

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

139840

*Zoogloea ramigera*'nın AĞIR METALDE ÜREME  
KARAKTERİSTİĞİ VE AĞIR METALİ TOPLAMA  
KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

- 139840 -

Biyolog Ürün BAYINDIR

F. B. E. Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sule Arel

Prof. Dr. Nezhun GÖREN (Y.T.Ü.)  
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON (TÜBİTAK)

Prof. Dr. Nezhun Gören

Prof. Dr. Abdulrezzak Memon

Prof. Dr. Aytekin Topal

İSTANBUL, 2003

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA KURULU

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KISALTMA LİSTESİ .....                                                                                        | iv   |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                                                            | v    |
| ÇİZELGE LİSTESİ .....                                                                                         | vi   |
| ÖNSÖZ .....                                                                                                   | vii  |
| ÖZET .....                                                                                                    | viii |
| ABSTRACT.....                                                                                                 | ix   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                | 1    |
| 2. MALZEME VE YÖNTEM .....                                                                                    | 11   |
| 2.1 Organizmalar ve plazmit.....                                                                              | 11   |
| 2.1.1 Organizmalar.....                                                                                       | 11   |
| 2.1.2 Plazmit .....                                                                                           | 11   |
| 2.2 Kullanılan besiyerleri .....                                                                              | 12   |
| 2.3 Organizmaların üretimi ve saklanması .....                                                                | 13   |
| 2.3.1 <i>Z. ramigera</i> 'nın üretilmesi ve saklanması.....                                                   | 13   |
| 2.3.2 <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ırkının üretilmesi .....                                                    | 14   |
| 2.4 <i>Z. ramigera</i> 'nın zamana bağlı üremesinin saptanması .....                                          | 14   |
| 2.5 Generasyon süresinin hesaplanması.....                                                                    | 15   |
| 2.6 <i>Z. ramigera</i> 'nın farklı bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında üreme durumlarının incelenmesi..... | 15   |
| 2.7 <i>Z. ramigera</i> tarafından bakır ve kadmiyum alınımının ölçülmesi .....                                | 16   |
| 2.7.1 <i>Z. ramigera</i> biyokütlesi tarafından bakır ve kadmiyum alınımının tayini .....                     | 16   |
| 2.7.2 Bakır ve kadmiyumun hücre sitosolüne alınımının tayini .....                                            | 17   |
| 2.8 Digoksinin (DIG) sistemi ile Southern Hibridizasyonu.....                                                 | 18   |
| 2.8.1 Southern hibridizasyonu için <i>Z. ramigera</i> genomik DNA'sının hazırlanması .....                    | 18   |
| 2.8.1.1 <i>Zoogloea ramigera</i> 'dan genomik DNA izolasyonu .....                                            | 18   |
| 2.8.1.2 DNA miktarı ve saflığının tayini .....                                                                | 20   |
| 2.8.1.3 Agaroz jel hazırlanışı ve DNA'nın elektroforezi .....                                                 | 21   |
| 2.8.1.4 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.....                                             | 22   |
| 2.8.1.5 Southern blotting.....                                                                                | 23   |
| 2.8.2 Southern hibridizasyonu için prob hazırlanması.....                                                     | 24   |
| 2.8.2.1 Plazmit izolasyonu .....                                                                              | 24   |
| 2.8.2.2 Plazmit kesimi.....                                                                                   | 26   |
| 2.8.2.3 Agaroz jelden DNA'nın geri kazanımı .....                                                             | 27   |
| 2.8.2.4 Jelden geri kazanılmış <i>cadC</i> genine ait DNA'nın konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesi ..... | 28   |
| 2.8.2.5 Proben hazırlanması ve kontrolü .....                                                                 | 28   |
| 2.8.3 Ön hibridizasyon .....                                                                                  | 31   |

