10)$$

Adsorbsiyonun fazla olduğu durumda ise $B C_{den}^n > 1$ olup, dengede birim biyosorbent ağırlığı başına adsorblanan madde miktarı sabit kalır ve eşitlik 2.11 ile ifade edilir [118].

$$q_{den} = A / B \quad (2.11)$$

2.15.3.5. Temkin izoterm modeli

Dolaylı adsorblanan / adsorblanan etkileşimlerinin adsorbsiyon izotermine etkileri Temkin izotermi ile aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$Q_{den} = R T / b (\ln A C_{den}) \quad (2.12)$$

Eşitlik doğrusallaştırılırsa;

$$Q_{den} = B \ln A + B \ln C_{den} \quad (2.13)$$

$$B = R T / b \quad (2.14)$$

Eşitlik 2.13 yardımıyla çizilen, $\ln C_{den}$ 'ye karşı q_{den} grafiği A ve B Temkin sabitlerinin belirlenmesini sağlar. B Temkin izoterm sabiti adsorbsiyon ısısı ile ilgilidir [119].

2.15.4. Biyosorpsiyon

Isısal ya da kimyasal yöntemlerle öldürülmüş mikroorganizmlarla yapılan, adsorbsiyon işlemi 'biyosorpsiyon' olarak tanımlanmaktadır.

Biyosorpsiyon aslında fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleksleşme, mikro çökelme vb. gibi bir çok pasif giderim proseslerini adlandırmakta kullanılan ortak bir terimdir. Çoğalmayan mikroorganizmalar, ölü mikroorganizma olarak tanımlanır. Ölü ve yaşayan hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırılmış, çoğu durumda, ölü olanların, metal alabilme kapasitelerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [120, 121].

2.15.4.1 Biyosorpsiyon Verimi

Biyosorpsiyon verimi, dengede biyosorbentin adsorpladığı metal iyon derişiminin, başlangıç metal iyon derişimine oranı olarak Eşitlik 2.15 ile tanımlanmıştır.

$$\% Ad = (C_{ad,den} / C_o) \times 100 \quad (2.15)$$

Eşitlik 2.15’de;

C_o : Başlangıç metal iyonu derişimi (mg/L)

$C_{ad,den}$: Dengede, biyosorplanan metal iyonu derişimidir (mg/L).

2.15.4.2 Biyosorpsiyon mekanizması

Biyosorpsiyon ile giderim prosesi çözünenin biyosorbenti çevreleyen film tabakasından biyosorbentin dış yüzeyine kütle aktarımı ile başlar, çözünenin yüzeyden biyosorbent yüzeyindeki aktif bölgelere aktarımı ve sorpsiyonu ile tamamlanır.

2.15.4.3 Biyosorpsiyon Termodinamiği

Ağır metal içeren çözelti biyosorbent ile temas ettirildiğinde metalin hemen biyosorplanmaya başladığını, daha sonra biyosorplanma hızı yavaşlayarak belli bir süre sonra sabit kaldığı gözlemlenmektedir. Bu sistemde biyosorplanma hızı ile desorpsiyon hızı birbirine eşittir. Yani denge durumu söz konusudur. Biyosorbentteki ağır metal derişimi ile çözültide bulunan ağır metal derişimi dengededir, bu da biyosorpsiyon prosesinin dengede tersinir bir sistem olduğunu göstermektedir. Böylece termodinamik çalışmaları bu sistem için uygulanabilmektedir.

Biyosorpsiyon sırasındaki entalpi değişimi, entropi değişimi, serbest enerji değişimi ve denge sabiti belirlenerek biyosorpsiyon olayı termodinamik olarak incelenir.

2.15.4.4 Biyosorpsiyon hızı

Herhangi bir kimyasal tepkimeye ait hesaplamalarda A gibi giren bir bileşen temel olarak alınır. A'nın harcanma hızı, $(-r_A)$, sıcaklık ve bileşenlere bağlıdır. Bir çok tepkime için $-r_A$, tepkime hız sabiti k ile derişimlerin bir fonksyonu cinsinden ifade edilebilir:

$$(-r_A) = [k_A(T)] [f(C_A C_B \dots)] \quad (2.16)$$

Biyosorpsiyon hızı, birim biyosorbent kütlesi tarafından biyosorplanan metal iyonu miktarı (q)'ya karşı, süre grafiğinden, $t=0$ anında çizilen teğetin eğimi olarak tanımlanmıştır.

$$r_A = (\Delta q / \Delta t) \quad (2.17)$$

Burada,

r_A : Biyosorpsiyon hızı (mg/g dak.)

q : Birim biyosorbent tarafından biyosorplanan metal iyonu miktarı (mg/g)

t : Süre (dakika)

q ise aşağıdaki eşitlik ile tanımlanabilir:

$$q = [(C_o - C) / X]$$

C_o : Başlangıç metal iyonu derişimi (mg/L)

C : Herhangi bir anda biyosorpsiyon oratmında biyosorplanmadan kalan metal iyonu derişimi (mg/L)

X : Biyosorbentin çözeltideki derişimi (g/L)'dir.

$(-r_A)$ 'yı bileşenlerin derişimlerine bağlayan eşitlik hız olarak bilinir. Tepkime hız sabiti k_A , aslında sabit bir sayı değildir, ancak tepkime bileşenlerinin derişimlerinden bağımsız fakat sıcaklıkla önemli ölçüde değişmektedir.

2.16 ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tezin amacı, metal sanayi tesislerinin kurulmuş olduğu Mersin Kazanlı beldesi civarından alınan toprak örneklerinde Cu, Ni, Co, Cd, Zn ve Cr kontaminasyonu düzeyini belirlemektir. Bu bölgede kontamine olmuş topraklardan söz konusu metal iyonlarına karşı dirençli bakteri suşları izole etmek ve bakterilerin ağır metallere karşı göstermiş oldukları metal tolerans profillerini çıkarmaktır. Ayrıca dirençli bakterilerdeki dirençlilik bilgisinin plazmidlerle olan ilişkisini araştırmak ve metal toleransının yüksek olduğu bakteri suşlarının sergilemiş olduğu metal biyosorbsiyon hızlarını belirlemektir.

3. MATERYAL VE METODLAR

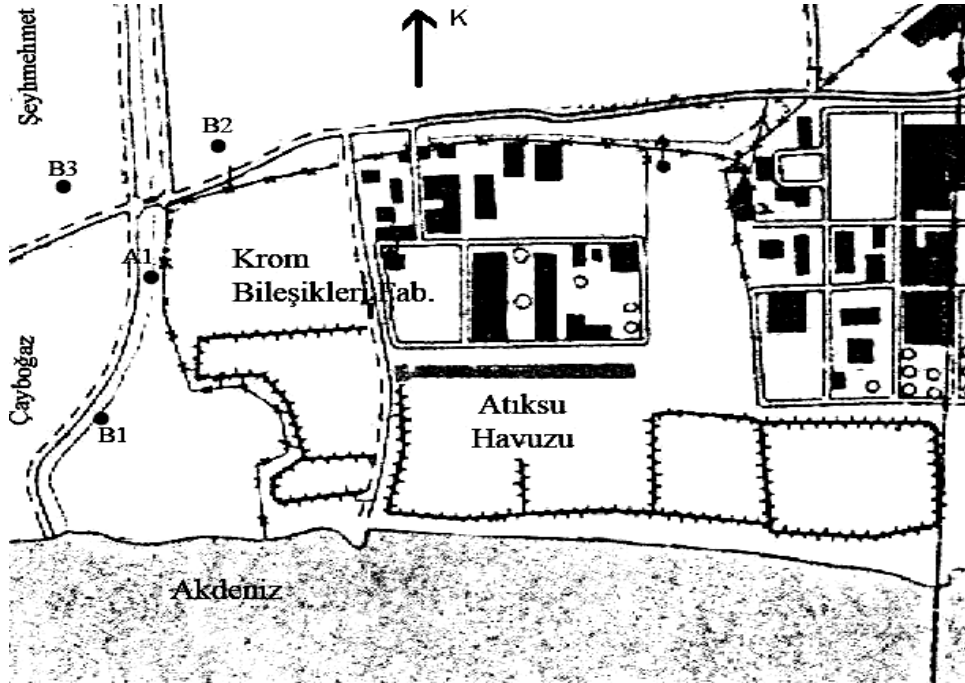
3.1. MATERYALLER

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma, Merck, ve Fluka firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. Suşları

Bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* ve *Bacillus* suşlarının tamamı Kazanlı kasabasından alınan toprak örneklerinden (A1,B1,B2,B3) izole edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* ve *Bacillus* örneklerinin izole edildiği toprak örneklerinin alındığı yerler; A1, B1, B2, B3.

3.1.3. Cam Malzemeler

Kullanılan bütün cam malzemeler deterjanlı su ile yıkandıktan sonra, önce şehir şebeke suyu ile birkaç kez durulanmış ve ardından son bir defa da distile su ile durulanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Besiyeri içeren erlenler otoklavda 121°C’de 1,2 atmosfer basınç altında 15 dakika süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Katı besiyerleri için kullanılan petri kapları ise besiyeri dökülmeden önce Pasteur fırınında 200°C’de 2 saat süre ile steril edilmiştir.

3.1.4. İnkübatörler

Pseudomonas suşlarının kültürünün yapılması amacıyla kullanılan katı ortamların inkübasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) bir inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp suşlarının biyosorpsiyon çalışmaları sırasında Edmund Bühler marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.5. Santrifüj

İzole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının degradasyon testlerinde, Nutrient Broth besiyerinde bir gece inkübe edilen suşların çöktürülüp distile su ile yıkanması aşamasında Sigma marka 1-14 typ model santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. ICP (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) cihazı

İzole edilen suşların biyosorpsiyon testleri sırasında, biyomas artışlarını belirlemek amacıyla Variant ICP-AES Liberty Series II cihazı kullanılmıştır.

3.2. METODLAR

3.2.1. *Pseudomonas* ve *Bacillus* Suşlarının Kültür ve Muhafazası

Pseudomonas sp. ve *Bacillus* sp. suşları derişik oranlarda ağırmetal içeren Nutrient Agarlı Eğik Katı Besiyerlerine ekilerek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.2.2.1. GSP agar

Pseudomonas'ların izolasyonunda kullanılmıştır.

Na-L-Glutamat.....	10 g
Çözünür nişasta.....	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0.5 g
Fenol kırmızısı.....	0.36 g
Agar.....	13 g
Distile su.....	1 L

3.2.2.2. Nutrient agar

Bakteri inokulumlarının hazırlanmasında, plazmid izolasyonu ve eliminasyonu aşamalarında kullanılmıştır.

Pepton.....	5 g
Et özütü.....	5 g
Maya özütü.....	1 g
Agar.....	12 g
Distile su.....	1 L

3.2.2.3 Alkali lizis solüsyonu I

Plazmid izolasyonu için bakteri kültüründeki hücreleri lizi etmek için kullanılmıştır.

50 mM glikoz

25 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

3.2.2.4 Alkali lizis solüsyonu II

Plazmid izolasyonu için bakteri kültüründeki hücreleri lizi etmek için kullanılmıştır.

0.2 N NaOH (10 N stoktan yeni sulandırılarak hazırlanır)

%1'lik (w/v) sds

3.2.2.5 Alkali lizis solüsyonu III

Plazmid izolasyonu için bakteri kültüründeki hücreleri lizi etmek için kullanılmıştır.

100 mL için

5 M potasyum asetat.....60 mL

Glasiyel asetik asit.....11.5 mL

H₂O.....28.5 mL

3.2.2.6 Kral suyu

100 mL için

Nitrik asit 25 mL

Hidroklorik asit 75 mL

3.2.3. Bakteri izolasyonu

3.2.3.1. *Pseudomonas* sp. izolasyonu

Alınan toprak örneklerinden *Pseudomonas* sp. bakteri izolasyonu yapmak için aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

1. 1 Gram toprak örneği alınarak 10 mL steril distile su içinde süspanse edilmiş, hazırlanan bu süspansiyon 2000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek toprak partiküllerinin çöktürülmüştür.

2. Bakteri izolasyonu için üst sıvıda kalan berrak sıvıdan 500 µL alınarak seri sulandırmalar (dilüsyonlar) yapılmış ve GSP Agar besiyerine yayılarak ekimleri yapılmıştır. 27⁰C sıcaklıkta bir gecelik inkübasyondan sonra burada gelişme gösteren kolonilerden mavi-mor renkli, etrafı kırmızı zonlu koloniler seçilerek *Pseudomonas* sp. olarak nitelendirilmiş ve Nutrient Agar içeren eğik katı besi yerilerine ekilmiştir. 27⁰C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda örnekler +4⁰C'ta buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.2. *Bacillus* sp. izolasyonu

Alınan toprak örneklerinden *Bacillus* sp. bakteri izolasyonu için ise ;

1. 1 Gram toprak örneği alınarak 10 mL steril distile su ile süspanse edilmiş, hazırlanan bu süspansiyon 2000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek toprak partiküllerinin çöktürülmesi sağlanmıştır.

2. Daha sonra bu tüpler alınarak 60⁰C sıcaklıkta 35 dakika bekletilerek vejetatif üreyen bakteriler öldürülmüştür.

3. Bakteri izolasyonu için üst kısımdaki berrak sıvıdan 500 µL alınarak seri sulandırmalar yapılmış ve Nutrient Agar besiyerine yayılarak ekilmiştir. 27⁰C

sıcaklıkta bir gecelik inkübasyondan sonra burada üreyen tek düşmüş koloniler alınarak Nutrient Agar içeren eğik katı besiyerlerine ekilmiş ve buzdolabında saklanmıştır.

3.2.4. MTC (Maximum Tolerable Concentrations) Değerlerinin Tespiti

1. İzole edilen *Pseudomonas* ve *Bacillus* sp. suşlarının MTC değerlerinin tespiti için, çeşitli konsantrasyonlarda ağır metal içeren katı besiyerleri hazırlanmıştır.

2. Bakteriler bu besiyerlerine çizgi veya nokta şeklinde ekilerek 30°C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3. İnkübasyon süresi sonunda ekimi yapılan hücrelerde üreme olup olmadığı kontrol edilerek MTC değerleri tespit edilmiştir.

3.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu

1. Plazmid izolasyonu yapılacak bakteriler, 5 mL'lik NB (Nutrient Broth) besiyerine ekilerek 30°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

2. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerden 1.5 mL alınarak Eppendorf tüplerine aktarılıp 4°C'de 10000 devir/dakika'da 30 saniye santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır.

3. Eppendorf tüplerindeki hücrelerin üzerine 100 µl Alkali lizis I solüsyonundan eklenmiştir. Tüplerdeki karışımlar homojen oluncaya kadar vorteks edilmiştir.

4. Daha sonra tüplerdeki karışımlara 200 µl Alkali lizis II solüsyonu eklenmiştir ve sonra tüpler birkaç kez alt-üst edilmiştir (bu aşamada vorteks kullanılmamıştır). Bu işlemten sonra tüpler buz içinde birkaç dakika bekletilmiştir.

5. Tüpler buz içinden çıkarılıp üzerlerine 150 µl Alkali lizis III solüsyonu eklenip, birkaç kez alt-üst edilmiştir. Bu işlemden sonra tüpler buz içinde 5 dakika bekletilmiştir.

6. Tüpler 4°C’de 10000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edilip, süpernatantlar toplanarak yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu işlemden sonra süpernatant bulunan yeni tüplere 2 hacim (1:2) oda sıcaklığına sahip Etanol eklenmiş, vortekslendikten sonra, iki dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

7. Presipite olan nükleik asit molekülleri, 4°C’de 10000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülüp, süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde atılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında bırakılarak etanol uçurulmuştur.

8. Tüplere 1 ml % 70’lik etanol eklenip, birkaç kez alt-üst edildikten sonra, 4°C’de 10000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar kısmı dikkatli bir şekilde atılmıştır ve tüpler oda sıcaklığında bekletilerek kalan etanol uçurulmuştur.

9. Tüplerdeki nükleik asit moleküllerinin üzerine 50 µl TE (Tris-EDTA) eklenmiştir.

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

1. DNA örnekleri %0,7’lik agaroz jelde 50 Volt’luk akım uygulanarak 3 saat süreyle yürütülmüştür.

2. Elektroforez bitiminde jel, ethidium bromid ile boyanmış ve UV transillüminatör üzerine konularak DNA bandlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3. Plazmid DNA'ların büyüklüğü jel dökümantasyon sistemi (UVP) kullanarak belirlenmiştir.

3.2.7. Ağır Metallerin Biyosorpsiyonu

1. Denenecek olan *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşları 250 ml'lik Nutrient Broth besiyerinde 30°C'de 18 saat inkübe edilerek durgun faza ulaşması sağlanmıştır.

2. Ardından bakteri kültürü 10000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürölüp süpernatant kısmı atılmıştır. Hücreler steril distile su ile birkaç kez yıkanmıştır.

3. Yıkanmış olan hücreler ayrı ayrı; 50 ml 5 mM CuCl₂, 50 ml 5 mM ZnCl₂, 50 ml 4 mM NiCl₂, 50 ml 2 mM K₂Cr₂O₇, 50 ml 0.8 mM CoCl₂, içeren solüsyonlar içine 50'şer mg inoküle edilmiştir. Kültür çalkalayıcılı inkübatörde 150 devir/dakikada, 3 saatte bir 2 ml örnek almak suretiyle, 30°C'de 15 saat süreyle inkübe edilmiştir.

4. Alınan örnekler 10000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürölüp, süpernatant kısmındaki ağır metal konsantrasyonunun analiz edilmesi için temiz ve steril eppendorf tüplerine aktarılıp hacimleri 10 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler ICP'de analiz edilmek üzere buzdolabında saklanmıştır.

5. Hücre pelletleri ise 65°C'de 20 saat süreyle Pasteur fırınında kurutulmuştur.

6. Kurutulan hücre pelletleri %70'lik HNO₃ ile bir gece bekletilerek parçalanmıştır. Daha sonra örnekler filtreden geçirilip hacimleri 10 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler ICP'de analiz edilmek üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.2.8. Toprak örneklerinin ICP analizi için hazırlanması

1. Toprak örnekleri CHEM MARS5 marka mikrodalga fırınında 0'dan 230°C'ye kadar 20 dakika (ramp time) ve 230°C'de 5 dakika (hold time) bekletildi. Daha sonra örnekler soğutulmaya bırakıldı.

2. Soğuyan toprak örneklerinden 0,5 gram örnek tartılarak üzerine ve 10 mL Hidrojen Florür + 10 mL Kral suyu eklenerek parçalanmaları sağlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. İzole edilen *Pseudomonas* sp.ve *Bacillus* sp. suşlarının özellikleri

Alınan toprak örnekleri seri dilüsyon yöntemi ile sulandırıldıktan sonra GSP agar besiyerine yayma şeklinde ekimler yapılmıştır. Burada gelişme gösteren kolonilerden mavi-mor renkli, etrafı kırmızı zonlu koloniler seçilerek *Pseudomonas* sp. olarak nitelendirilmiştir.

Toprak örnekleri seri dilüsyon yöntemi ile sulandırıldıktan sonra 60⁰ C’de 35 dakika bekletildikten sonra nutrient agar besiyerine yayma şeklinde ekimleri yapılmıştır. Burada üreyen kolonilerden şeffaf-beyaz renkli düz kenarlı ve yuvarlak koloniler seçilerek *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır.

4.1.2. Alınan toprak örneklerinin ICP analiz sonuçları

Kazanlı’da bulunan ağır metal sanayi tesislerinin çevresinden alınan toprak örneklerinin ICP analiz sonuçları aşağıdaki (Çizelge 4.1) gibi tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre;

A1 bölgesinden alınan toprak örneklerinde Cd miktarı 0,258 mg/kg, Co miktarı 16,346 mg/kg, Cr miktarı 565,919 mg/kg, Cu miktarı 25,83 mg/kg, Ni miktarı 95,517 mg/kg, Zn miktarı 38,172 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

B1 bölgesinden alınan toprak örneklerinde ise; Cd miktarı 0,883 mg/kg, Co miktarı 19,346 mg/kg, Cr miktarı 431,045 mg/kg, Cu miktarı 31,439 mg/kg, Ni miktarı 255,495 mg/kg, Zn miktarı ise 65,995 mg/kg olarak tesbit edilmiştir.