|       |                                                                                                            |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8.4 | Hibridizasyon .....                                                                                        | 31 |
| 2.8.5 | İmmunolojik belirleme .....                                                                                | 32 |
| 3.    | BULGULAR .....                                                                                             | 34 |
| 3.1   | <i>Z. ramigera</i> 'nın zamana bağlı üremesinin saptanması .....                                           | 34 |
| 3.2   | <i>Z. ramigera</i> 'nın generasyon süresinin hesaplanması .....                                            | 35 |
| 3.3   | <i>Z. ramigera</i> 'nın farklı bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında üreme durumlarının incelenmesi ..... | 35 |
| 3.3.1 | <i>Z. ramigera</i> 'da bakır alınımının tayini .....                                                       | 44 |
| 3.3.2 | <i>Z. ramigera</i> 'da kadmiyum alınımının tayini .....                                                    | 46 |
| 3.3.3 | <i>Z. ramigera</i> 'da bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında bakır ve kadmiyum alınımının tayini .....    | 48 |
| 3.4.1 | Bakırın sitosole alınımının tayini .....                                                                   | 50 |
| 3.4.2 | Kadmiyumun sitosole alınımının tayini .....                                                                | 51 |
| 3.4.3 | Bakır ve kadmiyumun sitosole alınımının tayini .....                                                       | 51 |
| 3.5   | DIG sistemi ile Southern Hibridizasyonu .....                                                              | 52 |
| 3.5.1 | Genomik DNA'nın miktar tayini ve saflık kontrolü .....                                                     | 52 |
| 3.5.2 | Genomik DNA'nın kesimi .....                                                                               | 53 |
| 3.5.3 | Plazmit izolasyonu .....                                                                                   | 54 |
| 3.5.4 | Saflaştırılmış <i>cadC</i> geninin miktar tayini ve saflık kontrolü .....                                  | 54 |
| 3.5.5 | İşaretlenen probun kontrolü .....                                                                          | 55 |
| 3.5.6 | Southern hibridizasyonu .....                                                                              | 55 |
| 4.    | TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                    | 56 |
|       | KAYNAKLAR .....                                                                                            | 61 |
|       | İNTERNET KAYNAKLARI .....                                                                                  | 66 |
|       | ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                             | 67 |

## KISALTMA LİSTESİ

|                    |                              |
|--------------------|------------------------------|
| ATPaz              | Adenozin trifosfataz         |
| bç                 | Baz çifti                    |
| CTAB               | Setil trimetilamonyum bromür |
| DNA                | Deoksiribonükleik asit       |
| bdH <sub>2</sub> O | Bidistile su                 |
| dH <sub>2</sub> O  | Distile su                   |
| EDTA               | Etilendiamintetraasetik asit |
| EtBr               | Etidyum bromit               |
| EtOH               | Etanol                       |
| Gli                | Glisin                       |
| Glu                | Glutamik asit                |
| kb                 | Kilobaz                      |
| OD                 | Optik dansite                |
| RNA                | Ribonükleik asit             |
| RNaz               | Ribonükleaz                  |
| rpm                | Devir/dakika                 |
| sdH <sub>2</sub> O | Steril distile su            |
| SDS                | Sodyum dodesil sülfat        |
| Sis                | Sistein                      |
| TAE                | Tris-asetat tamponu          |
| TE                 | Tris-EDTA                    |
| UV                 | Ultraviyole                  |
| v/v                | Hacim/hacim                  |
| w/w                | Ağırlık/ağırlık              |
| w/v                | Ağırlık/hacim                |

## ŞEKİL LİSTESİ

|            |                                                                                                                                       |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1  | <i>Z. ramigera</i> hücresi .....                                                                                                      | 7  |
| Şekil 1.2  | <i>Z. ramigera</i> hücreleri ve etraflarını saran polisakkarit tabakası ile kümeleşme oluşumu.....                                    | 8  |
| Şekil 2.1  | pET-28a plazmidinin genetik haritası .....                                                                                            | 12 |
| Şekil 3.1  | <i>Zoogloea ramigera</i> 'nın zamana bağlı üreme grafiği .....                                                                        | 34 |
| Şekil 3.2  | Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır konsantrasyonunda üremesi .....                                                           | 36 |
| Şekil 3.3  | Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan kadmiyum konsantrasyonunda üremesi .....                                                        | 37 |
| Şekil 3.4  | Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunda üremesi .....                                               | 38 |
| Şekil 3.5  | Çok yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır konsantrasyonlarında üremesi ..                                                          | 40 |
| Şekil 3.6  | Çok yoğunlukta ekilen hücrelerin artan kadmiyum konsantrasyonunda üremesi .....                                                       | 41 |
| Şekil 3.7  | Artan bakır konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle .....                                                                              | 42 |
| Şekil 3.8  | Artan kadmiyum konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle .....                                                                           | 43 |
| Şekil 3.9  | Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle.....                                                                   | 44 |
| Şekil 3.10 | Artan bakır konsantrasyonuna göre özgül bakır toplanması.....                                                                         | 46 |
| Şekil 3.11 | Artan kadmiyum konsantrasyonuna göre özgül kadmiyum toplanması .....                                                                  | 47 |
| Şekil 3.12 | Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunda özgül bakır toplanması .....                                                                | 49 |
| Şekil 3.13 | Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunun özgül kadmiyum toplanması...                                                                | 49 |
| Şekil 3.14 | Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi.....                                                                                         | 53 |
| Şekil 3.15 | Genomik DNA'nın enzimlerle kesim sonucu elektroforetik analizleri .....                                                               | 53 |
| Şekil 3.16 | pET-28a vektörünün <i>Xba</i> I ve <i>Hind</i> III enzimleriyle kesim ürünlerinin incelenmesi.....                                    | 54 |
| Şekil 3.17 | İşaretlen prob ile kit içerisinde hazır bulunan işaretli probdan hazırlanan sulandırma serilerinin Zeta-Probe membranda analizi ..... | 55 |
| Şekil 3.18 | <i>CadC</i> geni ile hazırlanan prob ile hibridize edilmiş Zeta-Probe membran.....                                                    | 55 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