B2 bölgesinden alınan toprak örneklerinde ise; Cd miktarı 0,804 mg/kg, Co miktarı 20,376 mg/kg, Cr miktarı 276,819 mg/kg, Cu miktarı 41,527 mg/kg, Ni miktarı 272,591 mg/kg, Zn miktarı 63,166 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

B3 bölgesinden alınan toprak örneklerinde ise; Cd miktarı 0,191 mg/kg, Co miktarı 22,868 mg/kg, Cr miktarı 249,247 mg/kg, Cu miktarı 36,767 mg/kg, Ni miktarı 333,835 mg/kg, Zn miktarı ise 47,561 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

Kontrol toprak örneğinin sonuçları ise; Cd miktarı 1,080 mg/kg, Co miktarı 8,134 mg/kg, Cr miktarı 107,450 mg/kg, Cu miktarı 13,315 mg/kg, Ni miktarı 56,284 mg/kg, Zn miktarı ise 26,055 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1: Alınan toprak örneklerinin mg/kg türünden sonuçları.

<i>Toprak Örnekler</i>	<i>Cd</i>	<i>Co</i>	<i>Cr</i>	<i>Cu</i>	<i>Ni</i>	<i>Zn</i>
A1	0,258	16,346	565,919	25,783	95,517	38,172
B1	0,883	19,923	431,045	31,439	255,495	65,995
B2	0,804	20,376	276,819	41,527	272,591	63,166
B3	0,191	22,868	249,247	36,767	333,835	47,561
Kontrol toprağı	1,080	8,134	107,450	13,315	56,284	26,055

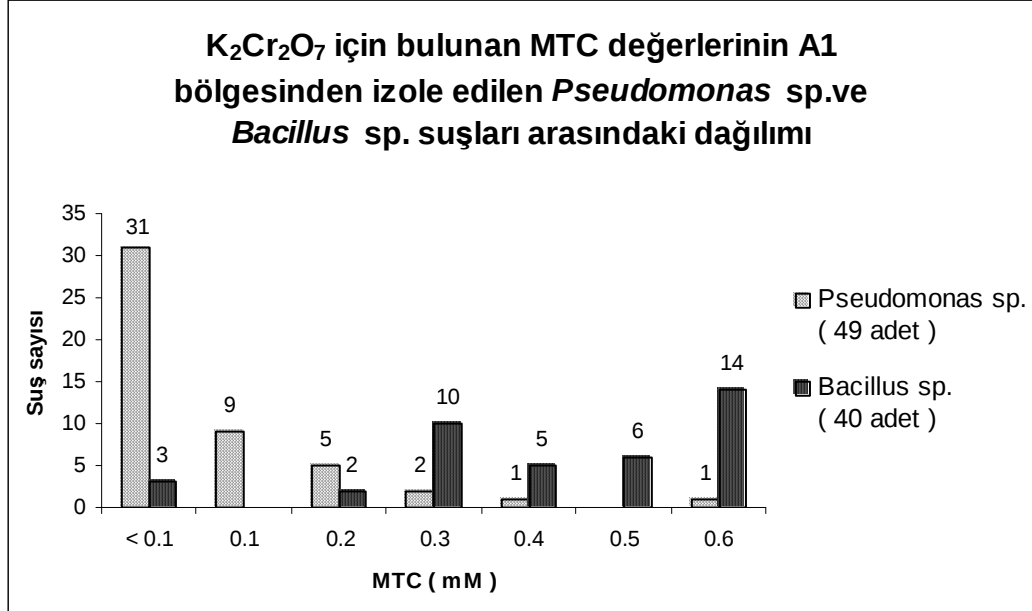
Alınan toprak örneklerinin ICP analiz sonuçlarının ppm/g cinsinden sonuçları aşağıdaki (Çizelge 4.2) gibidir.

Çizelge 4.2 : Alınan toprak örneklerinin ppm/g cinsinden sonuçları ve pH değerleri

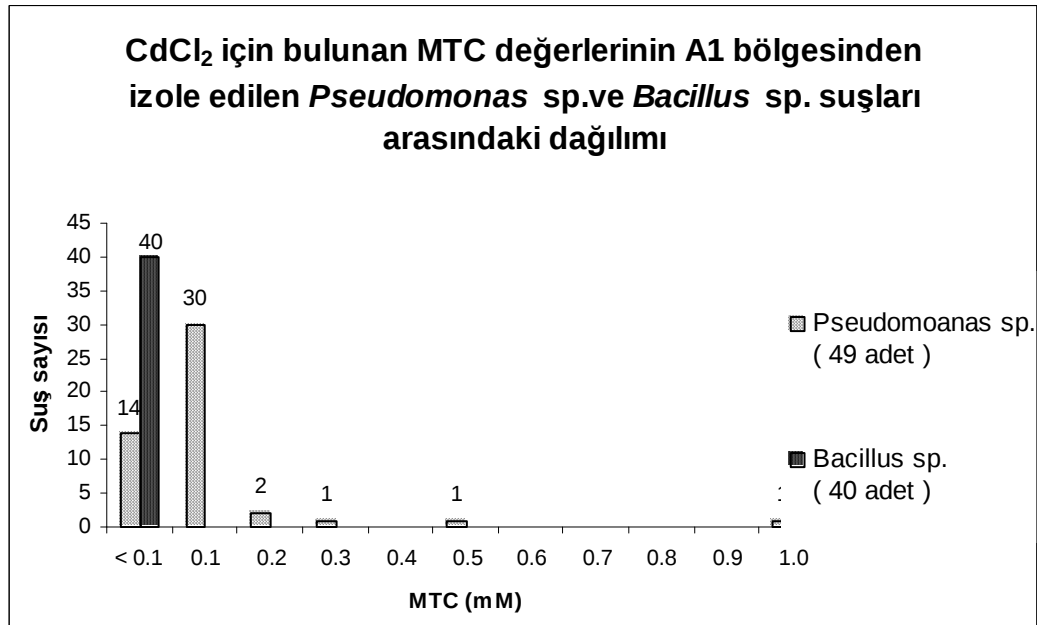
<i>Toprak Örnekler</i>	<i>Cd</i>	<i>Co</i>	<i>Cr</i>	<i>Cu</i>	<i>Ni</i>	<i>Zn</i>	<i>pH</i>
A1	0,006	0,408	14,147	0,644	2,387	0,954	8,3
B1	0,022	0,498	10,776	0,785	6,387	1,649	7,8
B2	0,020	0,509	6,920	1,038	6,814	1,579	7,5
B3	0,004	0,571	6,231	0,919	8,345	1,189	8,6
Kontrol toprağı	0,027	0,203	2,686	0,332	1,407	0,651	7,3

4.1.3. İzole edilen bakterilerin ağır metallere karşı gösterdikleri direnç değerlerine ait bulgular

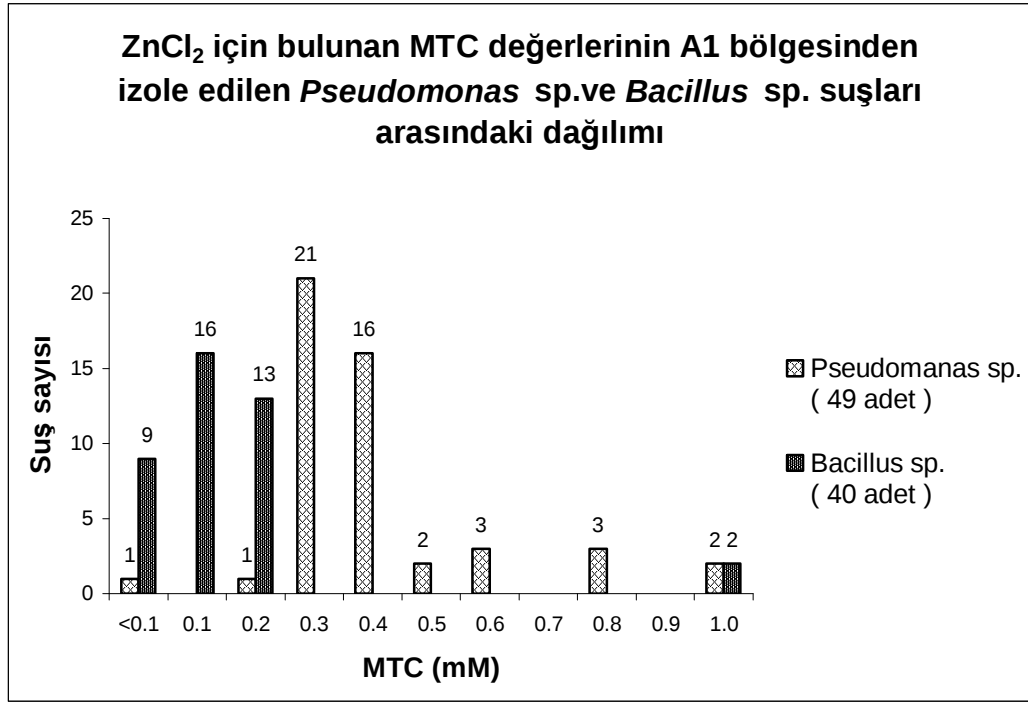
4.1.3.1. A1 bölgesinden izole edilen bakterilerin MTC dağılımları



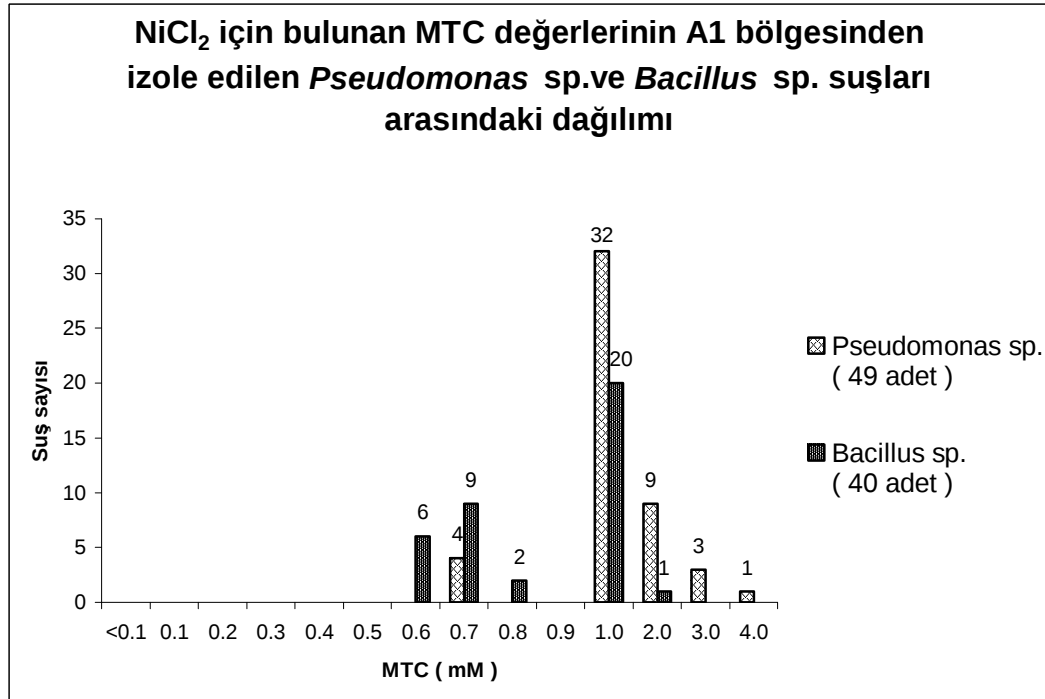
Şekil 4.1: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının K₂Cr₂O₇ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun K₂Cr₂O₇ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



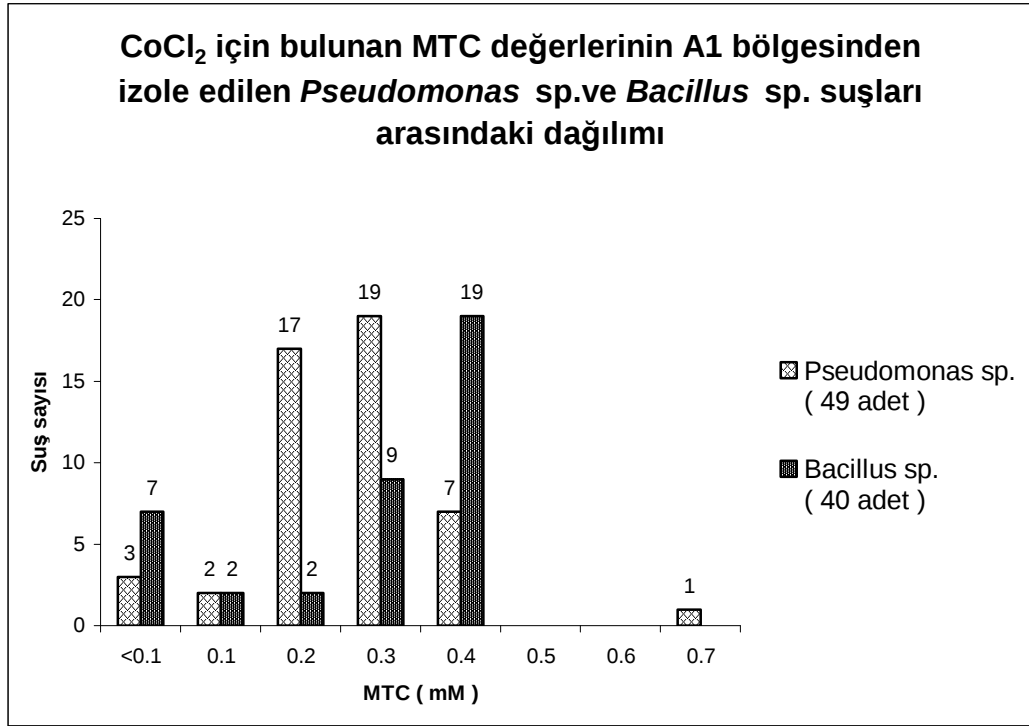
Şekil 4.2: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CdCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CdCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



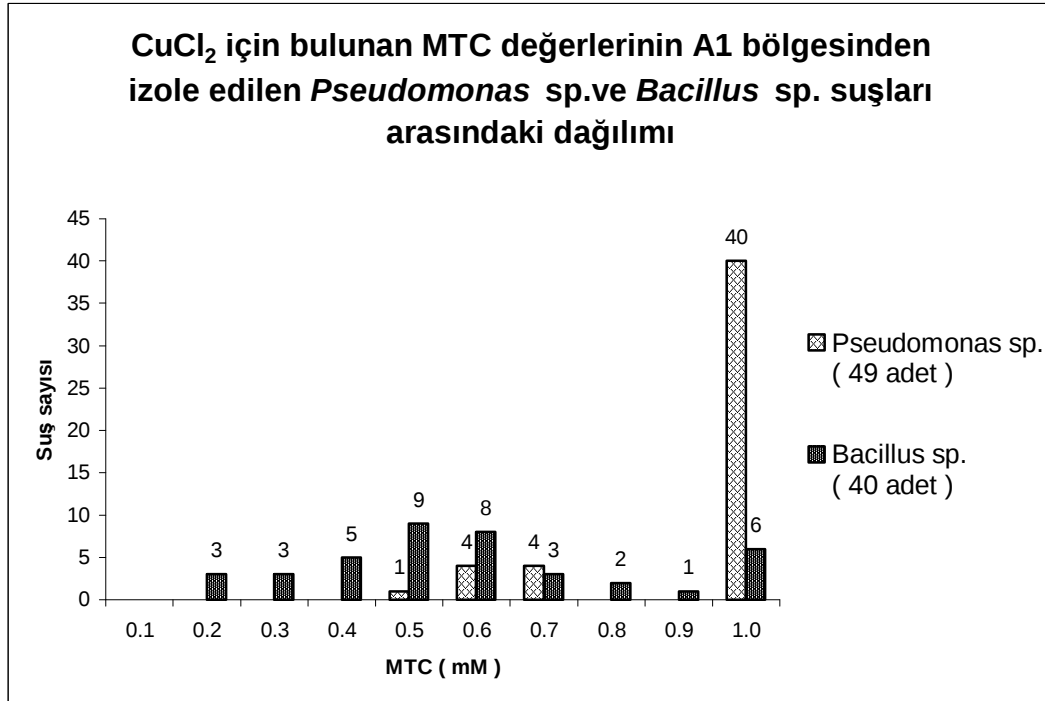
Şekil 4.3: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının ZnCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun ZnCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



Şekil 4.4: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının NiCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun NiCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).

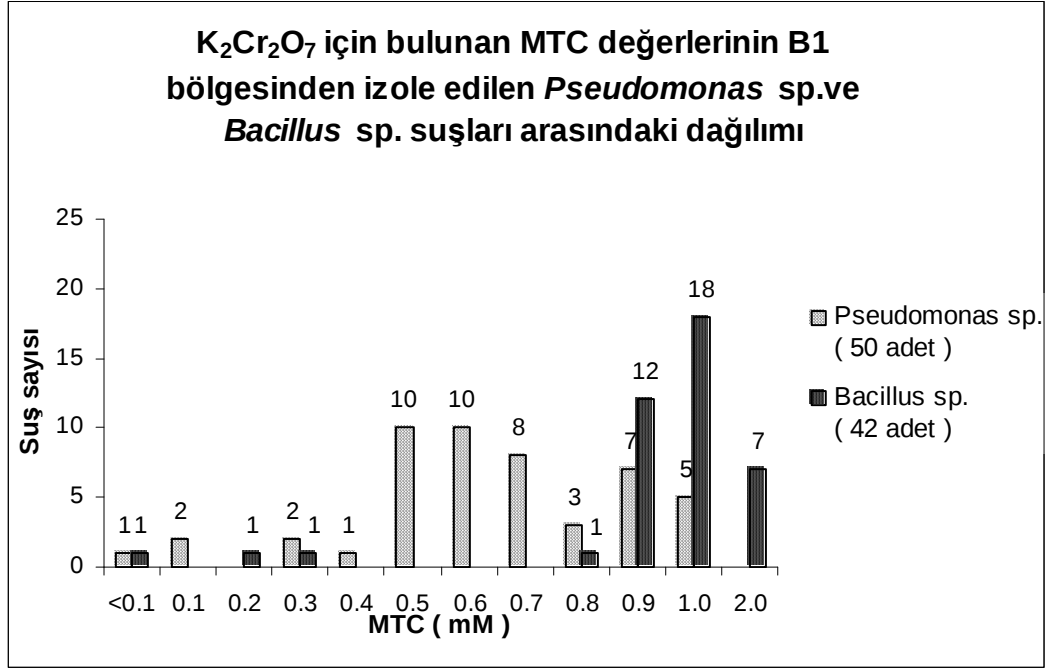


Şekil 4.5: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CoCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CoCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).

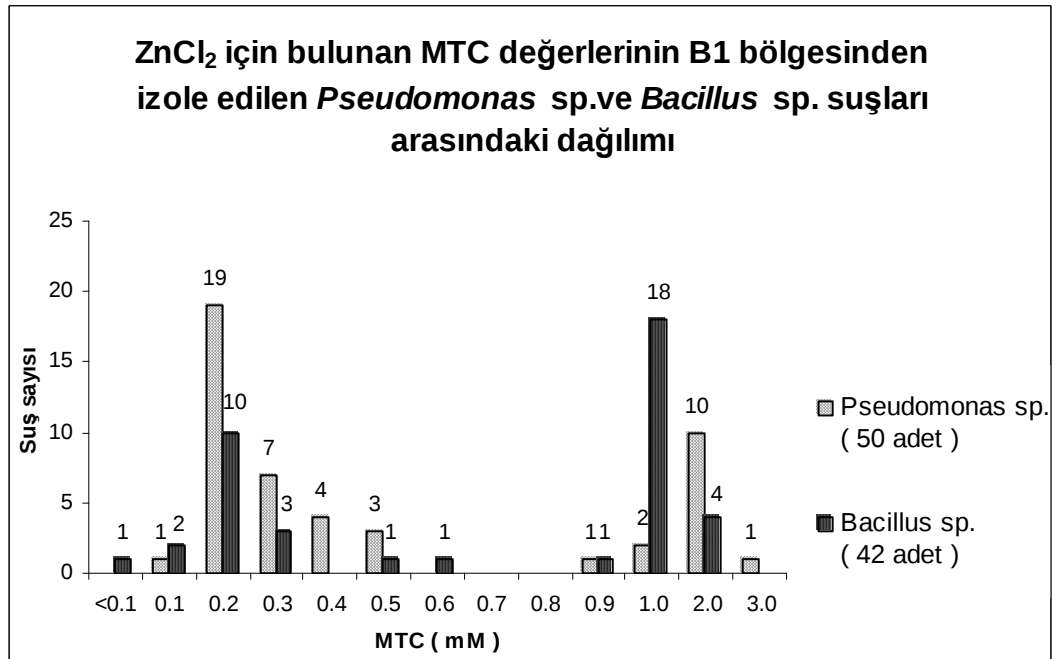


Şekil 4.6: A1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CuCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CuCl₂ için MTC değeri 2,0 mM'dır).

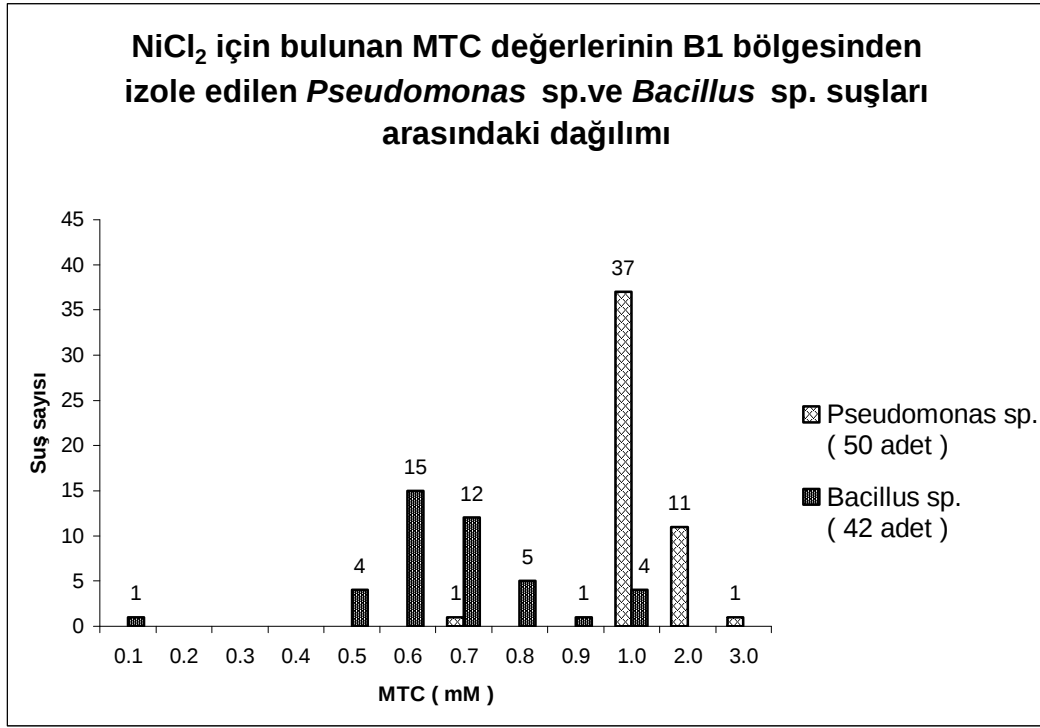
4.1.3.2. B1 bölgesinden izole edilen bakterilerin MTC dağılımları



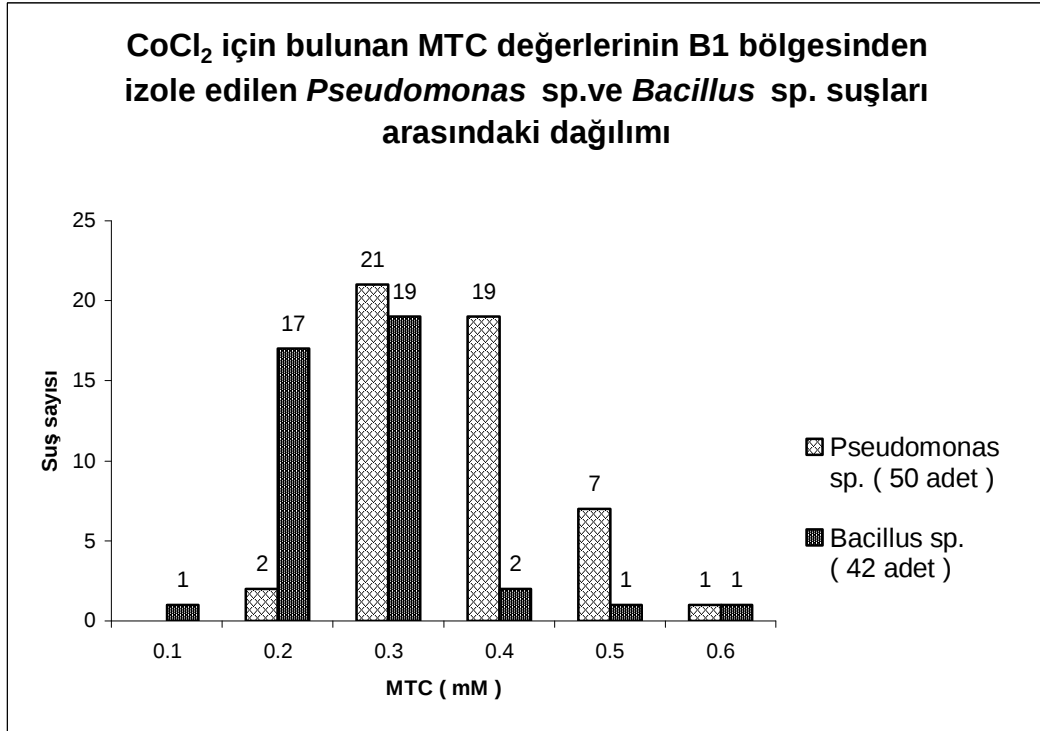
Şekil 4.7: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının K₂Cr₂O₇ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun K₂Cr₂O₇ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



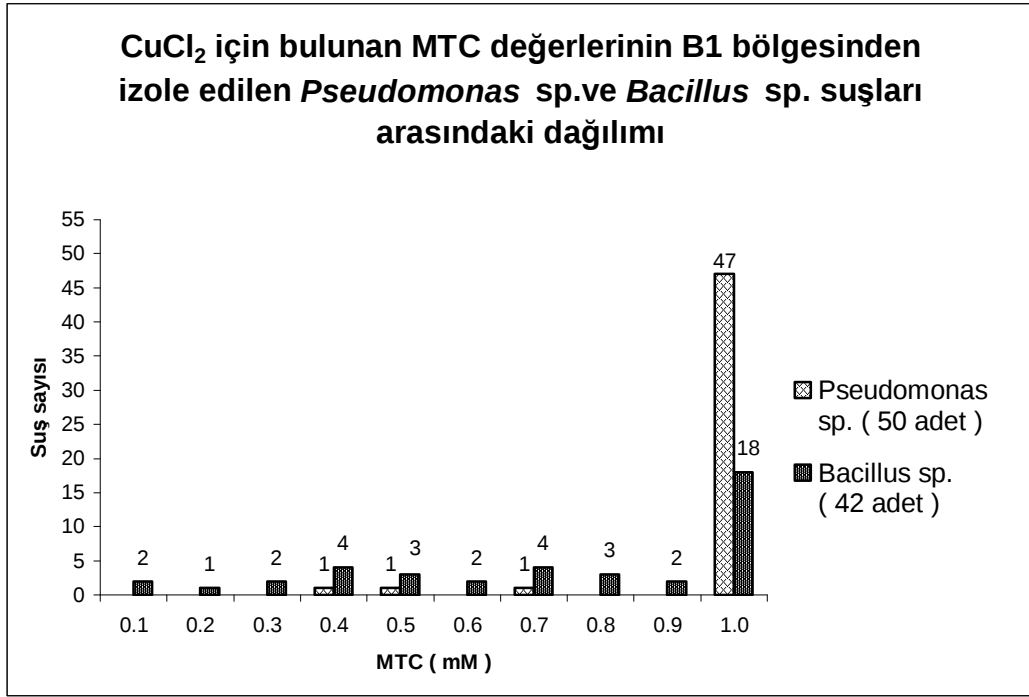
Şekil 4.8: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının ZnCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun ZnCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



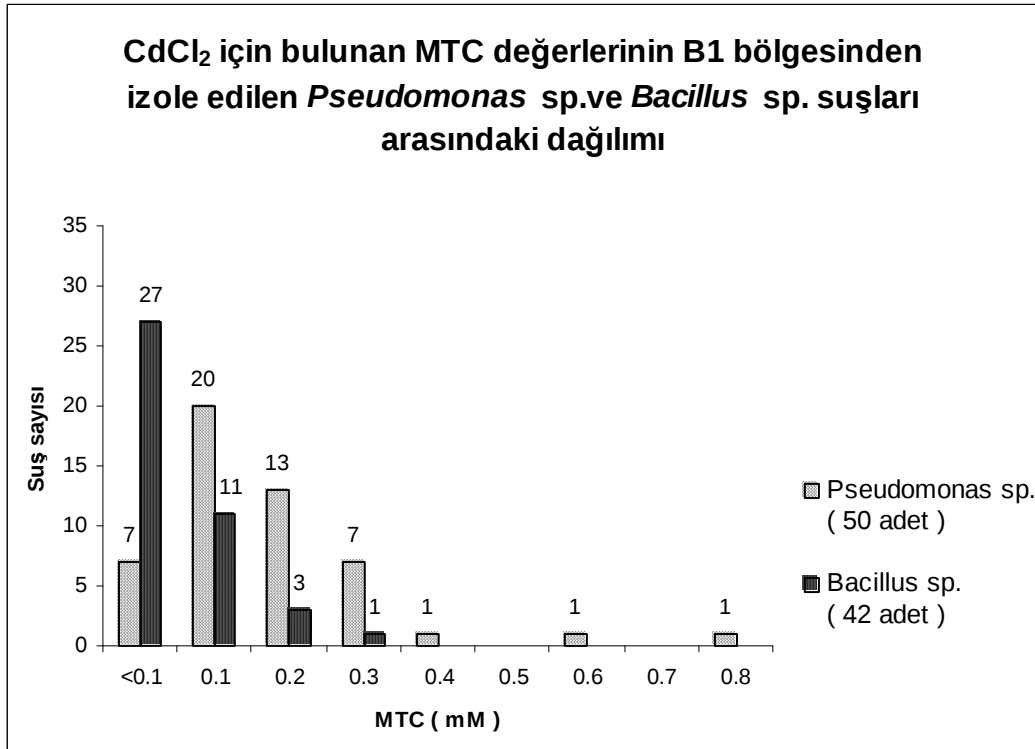
Şekil 4.9: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. suşlarının NiCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun NiCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



Şekil 4.10: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CoCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CoCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).

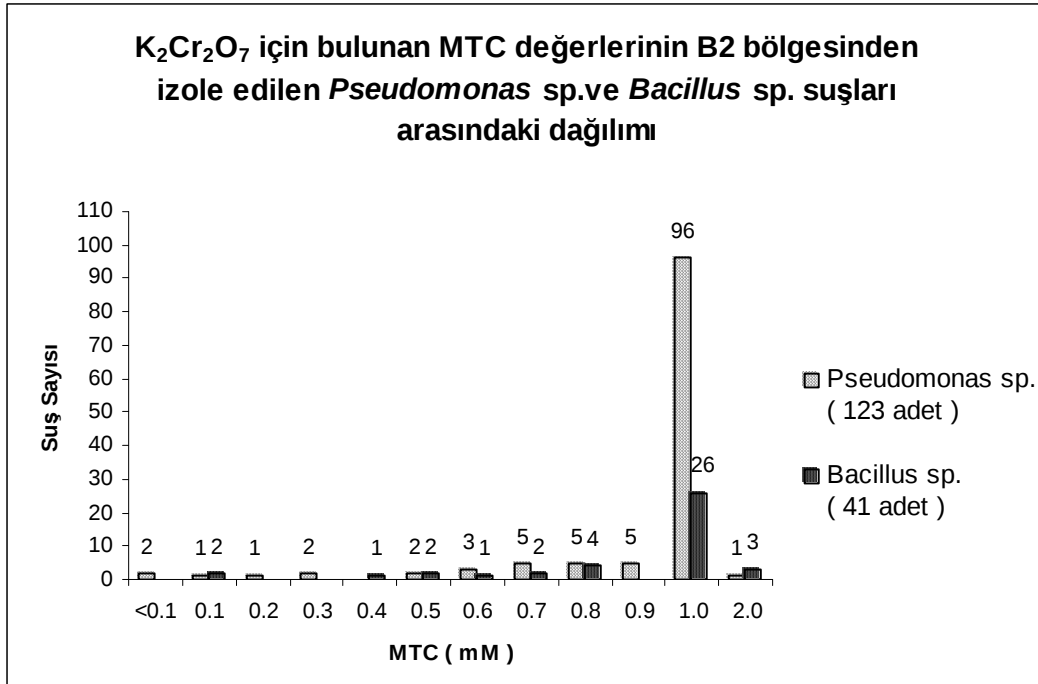


Şekil 4.11: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CuCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CuCl için MTC değeri 2,0 mM'dır).

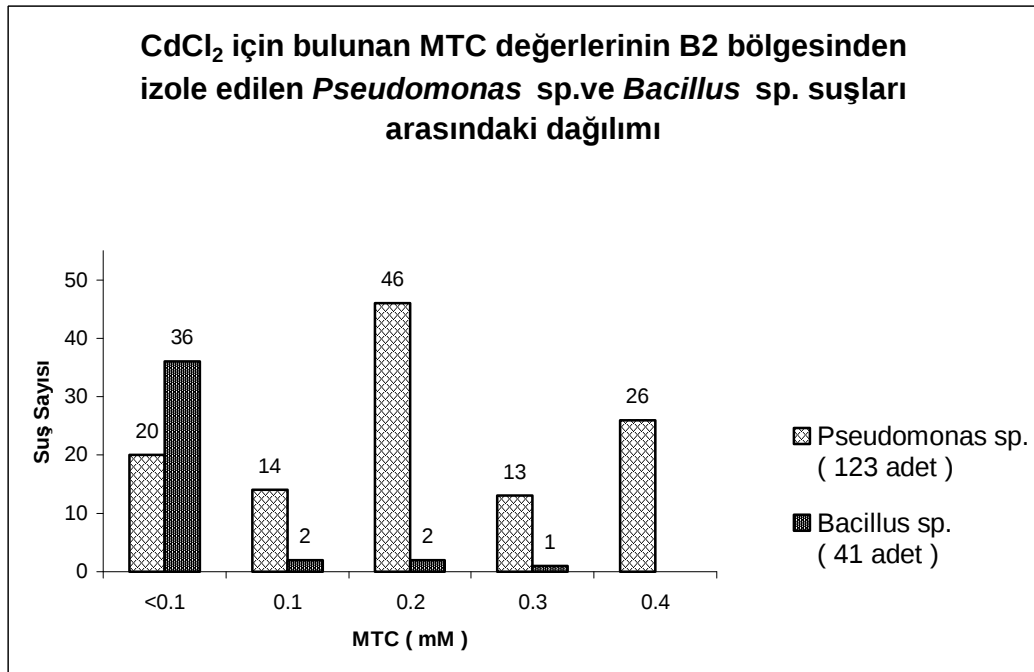


Şekil 4.12: B1 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CdCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CdCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).

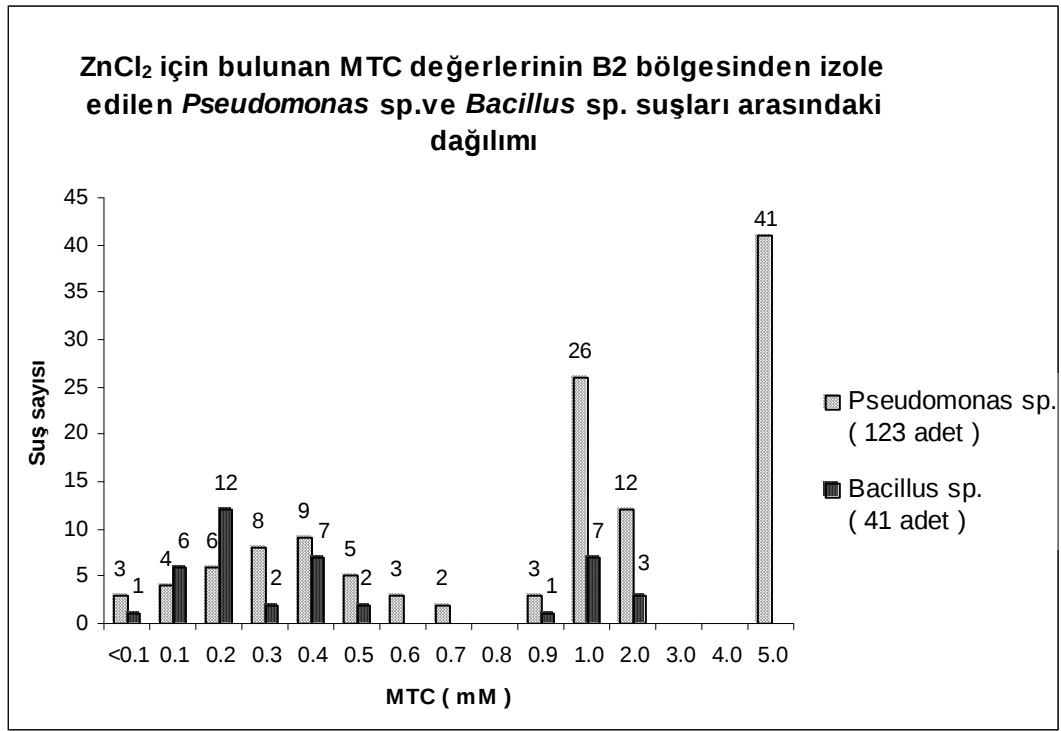
4.1.3.3. B2 bölgesinden izole edilen bakterilerin MTC dağılımları



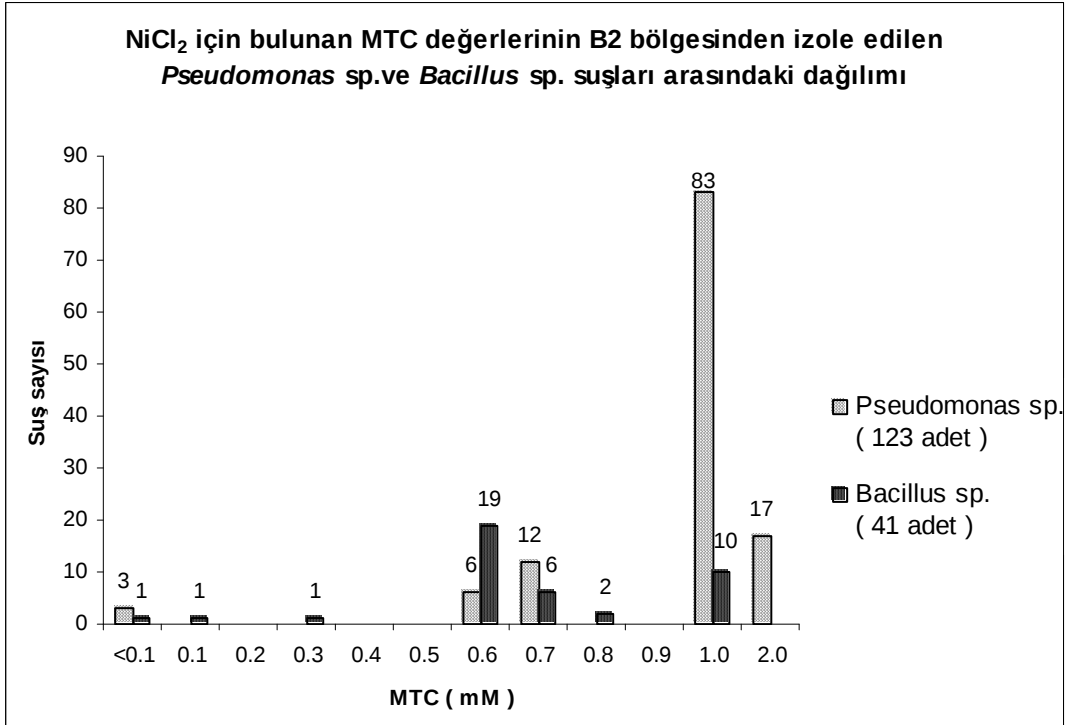
Şekil 4.13: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının K₂Cr₂O₇ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun K₂Cr₂O için MTC değeri 0,4 mM'dır).