|              |                                                                                                                  |    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1  | Bergey'in Sistematik Bakterioloji Kitabına göre <i>Z. ramigera</i> 'nın sınıflandırılması .....                  | 7  |
| Çizelge 2.1  | Çalışmada kullanılan <i>Z. ramigera</i> ve <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri .....                           | 11 |
| Çizelge 2.2  | <i>Z. ramigera</i> 'nın üretiminde kullanılan besiyeri .....                                                     | 12 |
| Çizelge 2.3  | <i>E. coli</i> 'nin üretiminde kullanılan besiyeri .....                                                         | 13 |
| Çizelge 2.4  | Bakır ve kadmiyum miktarlarının ölçümünde atomik absorpsiyon spektrofotometresinde kullanılan parametreler ..... | 17 |
| Çizelge 2.5  | Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler .....                                                  | 20 |
| Çizelge 2.6  | Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler .....                                             | 21 |
| Çizelge 2.7  | Restriksiyon enzimlerinin konsantrasyonları ve birlikte kullanılan tamponlar .....                               | 22 |
| Çizelge 2.8  | Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu .....                                                                | 22 |
| Çizelge 2.9  | Southern blotting için kullanılan tampon ve çözeltiler .....                                                     | 24 |
| Çizelge 2.10 | Kaynama metoduyla yapılan plazmit izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler .....                            | 25 |
| Çizelge 2.11 | Plazmit DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu .....                                              | 26 |
| Çizelge 2.12 | Prob hazırlanmasında kullanılan bileşikler .....                                                                 | 29 |
| Çizelge 2.13 | Sulandırma serileri .....                                                                                        | 30 |
| Çizelge 2.14 | DIG sisteminde kullanılan tampon ve çözeltiler .....                                                             | 33 |
| Çizelge 3.1  | Hücrelerce toplanan bakır oranı .....                                                                            | 45 |
| Çizelge 3.2  | Hücrelerce toplanan kadmiyum oranı .....                                                                         | 47 |
| Çizelge 3.3  | Bakır ve kadmiyum içeren besiyerinde, hücrelerce toplanan bakır ve kadmiyum oranı .....                          | 48 |
| Çizelge 3.4  | Hücrelerce toplanan bakıra oranla sitosolde bakırın toplanma oranı .....                                         | 50 |
| Çizelge 3.5  | Hücrelerce toplanan kadmiyuma oranla sitosolde kadmiyum toplanma oranı .....                                     | 51 |
| Çizelge 3.6  | Hücrelerce toplanan bakır ve kadmiyuma oranla sitosolde bakır ve kadmiyum toplanma oranı .....                   | 52 |
| Çizelge 3.7  | Genomik DNA'nın spektrofotometrik analiz sonuçları .....                                                         | 52 |
| Çizelge 3.8  | <i>CadC</i> geninin spektrofotometrik analiz sonuçları .....                                                     | 55 |

## ÖNSÖZ

Ağır metal kirliliği hem ülkemizde, hem de dünyada giderek artan bir sorundur. Kirliliğin giderilmesi için daha önce kullanılan fiziksel ve kimyasal metodlar çoğu zaman yetersiz kalmakta ve başka kirleticilerin oluşmasına yol açmaktadır. Mikroorganizmaların, özellikle de bakterilerin topraktan ve sudan ağır metal gideriminde kullanılması giderek artan önem taşımaktadır. Özellikle atık sularda yaşayan *Zoogloea ramigera* bakterisinin daha önce yapılan çalışmalarda bakır ve kadmiyumu topladığı anlaşılmıştır. Bu çalışmada, *Zoogloea ramigera*'nın bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında üreme karakteristiği ve toplama kapasitesi incelenmiştir. Bakır ve kadmiyumu toplama kapasitesinin metabolizmaya bağlı olup olmadığı ve hücre sitosolünde ne kadar topladığı incelenmiştir. *Z. ramigera*'nın genomunda ağır metale duyarlı *cadC* geninin varlığı araştırılmıştır.