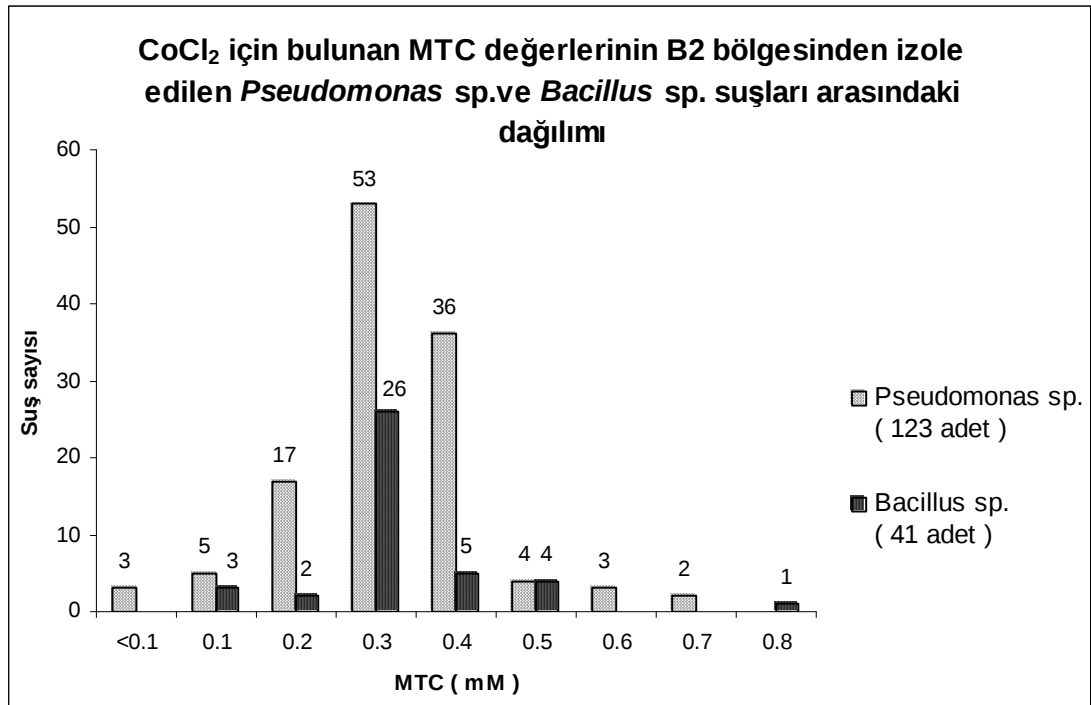
Şekil 4.14: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CdCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CdCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



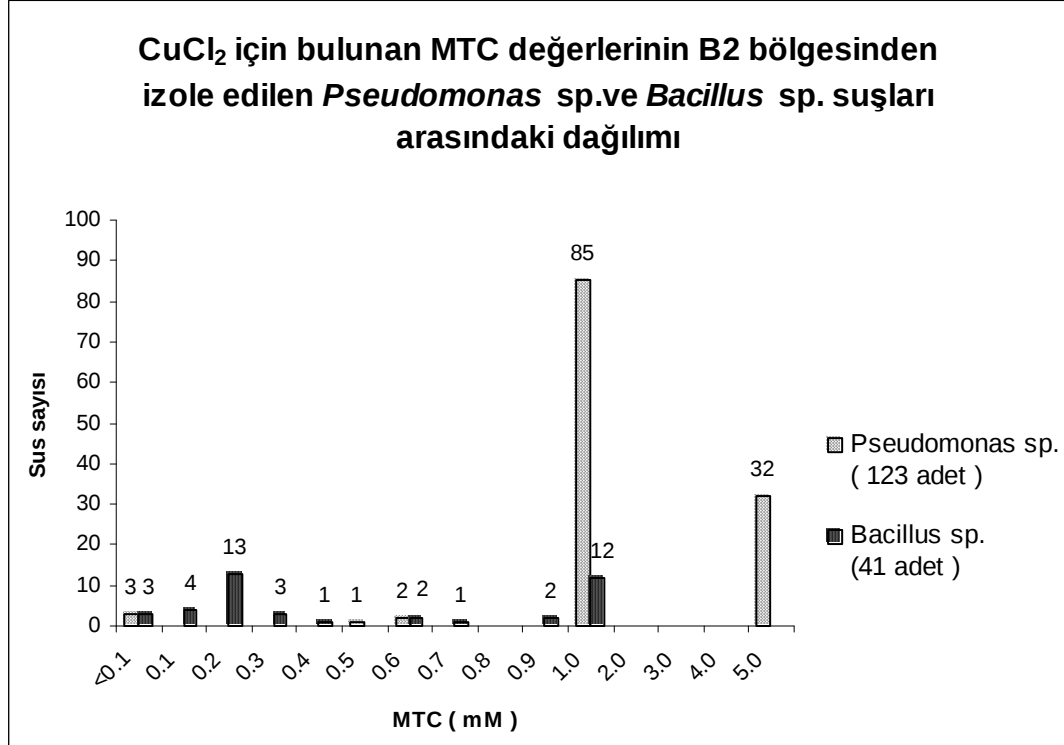
Şekil 4.15: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının ZnCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun ZnCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



Şekil 4.16: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının NiCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun NiCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).

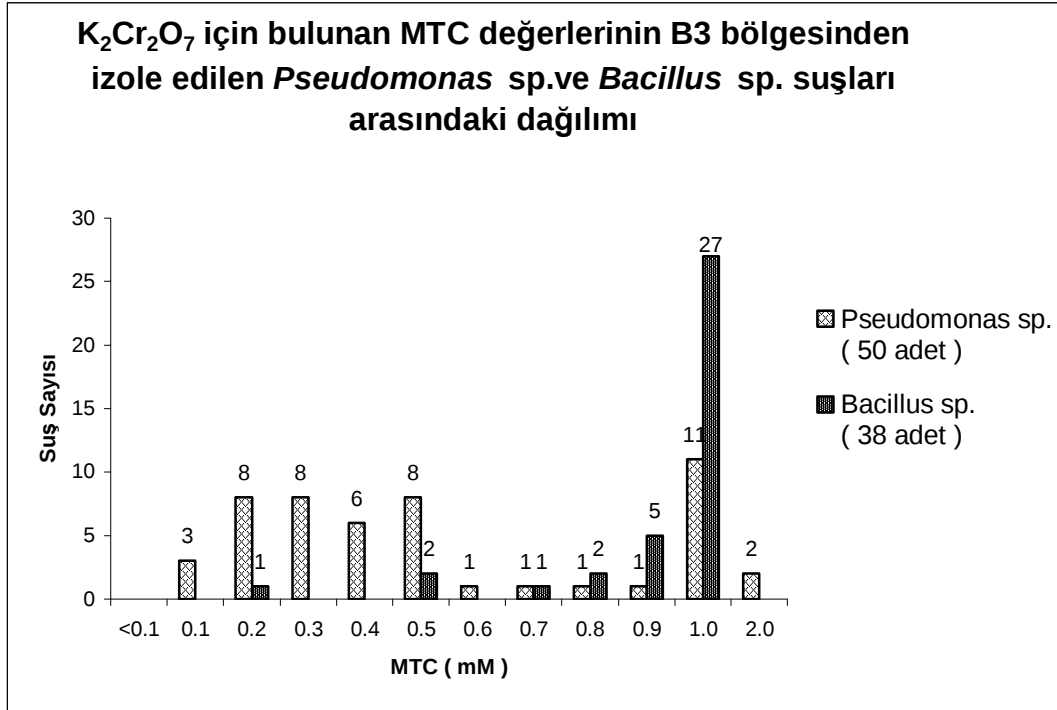


Şekil 4.17: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CoCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CoCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).

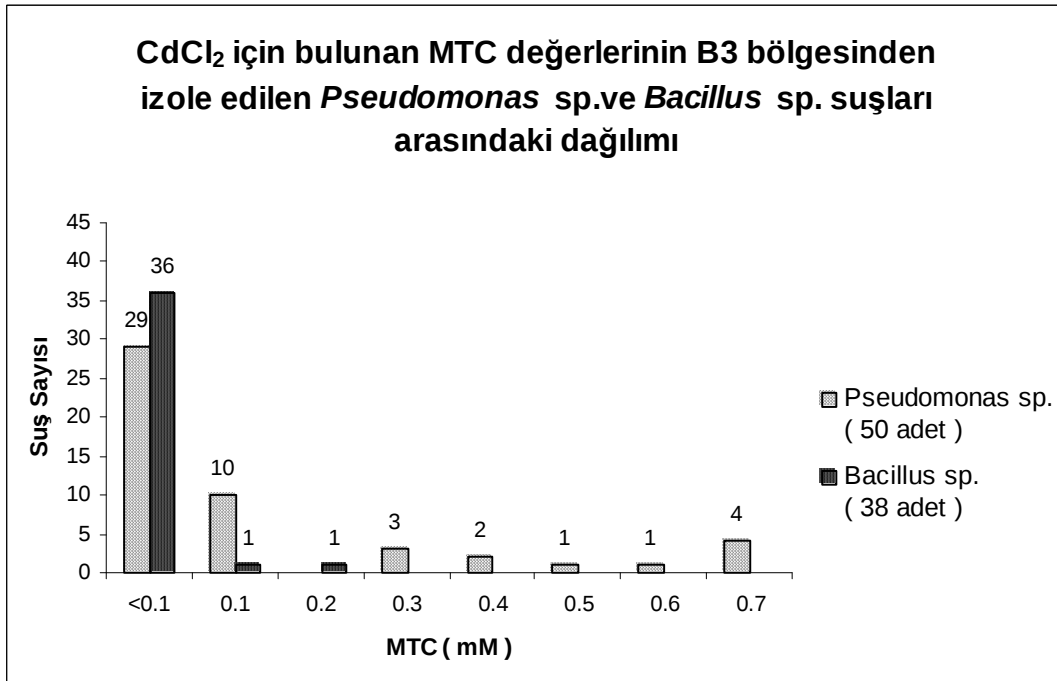


Şekil 4.18: B2 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CuCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CuCl₂ için MTC değeri 2,0 mM'dır).

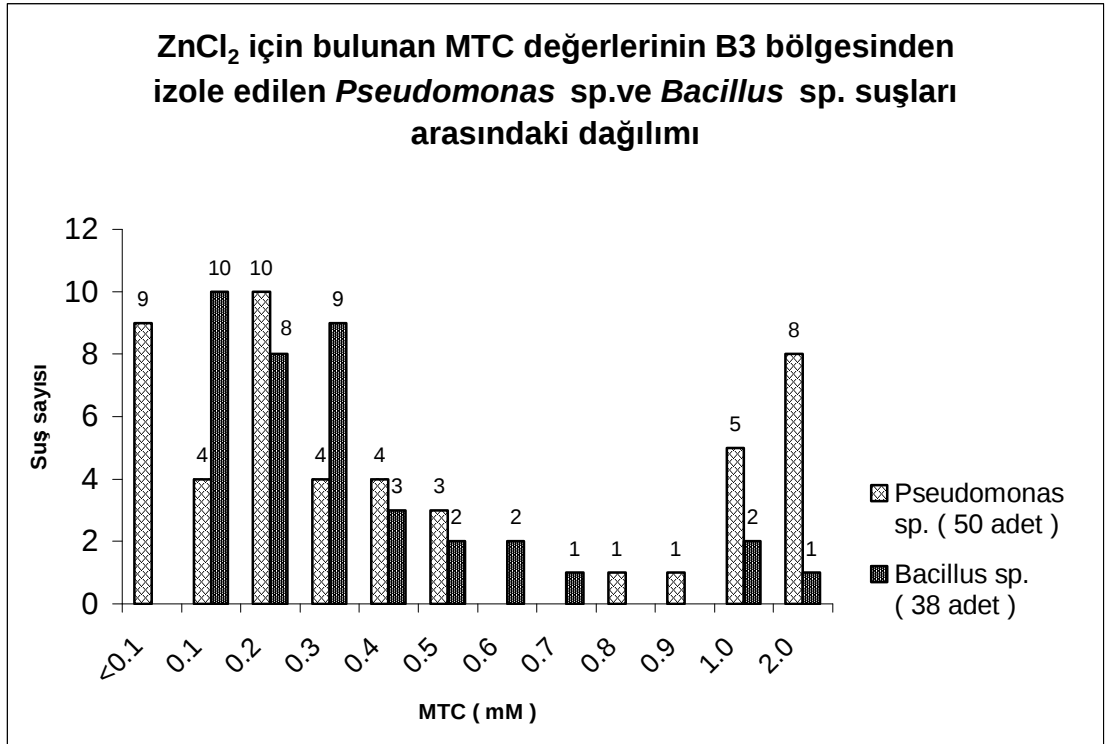
4.1.3.4. B3 bölgesinden izole edilen bakterilerin MTC dağılımları



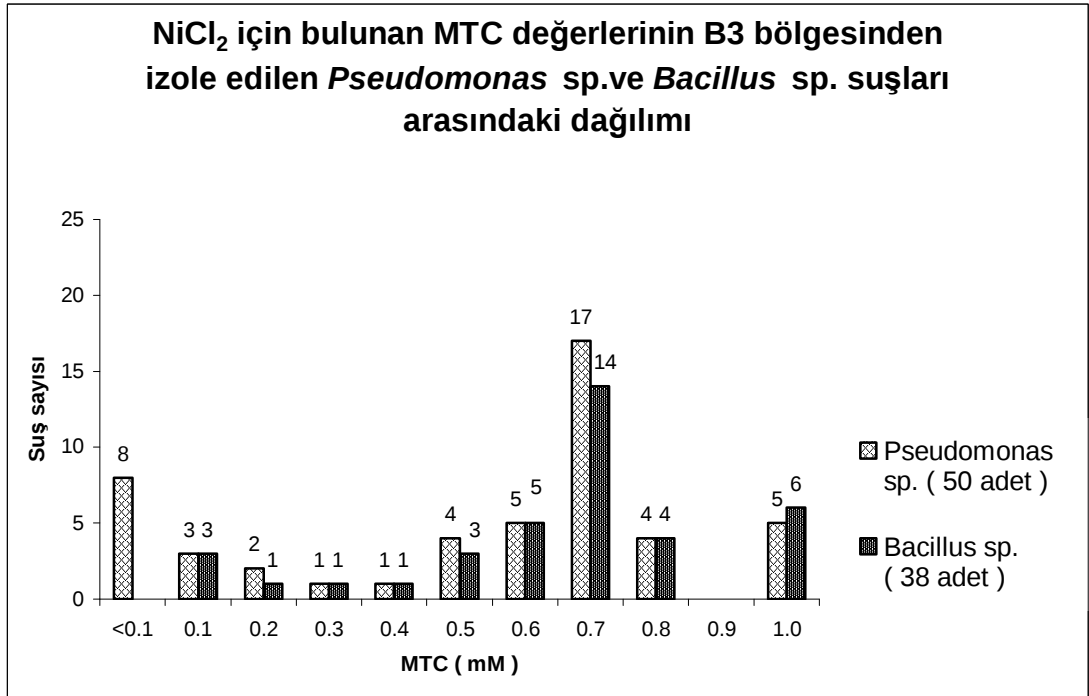
Şekil 4.19: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının K₂Cr₂O₇ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun K₂Cr₂O₇ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



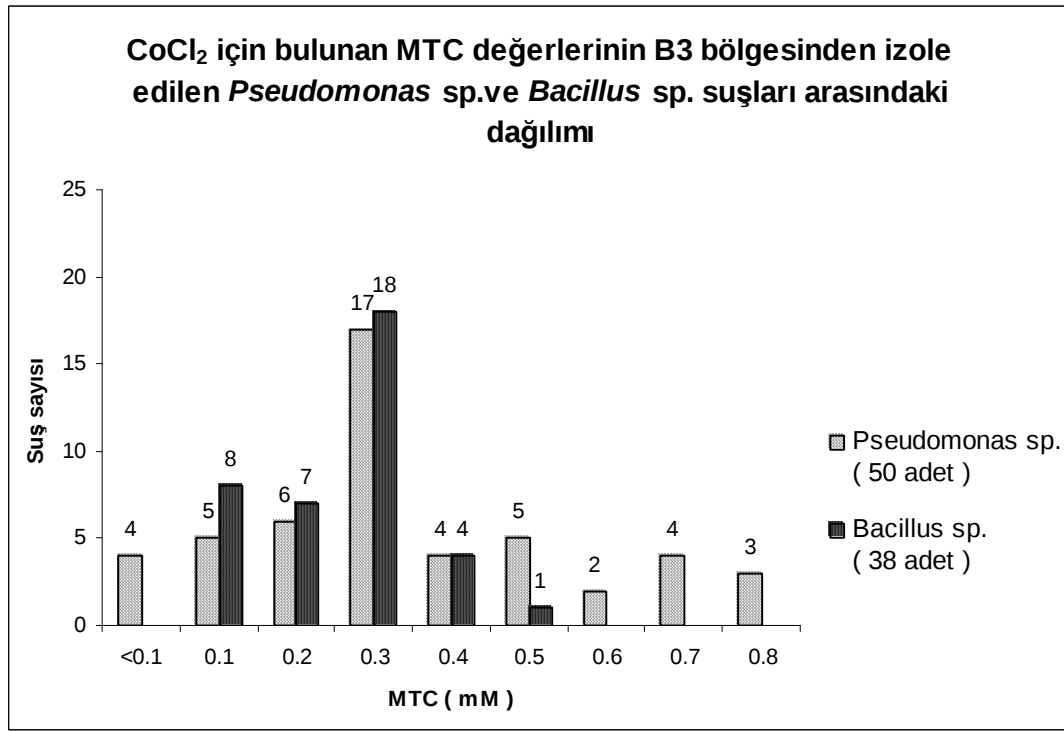
Şekil 4.20: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CdCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CdCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



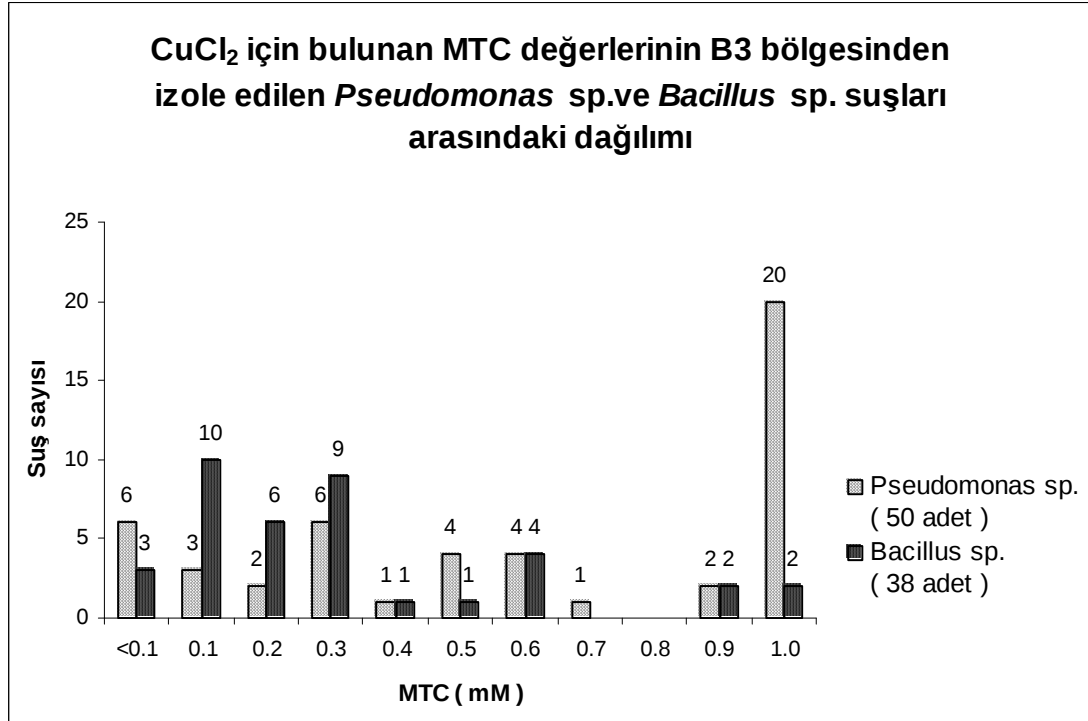
Şekil 4.21: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının ZnCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun ZnCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



Şekil 4.22: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının NiCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun NiCl₂ için MTC değeri 1,0 mM'dır).



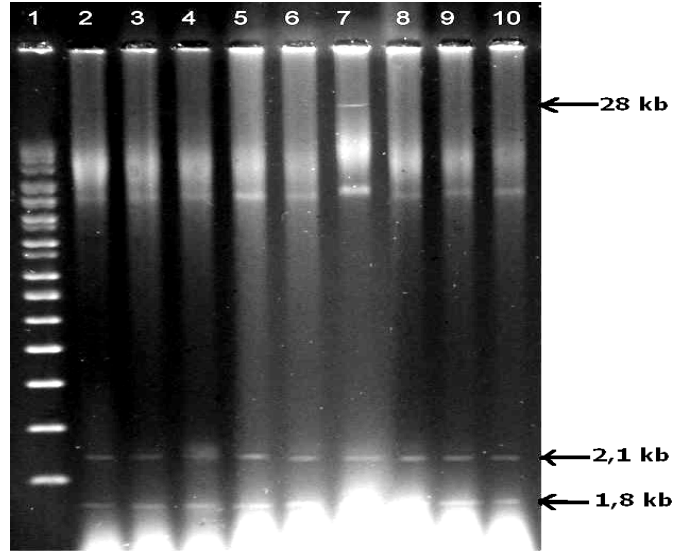
Şekil 4.23: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CoCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CoCl₂ için MTC değeri 0,4 mM'dır).



Şekil 4.24: B3 bölgesinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarının CuCl₂ için MTC değerlerinin örnekler arasındaki dağılımı (*E.coli* ATCC 11230 suşunun CuCl₂ için MTC değeri 2,0 mM'dır).

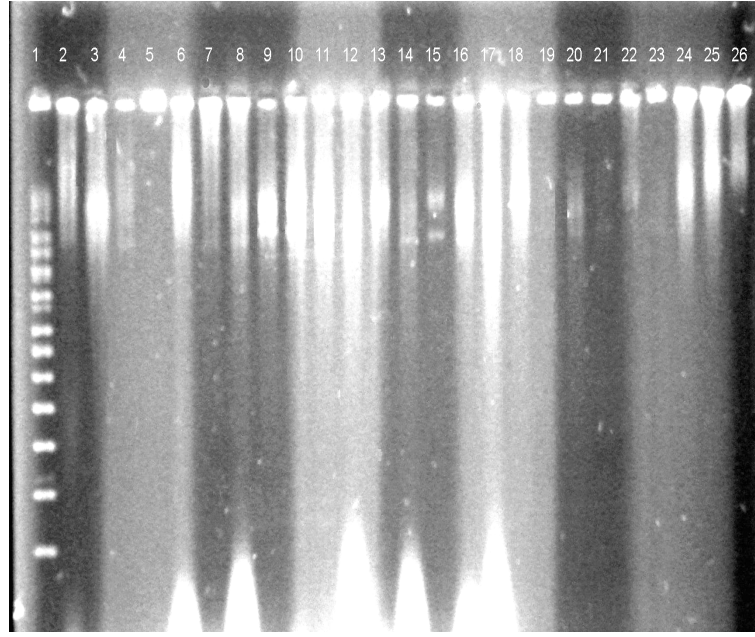
4.1.4. Ağır metal dirençliliği gösteren bakterilerin plazmid içeriklerine ait bulgular

Toprak örneklerinden izole edilen suşlardan yüksek MTC değerine sahip olanlardan 36 adet örnek seçilmiştir. Seçilen örneklere plazmid izolasyonu uygulanmıştır ve örnekler % 0,7 agaroz jelde 50 V uygulanarak 3 saat süre ile separe edilmiştir. Elektroforez sonucunda bazı suşlarda plazmid görülmüştür. (Şekil 4.25)



Şekil 4.25: En yüksek MTC değerine sahip suşlardan bazılarının plazmid profilleri (No1: marker, No2: A1P41 , No3: B2P55 , No4: B2P60 , No5: B2P77 , No6: B2P99 , No7: B2P110 , No8: B2P115 , No9: B2P117 , No10: B2P123)

Yapılan agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucunda 3mM NiCl₂ çözeltisine direnç gösteren A1P41 numaralı suшта büyüklükleri 1,8 kb ve 2,1 kb olan 2 adet plazmid, 5mM ZnCl₂ çözeltisine direnç gösteren B2P55 ve B2P77 numaralı suşlarda büyüklükleri 1,8 kb ve 2,1 kb olan 2 adet plazmid, 5mM CuCl₂ çözeltisine direnç gösteren B2P99, B2P115, B2P117 ve B2P123 numaralı suşlarda büyüklükleri 1,8 kb ve 2,1 kb olan 2 adet plazmid, 5mM CuCl₂ çözeltisine direnç gösteren B2P110 numaralı suшта büyüklükleri 1,8 kb , 2,1 kb ve 28 kb olan 3 adet plazmid, 2 mM K₂Cr₂O₇ çözeltisine ve 2 mM NiCl₂ çözeltisine direnç gösteren B2P60 numaralı suшта büyüklükleri 1,8 kb ve 2,1 kb olan 2 adet plazmid bulunmuştur (Şekil 4. 25).



Şekil 4.26: Plazmid içermeyen yüksek MTC değerine sahip bazı suşların elektroforetik profili. (No1: marker , No2:A1P16 , No3: B1P26 , No4: B1P37 , No5: B1B12 No6: B1B15 , No7: B2P5 , No8: B2P51 , No9: B2P66 , No10: B2P70 No11: B2P80 No12: B2P86 , No13: B2P88 , No14: B2P90 , No15: B2P96 , No16: B2P100 , No17: B2P106 , No18: B2P118 , No19: B2B31 , No20: B3P4 , No21: B3P36 , No22: B3P41 , No23: B3P43 , No24: B3P46 , No25: B3P49 , No26: B3P50)

Yapılan agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucunda (Şekil 4.26) 0,7 mM CoCl_2 çözeltisine direnç gösteren A1P16 numaralı suшта, 2 mM NiCl_2 çözeltisine direnç gösteren B1P26 numaralı suшта, 3 mM NiCl_2 çözeltisine direnç gösteren B1P37 numaralı suшта, 2 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ çözeltisine direnç gösteren B1B12, B1B15, B2P5 ve B2B31 numaralı suшта, 1 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 5 mM ZnCl_2 ve 2 mM NiCl_2 çözeltilerine direnç gösteren B2P51 numaralı suшта, 5 mM ZnCl_2 çözeltisine direnç gösteren B2P66, B2P70, B2P80, B2P86, B2P88, B2P90 numaralı suşlarda , 5 mM CuCl_2 çözeltisine direnç gösteren B2P96, B2P100, B2P106, B2P118, B3P49 ve B3P50 numaralı suşlarda, 2 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ çözeltisine direnç gösteren B3P4 numaralı suшта, 0,8 mM CoCl_2 çözeltisine direnç gösteren B3P36, B3P41 ve B3P43 numaralı suşlarda, 0,7 mM CdCl_2 ve 0,7 mM CoCl_2 çözeltisine direnç gösteren B3P46 numaralı suшта plazmid gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3 En yüksek ağır metal toleransı gösteren bazı suşların içermiş oldukları plazmidlerin dağılımları.

<i>Suşlar</i>	<i>MTC</i>	<i>Plazmid Adedi</i>	<i>Plazmid büyüklüğü (kb)</i>
A1P41	3 mM NiCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P55	5 mM ZnCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P77	5 mM ZnCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P99	5 mM CuCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P115	5 mM CuCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P117	5 mM CuCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P123	5 mM CuCl ₂	2	1.8 ve 2.1
B2P110	5 mM CuCl ₂	3	1.8, 2.1 ve 28
B2P60	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇ , 2 mM NiCl ₂	2	1.8 ve 2.1
A1P16	2 mM NiCl ₂	-	-
B1P26	3 mM NiCl ₂	-	-
B1P37	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B1B12	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B1B15	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B2P5	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B2P51	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P66	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P70	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P80	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P86	5 mM ZnCl ₂	-	-
	2 mM NiCl ₂	-	-
B2P88	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P90	5 mM ZnCl ₂	-	-
B2P96	5 mM CuCl ₂	-	-
	0.7 mM CoCl ₂	-	-
B2P100	5 mM CuCl ₂	-	-
B2P106	5 mM CuCl ₂	-	-
	2 mM NiCl ₂	-	-
B2P118	5 mM CuCl ₂	-	-
	2 mM NiCl ₂	-	-
B2B31	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B3P4	1 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
B3P36	0.8 mM CoCl ₂	-	-
B3P41	0.8 mM CoCl ₂	-	-
B3P43	0.8 mM CoCl ₂	-	-
B3P46	0.7 mM CoCl ₂	-	-
	0.7 mM CdCl ₂	-	-
B3P49	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
	0.7 mM CdCl ₂	-	-
B3P50	2 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	-	-
	0.7 mM CdCl ₂	-	-

4.1.5. Referans olarak kullanılan *E.coli* ATCC11230 örneklerinin seçilen ağır metaller için bulunan MTC değerleri

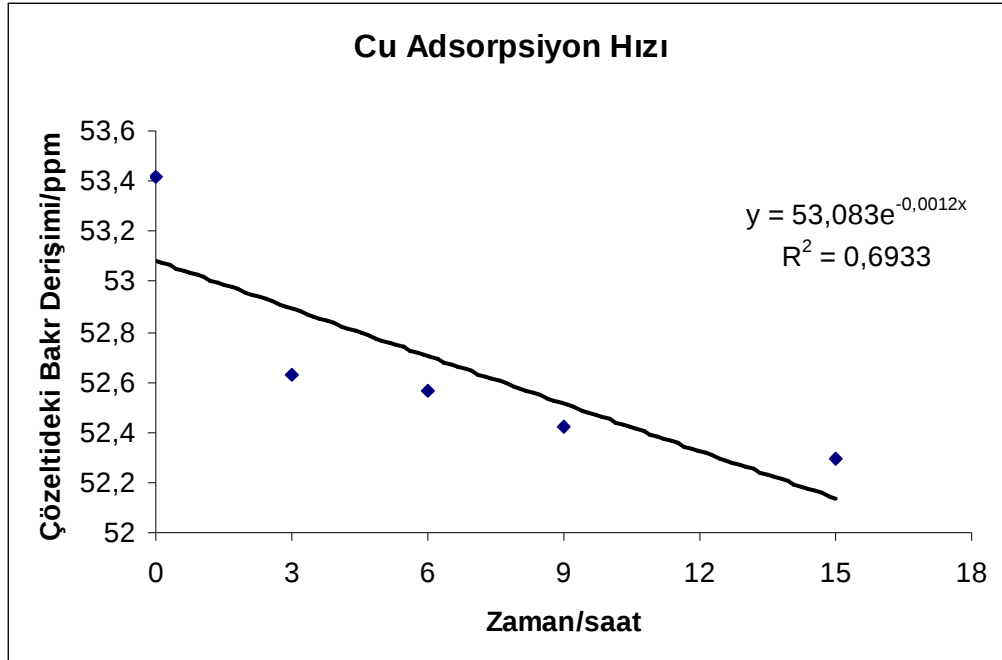
Referans olarak kullanılan *E.coli* ATCC 11230 suşunun seçilen ağır metaller için maksimum tolere edebildiği konsantrasyonlar (MTC) (Çizelge 4.3):
K₂Cr₂O₇ için 0,4 mM , CdCl₂ için 0,4 mM , ZnCl₂ için 1 mM , NiCl₂ için 1 mM ,
CoCl₂ için 0,4 mM , CuCl₂ için 2 mM olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4: *E.coli* ATCC 11230 suşunun ağır metal MTC değerleri (mM)

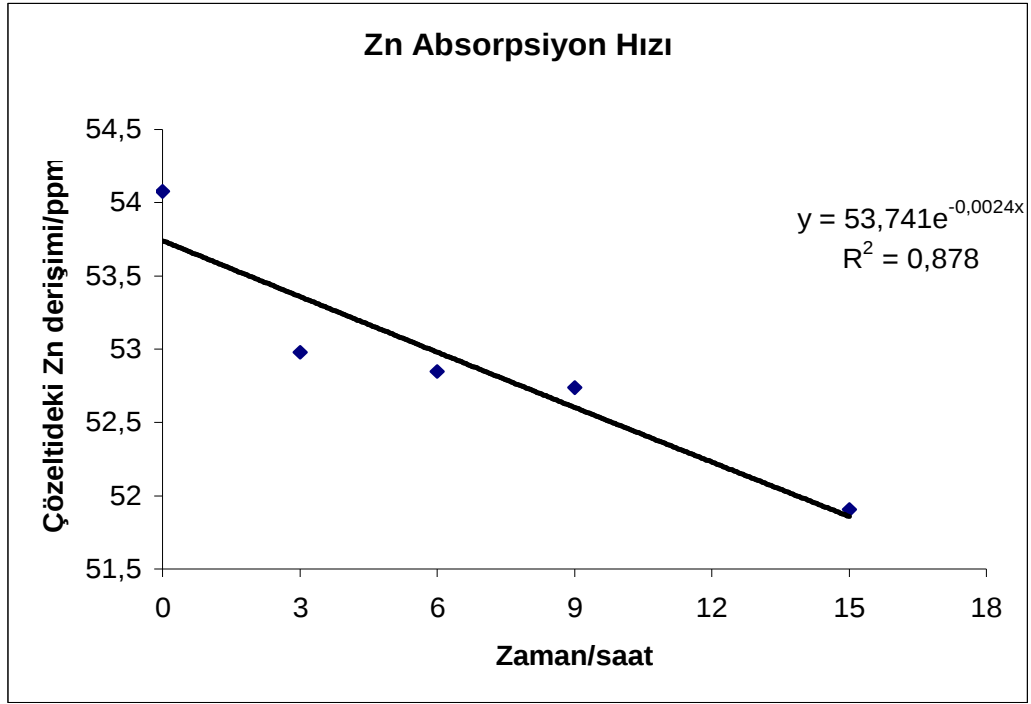
	Cr	Cd	Zn	Ni	Co	Cu
<i>E.coli</i>	0,4	0,4	1,0	1,0	0,4	2,0

4.1.6. Seçilen örnek suşların biyosorpsiyonuna ait bulgular

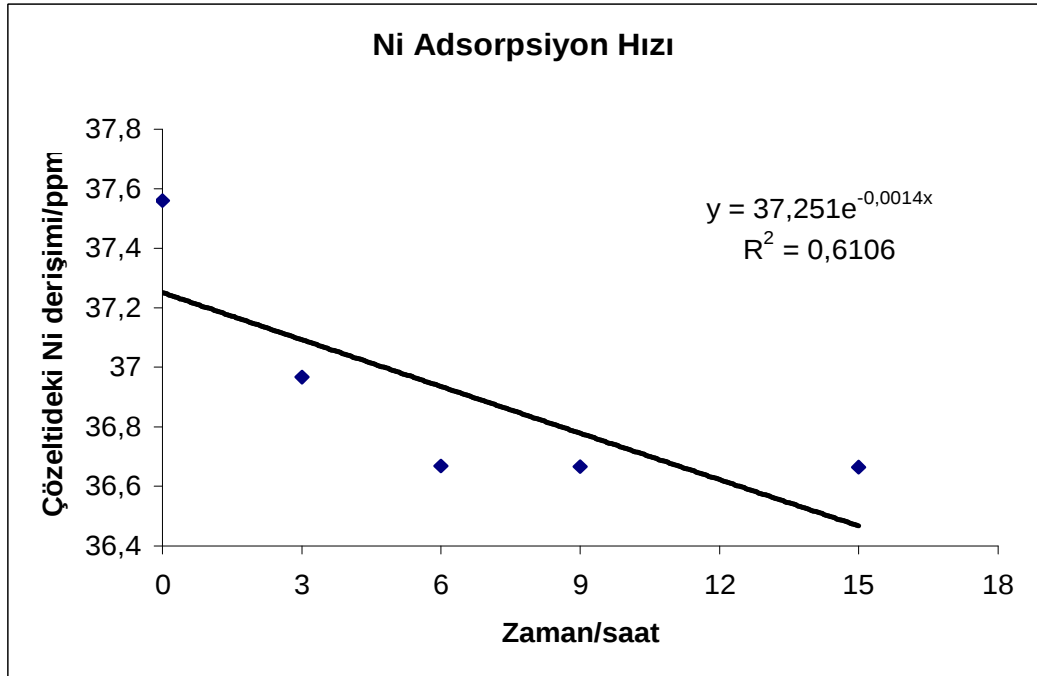
4.1.6.1. Seçilen Suşların biyosorpsiyon sonuçları



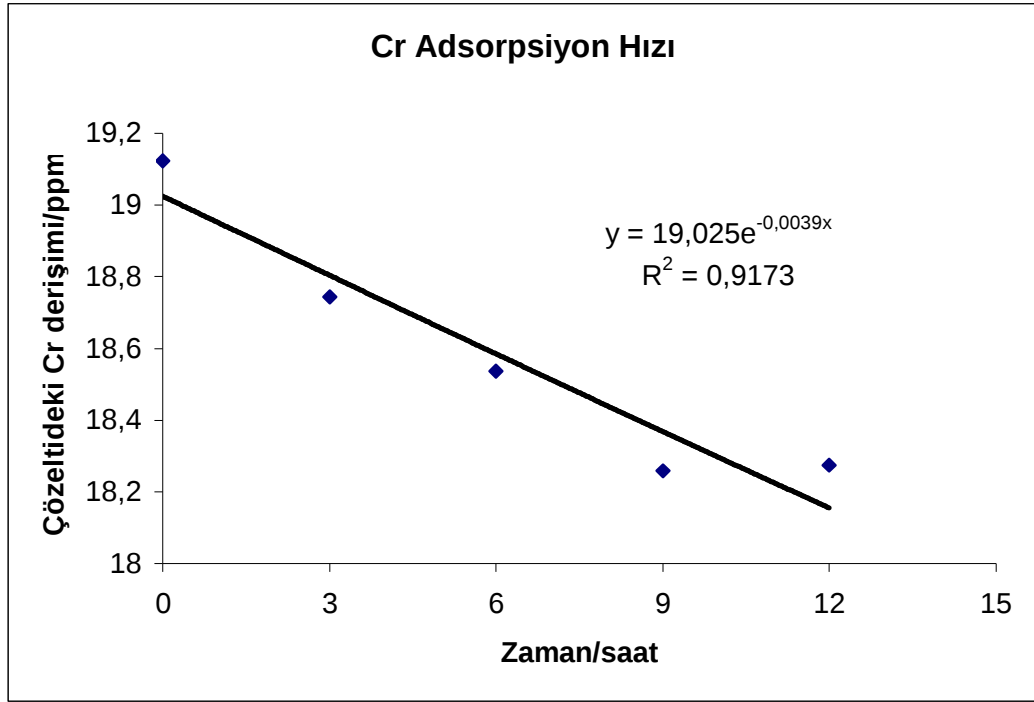
Şekil 4.27: *Pseudomonas* sp. B2P99 nolu suşunun Cu elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi (B2P99 suşunun Cu için MTC değeri 5 mM)



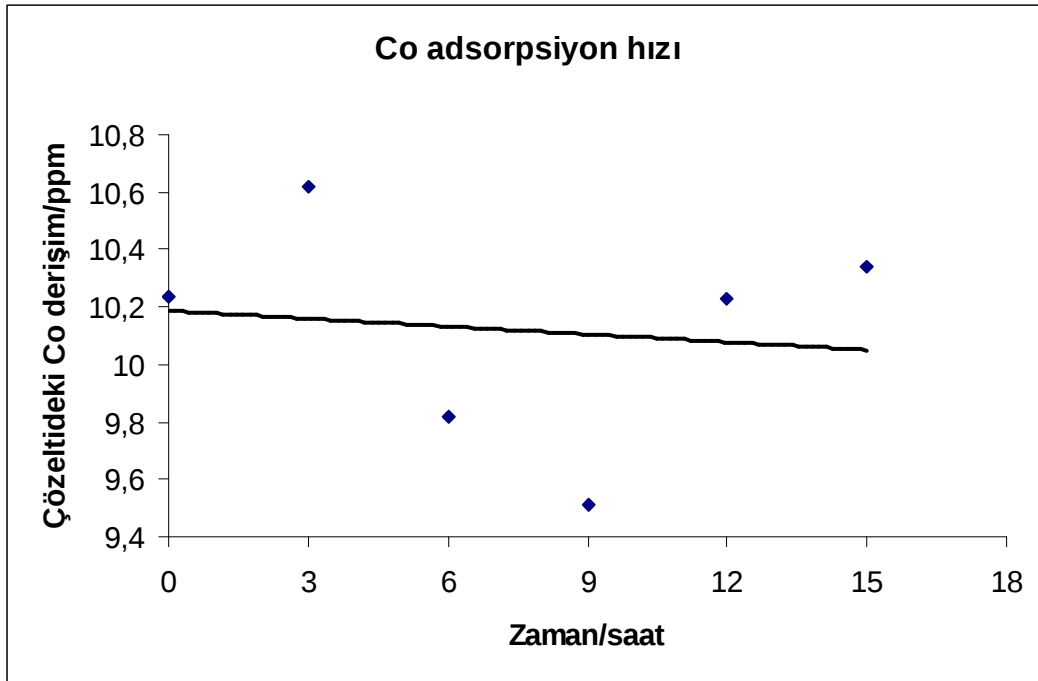
Şekil 4.28: *Pseudomonas* sp. B2P77 nolu suşunun Zn elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi (B2P77 suşunun Zn için MTC değeri 5 mM)



Şekil 4.29: *Pseudomonas* sp. A1P25 nolu suşunun Ni elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi (A1P25 suşunun Ni için MTC değeri 3 mM)



Şekil 4.30: *Bacillus* sp. B1B7 nolu suşunun Cr elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi (B1B7 suşunun Cr için MTC değeri 2 mM)



Şekil 4.31: *Pseudomonas* sp. B3P36 nolu suşunun Co elementini biyosorpsiyonu sırasında adsorpsiyon hızının zamana bağlı değişimi (B3P36 suşunun MTC değeri 0.8 mM)

Bakır için adsorpsiyon hızı; $Hız = dC/dt = -a.b e^{b.t}$ olarak diferansiyeli alındı ve $t=0$ anında maksimum hız bulundu. Bulunan değer 0,05g bakterinin Cu absorplama hızını ppm/saat cinsinden vermektedir.

$$a = 53,083$$

$$b = -0,0012$$

$$\text{Bakır Adsorpsiyon Hızı} = -a.b e^{b.t} = -53,083 \times (-0,0012) \times 1$$

$$0,05 \text{ g için Adsorpsiyon Hızı} = 0,0637 \text{ ppm/saat}$$

Bulunan bu değeri 1 g için hesaplamak gerekmektedir, dolayısıyla bulunan değer 20 ile çarpıldığında hız, 1g için ppm/saat olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak 1 g bakır için adsorbsiyon hızı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

$$0,0637 \times 20 = 1,274 \text{ ppm/saat dır}$$

Diğer elementlerin adsorpsiyon hızları aşağıda tablo halinde Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Element	Cu	Zn	Cr	Ni	Co
Ads. hızı	1,274	2,578	1,484	0,902	belirlenemedi

Çizelge 4.5 Ağır metallerin adsorpsiyon hızları (ppm/saat)

Çizelge 4.3'e bakıldığında biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılan metallerin adsorpsiyon hızlarının en yüksekte en düşüğe doğru sıralanışı; Zn, Cr, Cu, Ni ve Co şeklinde olduğu belirlenmiştir.

4.2 TARTIŞMA

Ağır metaller; çeşitli insan aktivitelerinin bir sonucu olarak çevre ortamlarına yayılmaktadır. Bu yayılmalar sonucunda bulundukları ortamlarda yaşayan bir çok organizmanın yaşam döngüsüne yararlı veya zararlı bir etkide bulunmaktadırlar. Kontamine olmuş bir toprakta metal dirençliliği bulunan popülasyonun gelişimi; (i) dikey gen transferi (reproduction), (ii) yatay gen transferi (transpozonlar ve belli dizili plazmidler dahil), ve (iii) kendiliğinden oluşan mutantlar üzerindeki seçici baskılardan meydana gelebilir [125]. Oluşan etkilerden birisi de bu metallere karşı dirençlilik özelliklerinin oluşmasıdır. Birçok bakteriyel türde; Hg^{+2} , Ag^{+} , AsO_2^{-} , AsO_4^{-3} , Bi^{+3} , BO_3^{-3} , Cd^{+2} , Co^{+2} , CrO_4^{-2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+3} , Sb^{+2} , TeO_3^{-2} , Tl^{+} , Zn^{+2} ve diğer ağır metallere karşı dirençlilik özelliği tespit edilmiştir. Bakteriyel dirençlilik mekanizmaları, genellikle, belirli ilaçlara ve kimyasallara oldukça spesifik kompleks özelliklerdir [10]. Bu dirençlilik özelliklerinin hepsi genetik etkenlerle kontrol edilmektedir. Bu dirençlilik etkenleri, bu özelliklerin moleküler genetik tekniklerle analizlerini kolaylaştıran plazmidler ve transpozonlar üzerinde sıklıkla bulunmaktadır.

Özellikle maden ocaklarının bulunduğu çevrelerden izole edilen mikroorganizmalar arasında, ağır metal dirençliliği yaygın olarak bulunan bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. *Acidiphilum* ve *Acidocella* cinsi bakteriler Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} gibi metallerin 1 M konsantrasyonlarına plazmidler aracılığıyla direnç gösterebilmektedirler [126, 127]. Flamentöz funguslar ve mayalar, ağır metallerin ve metallerin yüksek konsantrasyonlardaki seviyelerine direnç göstermekle birlikte, bu dirençlilikler bu elementleri akümüle edebilme yeteneği ile birleşmiş olabilmektedir [128, 129, 130, 131]. Yapılan bir çalışmada 20 mM $ZnCl_2$ 'ye ve 1 mM $NiCl_2$ 'ye dirençli bakteriler; 20 mM $ZnCl_2$ 'ye, 10 mM $NiCl_2$ 'ye, 1 mM $CdCl_2$ 'ye dirençli mayalar ve farklı ağır metallere karşı flamentöz funguslarda da dirençlilik tespit edilmiştir [132].

Ağır metallere direnç geliştiren bakteri cinslerinden biri de *Pseudomonas* cinsini oluşturan türlerdir. Cervantes ve arkadaşları [133] ; çevresel ve klinik

kökenli bakterilerde toksik ağır metallere dirençlilik bulunduğunu ve direncin genetik etkeninin sıklıkla plazmidler veya transpozonlar üzerinde lokalize olduğunu rapor etmişlerdir. Ağır metallere dirençli mikroorganizmaların esasen metal karışımı toprakta doğal olarak bulunduğu düşünülmektedir.

Roane ve Kellog [134] yaptıkları çalışmada ağır metal kontaminasyonu bulunan topraktan izole edilmiş dirençli *Pseudomonas* suşu (kadmiyum için MTC değeri;1,2 mM) tespit etmişlerdir. Ayrıca nikel'e dirençli bakteriler de rapor edilmiştir, bir galvanizasyon tankından izole edilen *Alcaligenes xylosoxidans* 31A; bakır (1 mM), kadmiyum (1 mM), çinko (10 mM), kobalt (20 mM), nikel (40 mM)'in yüksek konsantrasyonlarını tolere edebilmektedir [135].

Ünaldı ve arkadaşları tarafından [136] yapılan bir çalışmada bir *Pseudomonas* suşu'nun Kadmiyum MTC'si 5 mM olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bütün izolatlar krom'a (MTC'leri 1-1,7 mM arasında) çok düşük dirençlilik göstermiştir. Suşların %32'si 6mM bakır'a, %14'ü 9mM Nikel'e, %28'i 9 mM Kadmiyum'a ve %42'si 1,7mM Krom'a tolerans göstermiştir. Toprak örneklerinden izole edilen bir suş; Bakır (21mM), Nikel (18mM), Krom (1,7mM) ve Kadmiyum (10mM)'un yüksek konsantrasyonlarını nispeten tolere edebilmiştir. Başka bir suş ise; Bakır (7mM). Nikel (7mM), Krom (1,5mM) ve Kadmiyum (7mM) tolere edebilmiştir. Aynı çalışmada büyüklükleri 20.8 , 19.6 , 8 ve 4.7 kb'lık 4 adet süperkoil plazmid tespit edilmiştir.

Richards ve arkadaşlarının [137] yaptığı bir çalışmada, *Frankia* suşlarının (ACN1^{AG} [138], CcI3 [139], Cc1.17 [140], CN3 [141], CpI1, suksinat varyantı (CpI1-S) [142, 143], DC12 [144], EI5c [145], EAN1pec [146], EuI1c [147], EUN1f [148], ve QA3 [149]) kullanıldığı çalışmada; suşların hepsi Ag²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ ve AsO₃¹⁻'ye duyarlı olarak tespit edilmiştir. Kontrol bakterileri (*Escherichia coli* W3110, *Bacillus subtilis* 168, *Micromonospora echinospora* ATCC 15836, ve *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1511) ile karşılaştırmada, *Frankia* suşlarının çok azı Co için yüksek MIC değerlerine (0,4 mM) ve dikkate değer kobalt dirençliliğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Frankia*

suşlarının çoğunun AsO_4^{3-} , Pb^{2+} , SeO_4^{2-} ve CrO_4^{2+} 'ya dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Gilotra ve Srivastava [150] yaptıkları bir çalışmada, bahçe toprağından izole ettikleri *Pseudomonas pickettii* US321 suşunun, ampisilin, eritromisin gibi antibiyotiklerle, kadmiyumun 2 mM'ına, çinkonun 25 mM'ına ve bakırın 2 mM'ına direnç göstermiş olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada US321 suşu pUS321 adlı yüksek moleküler ağırlıklı bir plazmid bulundurduğu rapor edilmiştir. Plazmid giderme işlemleri sonucunda, US321 suşunun plazmidleri giderilmiş bir türevi olan PC25 suşunda, (0,1 mM) Cu, Zn ve Cd'ye duyarlı fenotiplerin ortaya çıktığını rapor etmişlerdir. Bir plazmid kodlu Cu dirençliliği mekanizması Zn ve Cd dirençliliklerini de üzerinde bulunduran pUS321 plazmidi ile sağlandığını rapor etmişlerdir.

Haefeli ve arkadaşları [151] yaptıkları bir çalışmada bir gümüş madeninden *Pseudomonas stutzeri*'nin gümüşe dirençli bir suşunu izole etmişlerdir. Bu izole edilen suşta gümüşe karşı dirençlilik bulunduran, en büyüğü $49,4 \times 10^6$ (pKK1) moleküler ağırlıklı üç adet plazmid tespit edilmiştir. pKK1 plazmidi görünüşte nonkonjugatif bir plazmid'tir, fakat plazmid R68.45 ile mobilizasyon aracılığıyla *Pseudomonas putida*'ya transfer olabildiği rapor edilmiştir[151].

Kömür ve maden işletmeciliği, metal kaplama ve metal tel üretimi gibi çeşitli endüstri kuruluşlarının faaliyeti sonucu doğada toksik metal miktarı artmaktadır. Civa, kadmiyum, krom, bakır, nikel gibi metallerin canlılar üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu tür endüstriyel atıkları kimyasal çöktürme, oksidasyon-redüksiyon ve filtrasyon gibi çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür. Fakat bu yöntemler oldukça pahalı ve etkili olmayan yöntemler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle fizikokimyasal yöntemlere alternatif olarak ağır metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla biyosorpsiyon (biyolojik bağlama) ve biyoakümülyasyon (biyolojik birikme) gibi biyolojik metodlar geliştirilmiştir. Bu amaçla, ağır metallerin mikroorganizmalar tarafından absorplanmasına yönelik çalışmalar yoğunlaştırılmıştır [152].

Mullen ve arkadaşları [153] yaptıkları bir çalışmada dört bakteri türünün, *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , ve La^{3+} çözeltilerinden bu metalleri bertaraf etme yeteneklerini incelemişlerdir. 0.001 mM'dan 1 mM'a kadar konsantrasyon aralığında kadmiyum ve bakır sorpsiyonu Freundlich izotermi aracılığı ile tanımlanmıştır. *P. aeruginosa* ve *B. cereus*'ta 1 mM konsantrasyonda en çok metal atılmasının Cu^{2+} ve Cd^{2+} 'da olduğunu ve bu bakterilerde öteki metallerin atılmasının daha az etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada Freundlich K sabitleri *E.coli* de en etkin olanının Cd^{2+} ' un çıkartılması olduğu ve *B.subtilis*' te en çok Cu^{2+} biyosorplandığı bildirilmiştir. Solüsyonda bulunan Ag^+ 'nın bakteriler tarafından biyosorpsiyonunun oldukça hızlı olduğu bildirilmiştir; 1 mM solüsyondan total Ag^+ 'nin ortalama %89 u sorbe edilirken; Cd^{2+} , Cu^{2+} ve La^{3+} nın 1 mM çözeltilerinden sırasıyla sadece 12, 29, 27'si sorbe edilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, La^{3+} 'ın iğne şeklinde kristalize çökeltiler olarak hücre yüzeyinde biriktiği gözlenmiştir. Ag^+ 'nın bazen hücre yüzeyinde kolloidal toplanmalar şeklinde ve bazende sitoplazmada çökeltiler şeklinde toplandığı gözlenmiştir. Sorpsiyonun lokasyonunu belirlemesinde ne Cd^{2+} ne de Cu^{2+} yeterli elektron saçılımı sağlamadığı rapor edilmiştir. Bu metallerin bakteriyel taşınımı ile ilgili serilerin $Ag^+ > La^{3+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$ şeklinde azalmakta olduğu bildirilmiştir.

Sağ ve Kutsal [154], *Zooglae ramigera* ile yaptıkları bir çalışmada krom iyonlarının ortamdan uzaklaştırılmasında pH ve sıcaklık etkilerini incelemiş, sonuçların Langmuir ve Freundlich izotermine uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Nourbakhsh ve arkadaşları [155] yaptıkları bir çalışmada, kesikli sistemde farklı konsantrasyonlardaki Cr^{6+} , Pb^{2+} ve Cu^{2+} 'nın metal iyonlarının birlikte bulundukları biyosorpsiyon prosesini uygulamışlardır. Çalışılan ortam koşulları 27°C, pH :2-7 aralığıdır. Ayrıca aynı ortam koşulları sağlanarak bu metallerin tek başlarına bulundukları biyosorpsiyon sistemi uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda kurşun(II) iyonun biyosorpsiyonunun tek başına çalışılmış sisteme göre

biyosorpsiyon kapasitesinin arttığı, aksine krom(VI) iyonu ve bakır(II) iyonlarında biyosorpsiyon kapasitelerinin azaldığını rapor etmişlerdir. En uygun pH değerleri kurşun(II) iyonu için 4.5 ve krom(VI) iyonu için 2.0 ve bakır(II) iyonu için 4.0 olarak tespit etmişlerdir. Metallerin birlikte bulundukları durumda iken kurşun(II) iyonu biyosorpsiyon kapasitesi 2.5 kat artmış, fakat krom(VI) iyonu ve bakır(II) iyonlarının biyosorpsiyon kapasitelerinin 2.5 kat azalmış olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, Mersin ilinin önemli sanayi kuruluşlarının bulunduğu bir bölgesinde belirlenmiş çeşitli lokalizasyonlardan toprak örnekleri alınmıştır (Şekil 3.1). Çalışmamız için seçilen ağır metaller, özellikle metal sanayinde çok kullanılan ağır metallerden olan Cu, Ni, Cd, Zn, Co ve Cr dur. Alınan toprak örneklerindeki ağır metal düzeylerinin belirlenmesi için ICP (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) cihazı kullanılmıştır. ICP analiz sonuçları alınan toprak örneklerinde Cd hariç diğer ağır metallerin kontrol toprak örneğine oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir(Çizelge 4.1). Bu değerler Çevre ve Orman Bakanlığının düzenlemiş olduğu Toprak Kirliliğinin Kontrolü Yönetmeliği'nin belirlediği sınır değerlere (Çizelge 1.2) göre ise A1, B1 bölgelerinde Cr ve Ni kirliliği; B2 ve B3 bölgelerinde Co, Cr ve Ni kirliliği göze çarpmaktadır. Bu bölgelerden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. örneklerini bu ağır metaller için göstermiş olduğu MTC değerleri tespit edilmiştir.

İzole edilen suşların en yüksek MTC değerlerinin dağılımı şu şekildedir: *Pseudomonas* sp. suşlarında; $K_2Cr_2O_7$ için 2 mM olarak B2 ve B3 bölgelerinde, $CoCl_2$ için 1 mM olarak A1 bölgesinde, $CuCl_2$ için 5 mM olarak B2 bölgesinde, $NiCl_2$ için 4 mM olarak A1 bölgesinde, $CdCl_2$ için 1 mM olarak A1 bölgesinde ve $ZnCl_2$ için 5 mM olarak B2 bölgesinde olarak tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. suşlarında ise; $K_2Cr_2O_7$ için 2 mM olarak B1 ve B2 bölgelerinde, $CoCl_2$ için 0.8 mM olarak B2 bölgesinde, $CuCl_2$ için için bölgelerin hepsinde, $NiCl_2$ için 2 mM olarak A1 bölgesinde, $CdCl_2$ için için 0.3 mM olarak B1 ve B2 bölgelerinde ve $ZnCl_2$ için 2 mM olarak B1, B2, B3 bölgelerinde tespit edilmiştir.

Tüm lokalizasyonlardan alınan toprak örneklerinden toplam 225 adet *Pseudomonas sp.* ve 101 adet de *Bacillus sp.* izole edilmiştir. Bakteriler eğik katı agar'larda buzdolabında + 4 °C saklanmıştır. İzole edilen bakterilerin seçilen ağır metallerle karşı tolere edebildikleri maksimum metal konsantrasyonlarını (MTC) belirlemek için, bakteri hücreleri CuCl₂, CoCl₂, NiCl₂, CdCl₂, ZnCl₂ ve K₂Cr₂O₇'nin değişik konsantrasyonlarını içeren Nutrient Agar'lara çizgi şeklinde ekilmiş ve 30 °C' de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bakteri hücrelerinin gelişmelerine izin veren en yüksek metal konsantrasyonu, seçilen metalin o bakteri için MTC değeri olarak belirlenmiştir.

A1 bölgesinde kontrol toprağının yaklaşık olarak 7 katı oranda Cr bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu bölgeden izole edilen bakterilerin K₂Cr₂O₇'ye karşı göstermiş oldukları MTC değerleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas sp.* suşunun, K₂Cr₂O₇'e karşı gösterdiği MTC değerinin, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden küçük olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas sp.* suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Ancak bu bölgeden izole edilen *Bacillus sp.* suşlarında farklı bir durum söz konusudur. İzole edilen toplam 40 adet *Bacillus sp.* suşundan 20 adetinin K₂Cr₂O₇ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonun üzerindedir. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus sp.* suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin var olduğunu göstermektedir.

A1 bölgesinde kontrol toprağındaki Cd²⁺ oranından (Çizelge 4.1) daha az Cd²⁺ oranı içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CdCl₂'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas sp.* ve 40 adet *Bacillus sp.* suşlarının CdCl₂'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden küçük olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas sp.* ve *Bacillus sp.* suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmediğini göstermektedir.

A1 bölgesinde kontrol toprağındaki Zn^{2+} oranından (Çizelge 4.1) bir kat daha fazla Zn^{2+} oranı içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $ZnCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.3'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas* sp. ve 40 adet *Bacillus* sp. suşlarının $ZnCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 1.0 mM değerinden küçük olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğın gelişmediğini göstermektedir.

A1 bölgesinde kontrol toprağındaki Ni^{2+} oranından (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak iki katı oranda Ni^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $NiCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 32 adetinin $NiCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 1.0 mM değeri ile aynıdır. 13 suşta ise bunun üzerinde bir değeri kaydedilmiştir. Bu durum, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için belirli bir dirençliliğın gelişmiş olduğunu göstermektedir. Ancak bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarında farklı bir durum söz konusudur. İzole edilen toplam 40 adet *Bacillus* sp. suşundan 37 adetinin $NiCl_2$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değerin altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğın bulunmadığını göstermektedir.

A1 bölgesinde kontrol toprağındaki Co^{2+} oranının (Çizelge 4.1) yaklaşık iki katı oranda Co^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $CoCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.5'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 48 adetinin $CoCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşdeğer veya bu değerin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir

dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. Bu bölgeden izole edilen toplam 40 adet *Bacillus* sp. suşunun CoCl_2 için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değer altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

A1 bölgesinde kontrol toprağındaki Cu^{2+} oranından (Çizelge 4.1) iki kat daha fazla oranda Cu^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CuCl_2 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.6'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 49 adet *Pseudomonas* sp. ve 40 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CuCl_2 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 2.0 mM değerinin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Cr^{6+} oranının (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 4.5 katı oranda daha fazla Cr^{6+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşunun 44 adetinin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden yüksek olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. İzole edilen toplam 42 adet *Bacillus* sp. suşundan 38 adetinin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonun üzerindedir. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin var olduğunu göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Zn^{2+} oranının (Çizelge 4.1) 2.5 katı oranda Zn^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin ZnCl_2 'e

karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp.suşunun 35 adetinin $ZnCl_2$ ’e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230’ın göstermiş olduğu 1.0 mM değerinden düşük olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. İzole edilen toplam 42 adet *Bacillus* sp. suşundan 37 adetinin $ZnCl_2$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230’ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyondan düşüktür. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Ni^{2+} oranından (Çizelge 4.1) 4.5 kat daha fazla oranda Ni^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $NiCl_2$ ’e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.9’de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 38 adetinin $NiCl_2$ ’e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 1.0 mM değerine eşdeğer veya bu değerin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde söz konusudur. İzole edilen toplam 42 adet *Bacillus* sp. suşunun hepsinin $NiCl_2$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230’ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değerin altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Co^{2+} oranından (Çizelge 4.1) 2.5 kat daha fazla oranda Co^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $CoCl_2$ ’e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.10’da verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 42 adetinin $CoCl_2$ ’e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşdeğer veya bu değerin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu

metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. Bu bölgeden izole edilen toplam 42 adet *Bacillus* sp. suşundan 39 adetinin CoCl_2 için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değerin altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Cu^{2+} oranından (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 2.5 kat daha fazla oranda Cu^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CuCl_2 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.11'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. ve 42 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CuCl_2 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 2.0 mM değerinin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir.

B1 bölgesinde kontrol toprağındaki Cd^{2+} oranından (Çizelge 4.1) daha az Cd^{2+} oranı içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CdCl_2 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.12'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 47 adetinin ve 42 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CdCl_2 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden küçük olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmediğini göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Cr^{6+} oranının (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 2.5 katı oranda daha fazla Cr^{6+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.13'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşunun 117 adetinin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden yüksek olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmiş

olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. İzole edilen toplam 41 adet *Bacillus* sp. suşundan 38 adetinin $K_2Cr_2O_7$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonun üzerindedir. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında da söz konusu metal için bir dirençliliğin var olduğunu göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Cd^{2+} oranından (Çizelge 4.1) daha az Cd^{2+} oranı içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $CdCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.14'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının ve 41 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin $CdCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşit veya bu değerden düşük olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmediğini göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Zn^{2+} oranının (Çizelge 4.1) 2.5 katı oranda Zn^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $ZnCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.15'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşunun 53 adetinin $ZnCl_2$ 'e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM değerinden yüksek olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmekte olduğunu göstermektedir. Ancak bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarında durum farklılık göstermektedir. İzole edilen toplam 41 adet *Bacillus* sp. suşundan 38 adetinin $ZnCl_2$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyondan düşüktür. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Ni^{2+} oranından (Çizelge 4.1) 4.8 kat daha fazla oranda Ni^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $NiCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.16'de

verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 104 adetinin NiCl₂'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 1.0 mM değerine eşdeğer veya bu değer altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde söz konusudur. İzole edilen toplam 41 adet *Bacillus* sp. suşunun hepsinin NiCl₂ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değer altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Co²⁺ oranından (Çizelge 4.1) 2.5 kat daha fazla oranda Co²⁺ içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CoCl₂'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 114 adetinin CoCl₂'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşdeğer veya bu değer altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. Bu bölgeden izole edilen toplam 41 adet *Bacillus* sp. suşundan 36 adetinin CoCl₂ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değer altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B2 bölgesinde kontrol toprağındaki Cu²⁺ oranından (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 3 kat daha fazla oranda Cu²⁺ içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CuCl₂'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 123 adet *Pseudomonas* sp. suşunun 91 adetinin CuCl₂'e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM değerinden düşüktür. Ancak 32 adet *Pseudomonas* sp. suşunda 5mM CuCl₂'yi tolere edebilmektedir. Bu durum B2 bölgesinden izole

edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmekte olduğunu göstermektedir. Ancak bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarında durum farklılık göstermektedir. İzole edilen toplam 41 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CuCl_2 için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyona eşit veya düşüktür. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Cr^{6+} oranının (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 2.3 katı oranda daha fazla Cr^{6+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp.suşunun 25 adetinin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 'e karşı gösterdiği MTC değeri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM değerinden yüksek olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerlidir. İzole edilen toplam 38 adet *Bacillus* sp. suşundan 37 adetinin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonun üzerindedir. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında da söz konusu metal için bir dirençliliğin var olduğunu göstermektedir.

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Cd^{2+} oranından (Çizelge 4.1) daha az Cd^{2+} oranı içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CdCl_2 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 44 adetinin ve 38 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CdCl_2 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerleri kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşit veya bu değerden düşük olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmediğini göstermektedir.

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Zn^{2+} oranının (Çizelge 4.1) 1.8 katı oranda Zn^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $ZnCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp.suşunun 41 adetinin ve 38 adet *Bacillus* sp. suşundan 37 adetinin $ZnCl_2$ 'e karşı gösterdiği MTC değerleri, test bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM'a eşit veya bu değerden düşük olması, bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Ni^{2+} oranından (Çizelge 4.1) 6 kat daha fazla oranda Ni^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $NiCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.22'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının hepsinin $NiCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 1.0 mM değerine eşdeğer veya bu değer altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir. Aynı durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde söz konusudur. İzole edilen toplam 38 adet *Bacillus* sp. suşunun hepsinin $NiCl_2$ için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 1.0 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değer altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Co^{2+} oranından (Çizelge 4.1) 2.75 kat daha fazla oranda Co^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin $CoCl_2$ 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.23'te verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. suşlarının 36 adetinin $CoCl_2$ 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 0.4 mM değerine eşdeğer veya bu değer altında olması ve 0.4 mM'ın üzerinde değerlere sahip 14 adet *Pseudomonas* sp suşunun bulunması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmekte olduğunu göstermektedir. Ancak aynı

durum bu bölgeden izole edilen *Bacillus* sp. suşları içinde geçerli değildir. Bu bölgeden izole edilen toplam 38 adet *Bacillus* sp. suşundan 37 adetinin CoCl_2 için gösterdiği MTC değeri kontrol bakterisi *E.coli* ATCC 11230'ın göstermiş olduğu 0.4 mM konsantrasyonuna eşit veya bu değerin altındadır. Bu sonuç bu bölgedeki *Bacillus* sp. suşlarında söz konusu metal için bir dirençliliğin bulunmadığını göstermektedir.

B3 bölgesinde kontrol toprağındaki Cu^{2+} oranından (Çizelge 4.1) yaklaşık olarak 2.7 kat daha fazla oranda Cu^{2+} içerdiği tespit edilmiştir. Bu bölgeden izole edilen bakterilerin CuCl_2 'e karşı göstermiş olduğu MTC değerleri Şekil 4.24'de verilmiştir. Buna göre izole edilen 50 adet *Pseudomonas* sp. ve 38 adet *Bacillus* sp. suşlarının hepsinin CuCl_2 'e karşı göstermiş oldukları MTC değerlerinin, kontrol bakterisi olan *E.coli* ATCC 11230 suşunun göstermiş olduğu 2.0 mM değerinin altında olması bu bölgeden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. suşlarında, söz konusu metal için bir dirençliliğin gelişmemiş olduğunu göstermektedir.

En yüksek MTC değerine sahip olanlar arasından seçilen 36 adet bakteride plazmid DNA varlığını araştırmak için bu suşlardan plazmid DNA izolasyonu yapılmış, bu suşlardan sadece 8 adedinde büyüklükleri 2.1 ve 1.8 kb olan 2 adet, bir suшта 28 kb, 2.1 kb ve 1.8 kb büyüklüğünde 3 adet plazmid tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Plazmid içeren bu suşlar Ni, Zn, Cu ve Cr ağır metallerine karşı belirli bir dirence sahiptir (Çizelge 4.3). Ancak diğer metallere dirençli suşlarda bu ve buna benzer büyüklüklerde plazmidlere rastlanmamış olması (Şekil 4.26), metal dirençlilik informasyonunun plazmid kodlu olmadığı izlenimi vermektedir. Söz konusu dirençliliğin kromozomal kökenli olduğu söylenebilir. Bu sonuç, metal kontaminasyonuna uzun yıllar maruz kalmış bölgenin bakteri popülasyonu için beklenen bir sonuçtur. Çünkü plazmid kodlu dirençlilik bu tip adaptasyonlarda ilk tercih edilen genetik bilgiyi transfer etme biçimidir. Uzun süreli maruziyetler söz konusu genetik informasyonların daha kalıcı olduğu kromozoma taşınması için yeter zamanı sağlamaktadır.

Alınan toprak örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp.'lerden yüksek MTC değerlerine sahip olan suşların 5 adedi biyosorpsiyon deneyleri için seçilerek biyosorpsiyon hızları tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Seçilen suşların biyosorpsiyon deneyleri sonucunda Ni, Cu, Zn ve Cr metallerinin biyosorpsiyon hızlarının zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Co metalinin hücre içi ve dışı derişimlerinin düzensiz olarak artış ve azalış göstermesinden dolayı Co elementinin adsorpsiyon hızı hesaplanamamıştır. Bu durum adsorpsiyon ve desorpsiyon olaylarının aynı anda gerçekleştiği izlenimi vermiştir. Çizelge 4.3'e bakıldığında biyosorpsiyon çalışmalarında kullanılan metallerin adsorpsiyon hızlarının en yüksekten en düşüğe doğru $Zn^{2+} > Cr^{6+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$ şeklinde sıralanmakta olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çevredeki ağır metallerin toksik seviyelerinin varlığı bütün canlılar için olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Çeşitli mikroorganizmalar bu metallerin varlığında kromozom, plazmid veya transpozonda kodlanmış metal dirençlilik mekanizmaları aracılığı ile başarılı uyum mekanizmalarına sahiptirler. Günümüzde metal dirençliliği için beş biyokimyasal ve bir biyokimyasal olmayan mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar kullanılarak günümüzün önemli bir çevresel sorunu haline gelen ağır metal kirliliğine çözümler üretilmektedir.

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

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

KAYNAKLAR

- [1] Gündüz, T. “Çevre Sorunları”, 1. baskı, A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara, s 131-148 (1994).
- [2] Başkaya, H. S., Teksoy, A.,” Topraklarda ağır metaller ve ağır metal kirliliği”, I.Uludağ Çevre Mühendisliği Sempozyumu, Bursa, 763-771. (1997).
- [3] Kocaer, F. O., Başkaya, H.S., “Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler”, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, **8(1)** 121-131, (2003).
- [4] <http://www1.iso.org.tr/Documents/Cevre/MEVZUAT%20LISTESI/20%20TOPRAK%20KIRLILIGININ%20KONTROLU%20YON.doc>(15.06.2006).
- [5] Rether, A., “Entwicklung und Charakterisierung was serlöslicher Benzoylthioharnstofffunktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen”, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniveristesi, Almanya, (2002).
- [6] <http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-datent/daten/umweltkatastrophen.Htm>, (25.12.2006).
- [7] Güley, M., Vural, N., “Toxicology”, Ankara University Faculty of Pharmacy Publication, No: 48, s.s.,500(In Turkish), (1987).
- [8] Connell, D.W, Miller, G.J., “Chemistry and Ecotoxicology of Pollution.” John Wiley-sons., New York p444-445, (1984).
- [9] Öner, M., “Mikrobiyal Ekoloji”, Ege üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:100; s.s. 282, İzmir, (2002).
- [10] Wiener, P., Müller-Graf, C., and Barcus, V., “Bacterial Evolution in Modern Times:Trends and Implications for Research”, Reviews in Undergraduate Research, Vol. **2**:1-6, (2003).
- [11] Gürbüz, M., G., “Bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının Entremorpha prolifera’ya biyosopsiyonunda denge, kinetik ve termodinamik parametrelerin belirlenmesi”, Yüksek lisans tezi, Mersin üniversitesi, (2006).
- [12] Wackett, L. P., Dodge, A. G., Ellis L. B. M.,” Microbial Genomics and the Periodic Table”, Applied and environmental microbiology, p. 647–655, (2004)

- [13] Gutnick, D., "Bacterial interaction with heavy metals in the environment", Res, Microbiol., **148**:513-551, (1997)
- [14] Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., Chemie und Gesundheit, "Eine verstndliche Einfhrung in die Toxikologie", VCHVerlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8 (1988).
- [15] John, H., Howard, G., Worth, J., "Fundamental toxicology for chemists", Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry Information Services, (1996).
- [16] Mertz, W., "Trace Elements in Human And Animal Nutrition-15th Edition" Volume 1 Academic Pres., (1987).
- [17] "Trace Elements in Human Nutrition And Health", World Health Organization, Geneva, 450, (1996).
- [18] <http://www.inchem.org> (10.09.2006).
- [19] Hughes, M. N., Poole, R. K., "Metals and Micro-organism." Pp. 400 Chapman and Hall, London, (1989).
- [20] Ji, G., Silver, S., "Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern." , J. Ind. Microbiol. **14**: 61-168.(1995).
- [21] <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/minimize/cadmium.pdf> (2006).
- [22] <http://www.osha-slc.gov/SLTC/cadmium> (2005).
- [23] European Commission DG ENV. E3 Project ENV.E.3/ETU/2000/0058, "Heavy Metals in Waste" ,Danimarka ,February, (2002).
- [24] Ouzounidou, G., Eleftheriou, E.P., Karataglis, S., "Ecophysical and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum*", Canadian Journal of Botany. **70**: 947-957, (1992).
- [25] Poschenrieder, C.H., Gunse, B., Barcelo, J., "Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves", Plant Physiol., **190**: 1365-1371, (1989).
- [26] Lidon, F.C., Ramalho, J., Henriques, F.S. "Copper inhibition of rice photosynthesis", Plant Physiol., **142**: 12-17, (1993).
- [27] Nussbaum, S., Shemutz, D., Brunold, C., "Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium *Zea mays* L.", Plant Physiology, **88**: 1407, (1988).

- [28] Doncheva, S., Nicolov, B., Ogneva, V., *Physiol. Plantarum*, “Effect of copper excess on the morphology of the nucleus in maize root meristem cells” **96**: 118-122, (1996).
- [29] Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., *Physiol. Plantarum*, “Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation”, **85**: 85-89, (1992).
- [30] Munzuroğlu, Ö., Geçkil, H., “Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*”, *Environ. Cont. and Toxi.*, **43**: 203-213, (2002).
- [31] Kennedy, C.D., Gonsalves, “The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the transroot potential and efflux of excised roots”, *F.A.N., J. Exp. Bot.*, **38**: 800-817, (1987).
- [32] Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., ve Çobanoğlu, D., “Ağır metal iyonlarının (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+}) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi üzerine etkileri”, *F.Ü., Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **16(2)**: 177-182, (2004).
- [33] Zheljazkov, V.D., Nielsen, N.E., “Effect of Heavy Metals on Peppermint and Cornmint. Plant and Soil”, **178 (1)**: 59-66, (1996).
- [34] Singh, S.N., Yunus, M.K., Kulshreshtha, K., Srivastae, K., Ahmad, K.J., “Effect of SO_2 on Growth and Development of *Dahlia rosea* cav.” *Environ. Contam. Toxicol.*, **40**: 743-751, (1988).
- [35] Türkan, I., “The Effect of Exhaust Gas on Seed Germination and Seedling Growth of Cucumber (*Cucumber sativus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L. *Supsp. vulgare*)”, *J. Turk. Phytopath.*, **17 (2)**: 81-87, (1988).
- [36] Maas, M.F., Kok de Luid, J., Hoffman, I., Kuiper, P.J.C., “Plant Responses to H_2S and SO_2 Fumigation. Effects on Growth, Transpiration and Sulphur Content of Spinach”. *Physiol. Plantarum*, **70**: 713-721. (1987).
- [37] Sowidis, T., Reiss, H.D., “Effects of Heavy-Metals on Pollen-Tube Growth and Ultrastructure. Protoplasma”, **185 (3-4)**: 113-122, (1995).

- [38] Search, K.B., Mulcahy, D.L., "The Parallel Expression of Metal Tolerance in Pollen and Sporophytes of *Silene dioica* (L.) Clairv., *S. alba* (Mill.) Krause and *Mimulus guttatus* DC". *Theor. Appl. Genet.* **69**: 579-602, (1985).
- [39] Jackson, J.F., Linskens, H.F., "Metal Ion Induced Unscheduled DNA Synthesis in *Petunia* Polen". *Molec. Gen. Genet.* **187**: 112-115, (1982).
- [40] Ernst, W.H.O., Bast-Cramer, W.B., "The Effect of Lead Contamination of Soils and Air on its Accumulation in Polen", *Plant Soil* **57**: 491-496, (1980).
- [41] Chaney, W.R., Strickland, R.C., "Relative Toxicity of Heavy Metals to Red Pine Pollon Germination and Germ Tube Elongation", *J. Environ. Qual.* **13**: 391-394, (1984).
- [42] Murdy, W.H., "Effect of SO₂ on SO₂ on Sexual Reproduction in *Lepidium virginicum* L. Originating From Regions With Different SO₂ Concentrations", *Bot. Gaz.* **140**: 299-303, (1979).
- [43] Varshney, S.R.K., Varshney, C.K., "Effect of Sulphur Dioxide on Pollen Germination and Pollen Tube Growth", *Environ. Pollut.*, **24**: 87-92, (1981).
- [44] Linskens, H.F., van Meegen, Y., Pfahler, P.L., Wilcox, M., "Sulphur Dioxide Effects on *Petunia* Pollen Germination and Seed Set", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**: 691-695, (1985).
- [45] DuBay, D.T., Murdy, W.H., "The Impact of Sulphur Dioxide on Plant Sexual Reproduction: In Vivo and In Vitro Effects Compared", *J. Environ. Qual.* **12**: 147-149, (1983) .
- [46] Facteau, T.J., Wang, S.Y., Rowe, K.E., "The Effect of Hydrogen Fluoride on Pollen Germination an Pollen Tube Growth in *Prunus avium* L. cv.", "Royal Ann." *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **98**: 234-236, (1973).
- [47] Sulzbach, C.W., Pack, M.R., "Effects of Fluoride on Pollen Germination, Pollen Tube Growth and Fruit Development in Tomato and Cucumber", *Phytopathology* **62**: 1247-1253, (1972).
- [48] Krishnayya, N.S.R., Bedi, S.J. "Effect of Automobile Lead Pollution on *Cassia tora* L. and *Cassia occidentalis* L.", *Environ. Pollut. (Series A)* **40**: 221-226, (1986).

- [49] Cox, R.M., "Sensitivity of Forest Plant Reproduction to Long Range Transported Air Pollutants. In Vitro and In Vivo Sensitivity of *Oenothera parviflora* L. Pollen to Simulated Acid Rain", *New phytol.* **97**: 63-70, (1984).
- [50] Ruffin, J., William, D., Banerjee, U., Pinnix, K., "The Effects of Some Environmental Gaseous Pollutants on Pollen- Wall Proteins of Certain Pollen Grains", *A Preliminary Study. Grana* **22**: 171-175, (1983).
- [51] Oremland, R. S., Blum, J. S., Bind, A. B., Dowdle, P. R., Herbel, M., and Stolz, J. F.. "Simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspensions of selenium respiring bacteria", *Applied and Microbiology.* **65**:4385-4392, (1999).
- [52] Ahmann,, D., Roberts, A. L., Krumholz, L. R., and Morel, F. M. M. "Microbe grows by reducing arsenic", *Nature* **371**: 750.1, (1994).
- [53] Laverman, A. M., Switzer Blum, J., Philips, E. J. P., Lovley, D. R., and Oremland, R. S.: "Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors", *Applied and environmental Microbiology.* **61**:3556-3561, (1995).
- [54] Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., and Morel, F. M. M... "Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp.", nov. *Archives of Microbiology.* **168**:380-388, (1997).
- [55] Haubold, B., Rainey, PB., "Genetic and ecotypic structure of a fluorescent *Pseudomonas* population", *Mol Ecol* **5**:747–761., (1996).
- [56] Rouch, D. A., Lee, B. T. D., and Morby, A. P. "Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance", *J. Ind. Microbiol.* **14**: 132-141 (1995).
- [57] Harnett, N. M., and Gyles, C. L. "Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains", *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 930-945. (1984).
- [58] Ji, G., and Silver, S., "Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern", *J. Ind. Microbiol.* **14**: 61-168.(1995).

- [59] McEntee, J. D., Woodrow, J. R, and Quirk, A. V., “Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp.”, *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 515-520. (1986).
- [60] Misra, T. K., “Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurial”. *Plasmid* **27**: 4-16. (1992).
- [61] O’Halloran, T. “Transition metals in control of gene expression”, *Science* **261**: 715-725. (1993).
- [62] Ni’bhriain, N. N., Silver, S., Foster, T. J., “Tn5 insertion mutation in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R 100-1”, *J. Bacteriol.* **155**: 690-703. (1983).
- [63] Weiss, A., Murphy, S., and Silver, S., “Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.* **132**: 197-208. (1997).
- [64] Mergeay, M. “Towards an understanding of the genetics of bacterial resistance”, *Trends Biotechnol.* **9**:17-24. (1991).
- [65] Scott, J. A., Palmer, S. J., “Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide”, *Biotechnol. Lett.* **10**: 21-24. (1988).
- [66] Scott, J. A., Palmer, S. J., “Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption”, *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 221-225. (1990).
- [67] Silver, S., Misra, T. K. “Bacterial transformation of and resistances to heavy metals”, *Basic Life Sci.* **28**: 23-46. (1984).
- [68] Nies, D. H., Silver, S., “Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances”, *Journal of Industrial Microbiology*, **Vol. 14**, pages 186-199,(1990).
- [69] Dressler C, Kues U, Nies DH, Friedrich B “Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria”, *Appl Environ Microbiol* **57**:3079–3085, (1991).
- [70] Archer GL, Niemeyer DM Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* **2**: 343–347. (1994).
- [71] Choudhury, R., and Srivastava, S., “Zinc resistance mechanisms in bacteria”, www.ias.ac.in/currsci/oct102001/768.pdf, (2007).

- [72] Tunner, J.S., Robinson, N.J., “Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics”, *J. Industr. Microbiol.* **14**:119-125, (1995).
- [73] Trevors, J. T., Stratton, G. W., Gadd, G. M., “Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae, and fungi”, *Can. J. Micribiol.* **32**: 447-464. (1986).
- [74] Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., and Murayama, T.” Nickel resistance in yeast and other fungi”, *J. Ind. Microbiol.* **14**: 64-168. (1995).
- [75] Murphy, R. J., and Leavy, J. F. “Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi”, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81**: 165-168. (1983).
- [76] Aiking, H., Kok, K., Heerikhuizen, H. V., and Van’t, R. J. “Adaption to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide”, *Appl. Environ. Microbial.* **44**:938-944. (1982).
- [77] Summers, A.O., “Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance”, *Ann Rev Microbiol.* **40**:607–634., (1986).
- [78] Osborn, AM., Bruce, KD., Strike P., Ritchie DA., “Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon”, *FEMS Microbiol Rev.* **19**:239–262., (1997).
- [79] Silver, S., Rosen, B. P., Misra, T. K., “ DNA sequencing analysis of mercuric and arsenic resistance operons of plasmids from gram negative and gram positive bacteria”, In 5th Int. Symp. Genet. Ind. Microorg., Split, Yugoslavia, ed. M. Alacevic, D. Hranueli, Z. Toman. Pp. 357-371. Zagreb, Yugoslavia: Pliva (1986).
- [80] Hamlett, N. V., Landale, E. C., Davis, B. W., and Summers, A. O. “Roles of the *Tn21*, *merT*, *merP* and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding”, *J. Bacteriol.* **174**: 6377-6385 (1992).
- [81] Commes, K. M., Shewchuk, L. M., Ivanetich, K., and Walsh, C. T. “Construction of a synthetic gene for the metalloregulatory protein MerR and analysis of regionally mutated proteins for transcriptional regulation”, *Biochemistry* **33**: 4175-4186. (1994).

- [82] Condee, C. W., and Summers, A. O. "A mer-lux transcriptional fusion for real time examination of *in-vivo* gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity", J. Bacteriol. **174**:8094-8101.(1992).
- [83] Ike, W. L., Liverelli, V., Park, S. J., Totis, P. A., Summers, A. O. "*In- vivo* DNA-protein interactions at the divergent mercury resistance (*mer*) promoters: II Repressor/activator (*merR*)-RNA polymerase interaction with *merOP* mutants", J. Biol. Chem. **268**: 2632-2639. (1993).
- [84] Lung, P., and Brown, N. "Up-promoter mutations in the positively regulated mer promoter of *Tn510*", Nucleic Acids Res. **17**: 5517-5526.(1989).
- [85] Parkhill, J., and Brown, N. L. "Site specific insertion and deletion mutants in the mer promoter- operator region of Tn501; The nineteen base pair spacer is essential for normal induction of the promoter by *merR*", Nucleic Acids Res. **18**: 5157-5162. (1990).
- [86] Utschig, L. M., Bryson, J. W., and O'Halloran, T. V., "Mercury-199 NMR of the metal receptor site in merR and its protein-DNA complex", Science **268**: 380-385, (1995).
- [87] Cook, W. J., Kar, S.R., Taylor, K.B., and Hall, L.M. "Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins", J. Mol. Biol. **275**: 337-346. (1998).
- [88] Tsutomu, S., and Kobayashi, Y., "The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite", J. Bacteriol. **180**: 1655-1661. (1998).
- [89] Beveridge, T. J., and Fyfe, W. S. "Metal fixation by bacterial cell walls", Can. J. Earth Sci., **22**: 1893-1898, (1985).
- [90] Temizkan, G., "Genetik II. Moleküler genetik", İ.Ü. Fen Fak. Basımevi, 400 (1999)
- [91] Brown, T.,A., Çeviri Coral, G., Ünalı Coral, N., "Gen Klonlama", s.s. 322 (2005).
- [92] Arda, M., "Biyoteknoloji", Armoni Ltd. Şti., Ankara, (1995).
- [93] Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., "Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi". FEMS Microbiol Rev., **14**:121–138. (1994).

- [94] DiGiovanni, G.D., Neilson, J.W., Pepper, I.L., Sinclair, N.A., "Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients", *Appl Environ Microbiol.*, **2**:2521–2526., (1996).
- [95] Lilley, A.K., Bailey, M.J., "The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions", *Appl Environ Microbiol.*, **63**:1577–1583. (1997).
- [96] Jobling, M.G., Peters, S.E., Ritchie, D.A., "Plasmid- borne mercury resistance in aquatic bacteria", *FEMS Microbiol Lett.*, **49**:31–37, (1988).
- [97] Voloudakis, A.E., Bender, C.L., Cooksey, D.A., "Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:1627–1634, (1993).
- [98] Helman, J.D., Wang, Y., Mahler, I., Walsh, C.T., "Homologous metalloreulatory proteins from both Gram-positive and Gram-negative bacteria control transcription of mercury resistance operons", *J Bacteriol.*, **171**:222–229, (1989).
- [99] Fleishmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenny, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H., Ventner, J.C. "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.", *Science* **269**:496–512, (1995).
- [100] Cooksey, D.A., "Molecular genetics and evolution of copper resistance in bacterial plant pathogens", *ACS Symp Ser.*, **645**:79–88, (1996).
- [101] Yurieva, O., Kholodii, G., Minakhin, L., Gorlenko, Z., Kalyaeva, E., Mindlin, S., Nikiforov, V., "Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria". *Mol Microbiol.*, **24**: 321–329, (1997).

- [102] Barkay, T., Olson, B.H., “Phenotypic and genotypic adaptation of aerobic heterotrophic sediment bacterial communities to mercury stress”, *Appl Environ Microbiol* **52**:403–406 (1986)
- [103] Nakamura, K., Silver, S., “Molecular analysis of mercury-resistant *Bacillus* isolates from sediment of Minamata Bay Japan”. *Appl Environ Microbiol* **60**:4596–4599 (1994)
- [104] Summers, A.O., Wireman, J., Vimy, M.J., Lorscheider, F.L., Marshall, B., Levy, S.B., Bennett, S., Billard, L., “Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates”, *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 152–171 (1993).
- [105] Huysman, F., Verstraete, W., Brookes, P.C., “Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations”, *Soil Biochem.* **26**:103–110 (1994).
- [106] Mergeay, M., Springael, D., Top, E., “Gene transfer in polluted soils”. In Fry JC, Day MJ (eds): “Bacterial Genetics in Natural Environments”, London: Chapman and Hall (1990).
- [107] Cha, J.S., Cooksey, D.A., “Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:8915–8919, USA (1991).
- [108] Silver, S., Phung, L. T. “Bacterial heavy metals resistance: new surprises”. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789 (1996).
- [109] Wireman, J., Liebert, C.A., Smith, T., Summers, A.O., Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the Gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4494–4503 (1997).
- [110] Brønstad, K., Drønen, K., Øvreås, L., Torsvik, V., “Phenotypic diversity and antibiotic resistance in soil bacterial communities”, *J Ind Microbiol.* **17**:253–259 (1996).
- [111] Sundin, G.W., Demezas, D.H., Bender, C.L., “Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides”, *Appl Environ Microbiol.* **60**:4421–4431 (1994).

- [112] Gedek, B., “Zur Wirkung von Kupfer im Tierfutter als Selektor antibiotikaresistenter *E.-coli*- Keime beim Schwein”, Tierärztliche Umschau **36**:6– 21 (1981).
- [113] Boronin, A. M., “Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent?”, FEMS Microbiol Lett. **100**:461–468 (1992).
- [114] Öner, M., “Bakteriyolojiye Giriş”, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:47 ;25-44 İzmir, (1989).
- [115] Krieg, N.R., Holt,J.G., “Bergey’s manual of systematic bacteriology” Lippincott Williams and Wilkins, New York, U.S.A., (1983).
- [116] Karagöz, S., “Aromatik hidrokarbonları degrede eden *Pseudomonas* spp’lerin izolasyonu ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, (2004).
- [117] Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y., Güzel, F., “ Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by kaolinite “, Water Resorh., **37**:948-952 (2003).
- [118] Kabasakal, E., “Herbisitlerden 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D)’in Adsorbsiyonunun İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara (2001).
- [119] Aksu, Z., “ Atıksulardaki ağır metal iyonlarının yeşil alglerden *Chlorella vulgaris*’e adsorbsiyonunun kesikli düzende karıştırmalı ve akışkan yatak tepkime kaplarında incelenmesi’, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara (1988).
- [120] Sağ, Y., “ Atıksulardaki ağır metal iyonlarının giderilmesi ve geri kazanılması için en uygun biyosorbent türünün seçilmesi ve değişik reaktör sistemlerinin matematiksel inselenmesi”, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara (1993).
- [121] Açıkel, Ü., “Endüstriyel atıksularının ağır metal iyon karışımlarının yeşil alglerden *C. vulgaris*’e adsorpsiyonunun incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara (1996).
- [122] Sağ, Y., ve Kutsal, T., “ Application of adsorption isotherms to chromium adsortion on *Z. ramigera*”, Biotechnology Letters, **11**:41-44, (2000).

- [123] Sağ, Y., Akay, Y., “ Mass transfer and equilibrium studies for the sorption of chromium ions onto chitin”, *Process Biochem*, **36**:157-173, (2000).
- [124] Akaya, G., ve Özer, A., “ Biosorption of Acid Red 274 (AR 274) on *Dicranella varia*: Determination of equilibrium and kinetic model paramters”, *Process Biochemistry*, 1359-5113, (2005).
- [125] Silver, S., Misra, T.K., “Plasmid-mediated heavy metal resistances” , *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:717-43, (1988).
- [126] Ghosh, S., Mahapatra, N.R.; Banerjee, P.C. “Metal resistance in *Acidocella* strains and plasmid-mediated transfer of this characteristic to *Acidiphilium multivorum* and *Escherichia coli*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(11)**:4523-4527, (1997).
- [127] Mahapatra, N.R., Banerjee, P.C. “Extreme tolerance to cadmium and high resistance to copper, nickel and zinc in different *Acidiphilium* strains”, *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**:393-397, (1996).
- [128] Cánovas, D., Durán, C., Rodríguez, N., Amils, R., Lorenzo, V. “Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto”, *Environ. Microbiol.*, **5(2)**:133-138, (2003).
- [129] Durán, C., Marín, I., Amils, R. “Specific metal sequestering acidophilic fungi, *In: Amils, R.; Ballester, A. (eds)*. Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century”, Elsevier, Amsterdam, , p.521-530. (1999).
- [130] Itoh, S., Iwaki, M., Wakao, N., Yoshizu, K., Aoki, A., Tazaki, K., “Accumulation of Fe, Cr and Ni metal inside cells of acidophilic bacterium *Acidiphilium rubrum* that produces Zn-containing bacteriochlorophylla”, *Plant Cell Physiol.*, **39(7)**:740-744, (1998).
- [131] Silóniz, M., Payo, E.M., Callejo, M.A., Marquina, D., Peinado, J.M. “Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 210:233- 237, (2002).
- [132] Castro-Silva, M. A., de Souza Lima , A. O, Gerchenski, A. V.; Jaques, D.B., Rodrigues, A. L., de Souza ,P. L., Rörig, L. R., “Heavy metal resistance of micoorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarana”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **34** (Suppl.1):45-47,(2003).

- [133] Cervantes C, Chavez K, Vaca S., “Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals”, *Rev Latin Microbiol.*, **33**: 61-70, (1991).
- [134] Roane, T.M., Kellogg, S.T., “Characterization of Bacterial Communities in heavy metal contaminated soils”, *Canadian J Microbiol.* **42**: 593-603, (1996).
- [135] Schmidt T, Schlegel HG (1994) Combined Nickel-Cobalt-Cadmium Resistance Encoded by the ncc Locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* 176: 7054-7054
- [136] Ünalı, M.N., Korkmaz, H., Arıkan, B., Coral, G., “Plasmid-encoded heavy metal resistance in *Pseudomonas* sp.” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:1145-1150,(2003).
- [137] Richards, J. W., Krumholz, G. D., Chval, M. S., Tisa L. S., “Heavy Metal Resistance Patterns of *Frankia* Strains” *Applied and environmental microbiology*, **68**: 923–927 , (2002).
- [138] Lalonde, M., Calvert, H. E., Pine, S., “Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation”,. *In* A. H. Gibson and W. E. Newton (ed.), *Current perspectives in nitrogen fixation*. Australian Academy of Science, Canberra, Australia, p. 296–299, (1981).
- [139] Zhang, Z., Lopez, M.F., Torrey, J.G.,. “A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species”, *Plant Soil* **78**:79–90, (1984).
- [140] Meesters, T. M., van Genesen, S. T., Akkermans, A. D. L., “Growth, acetylene reduction activity and localization of nitrogenase in relation to vesicle formation in *Frankia* strains Cc11.7 and Cp1.2”, *Arch. Microbiol.*, **143**:137–142, (1985).
- [141] Mirza, M. S., Akkermans, W. M. Akkermans, A. D. L. “CRamplified 16S rRNA sequence analysis to confirm nodulation of *Datisca cagnabina* L. by the endophyte of *Coriaria nepalensis* Wall”. *Plant Soil*, **160**:147–152, (1994).
- [142] Callaham, D., Del Tridici, P., Torrey. J. G., “Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*”, *Science* **199**:899–902, (1978).

- [143] Tisa, L., McBride, M., Ensign, J. C., “Studies of growth and morphology of *Frankia* strains EAN1pec, EuI1c, CpI1 and ACN1AG”, *Can. J. Bot.*, **61**:2768–2773, (1983).
- [144] Akkermans, A. D. L., Hafeez, F., Roelofsen, W., Chaudhary, A. H., Baas, R.,. “Ultrastructure and nitrogenase activity of *Frankia* grown in pure culture and in actinorhizae of *Alnus*, *Colletia* and *Datisca* spp.”,. In C. Vegger and W. E. Newton (ed.), *Advances in nitrogen fixation research*. Nyhoff/Junk Publishers, p. 311–319, The Hague, The Netherlands, (1984).
- [145] Lumini, E., Bosco, M., “PCR-restriction fragment length polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp. strain UFI 132715”, *Appl. Environment. Microbiol.*, **62**:3026–3029. (1996).
- [146] Levinson, H. S., Mahler, I., “Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*”, *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:135–138, (1998).
- [147] Baker, D., Newcomb, W., Torrey, J. G., “Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. EuI1 (Actinomycetales)”, *Can. J. Microbiol.* **26**:1072–1089, (1980).
- [148] Lalonde, M., Calvert, H. E., Pine, S., “Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In A. H. Gibson and W. E. Newton (ed.), *Current perspectives in nitrogen fixation*”, Australian Academy of Science, **23**: 296–299, Canberra, Australia, (1981)
- [149] Hafeez, F., Akkermans, A. D. L., Chaudhary, A. H., “Morphology, physiology, and infectivity of two *Frankia* isolates, An1 and An2 from root nodules of *Alnus nitida*”, *Plant Soil* **78**:45–59, (1984).
- [150] Gilotra, U., , Srivastava, S., “Plasmid-Encoded Sequestration of Copper by *Pseudomonas pickettii* Strain US321”, *Current Microbiology*, **34**, 378–381 (1997)
- [151] Haefeli, C., Franklin, C., Hardy, H., “Plasmid-Determined Silver Resistance in *Pseudomonas stutzeri* Isolated from Silver Mine”, *Journal of Bacteriology*, **158**:389-392, (1984).

- [152] Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kamal, K., Moawad, H., “Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp.” *Electronic Journal of Biotechnology*, **7**(1): 38-46, (2004).
- [153] Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J. , Flemming, C. A., Bailey, G. W., “Bacterial Sorption of Heavy Metals”, *Applied And Environmental Microbiology*, **55**: 3143-3149, (1989).
- [154] Sağ, Y., ve Kutsal, T., “Application of adsorption isotherms to chromium adsorption on *Z.Ramigera*”, *Biotechnology Letters*: 11:41-44 (1989)
- [155] Nourbakhsh, M. N., Kılıçaslan, S. I., ve Özdağ, H., “Pb²⁺ And Cu²⁺ industrial waste water on *Bacillus* sp.”, *Chemical Engineering Journal*, **85**:351-355, (2002)

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Adana’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana’da tamamladıktan sonra, 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Radyoloji bölümünden mezun oldum. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Halen, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime devam etmekteyim.