Y. T. Ü. Biyoloji Bölümü'nde çalışma hayatına başladığım andan itibaren bana yol gösteren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman güç ve destek veren danışmanım Prof. Dr. Nezhun Gören'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesiyle bana daima yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Abdulrezzak Memon'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nden, Aylin Özdemir, Diğdem Aktopraklıgil ve Birsen Cevher Keskin'e, Dr. Şenay Vural Korkut'a, Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Karşılaştığım zorluklarda, bana her türlü yardımda bulunan hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Zerrin Çalışkan, Dr. Nehir Özdemir ve Ar. Gör. Semra Hasançebi'ye, diğer tüm hocalarıma ve Çiğdem Metin'e çok teşekkür ederim. Tahsil hayatım boyunca bana daima destek olan, eğitimimde her türlü anlayış ve fedakarlığı gösteren aileme ve büyük halam Bedriye Bayındır'a, merhum lise biyoloji hocam George Kircheff'e çok teşekkür ederim.

## ÖZET

Ağır metal kirliliği ülkemizde ve dünyada giderek artmakta olan bir çevre problemidir. Bir çok biyokimyasal reaksiyonda rol oynayan, enzimler ve proteinlerin prostetik grubu olarak önemli yaşamsal faaliyetlerde rol oynayan ağır metaller, fazla miktarda olduklarında canlılar için toksiktir. Ağır metaller organik kirleticiler gibi parçalanmadıklarından, doğrudan besin zincirine katılırlar. Ağır metal kirliliğinin gideriminde kullanılan geleneksel kimyasal yöntemlerin çoğu zaman yetersiz ve pahalı olmasının yanısıra, bu yöntemler çevreye başka toksik bileşiklerin salınımına da neden olmaktadır.

Doğada, başta mikroorganizmalar olmak üzere bir çok canlının ağır metal toplama kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu canlılardan en kolay çalışılan bakterilerdir. *Zoogloea ramigera*, arıtım sistemlerinde doğal olarak baskın bulunan bir bakteridir. Bu bakteri hücre dışına saldıgı fazla miktardaki zayıf asidik polisakkarit ile bakır ve kadmiyum gibi metal katyonlarını yüksek oranda bağlamaktadır.

Bu çalışmada *Z. ramigera*'nın belli bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarını içeren sıvı ve katı besiyerlerindeki üreme karakteristiği, bakır ve kadmiyumun birlikte üremeye etkisi incelenmiştir. Bu konsantrasyonlardaki bakır ve kadmiyuma maruz bırakılan hücrelerin bakır ve kadmiyumu toplama kapasitesi, bunun metabolizmaya bağıllığı, sitosole taşınımı araştırılmıştır. Ayrıca *Staphylococcus aureus*'da kadmiyum taşınımında etkili proteini kodlayan *cadC* geninin varlığı *Z. ramigera*'da DIG işaretleme sistemiyle araştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Biyoremediasyon, ağır metal kirliliği, *Zoogloea ramigera*

## ABSTRACT

Heavy metal pollution is an accelerating environmental problem both in our country and in the world. Most of the heavy metals are essential for biochemical reactions, as they play important roles for being prosthetic groups of enzymes and proteins. However, their presence at higher concentrations are toxic for organisms. Due to the fact that heavy metals can not be degraded like organic pollutants, they directly enter to the food chain. The conventional chemical methods which have been used for a long time, are insufficient, expensive and give rise to formation of other toxic compounds.

In nature, a lot of organisms especially microorganisms, have the capability to accumulate heavy metals. *Zoogloea ramigera*, which is a Gram negative bacterium, is found abundantly in sewage effluent. A weakly acidic polysaccharide is secreted by this bacterium, and this polysaccharide matrix have the capacity to bind heavy metal cations like copper and cadmium in large amounts.

In this presentation, the growth characteristics of *Z. ramigera* in liquid and solid mediums containing copper and cadmium were investigated. In addition, the effects of copper and cadmium interactions to bacterial growth were explored. At several concentrations of copper and cadmium, the adsorption capacity of biomass, the relationship between uptake and metal accumulation in cytosol of the bacterial cell was investigated. In addition, the presence of *cadC* gene, which plays role in cadmium transportation in *Staphylococcus aureus*, was investigated with DIG labelling system.

**Keywords:** Bioremediation, heavy metal pollution, *Zoogloea ramigera*

## 1. GİRİŞ

Bazı ağır metal iyonları karmaşık biyokimyasal reaksiyonlarda “eser elementler” olarak önemli rol oynadıklarından eser miktarda tüm canlılar için gereklidir. Fakat gerekli olsun olmasın bir çok ağır metal yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye neden olmaktadır (Nies, 1999). Doğada bulunan 90 elementin 53’ü ağır metaldir ve ağır metaller tamamen dolmamış “d” yörüngelerinden ötürü çok kolay reaksiyona girerler. Ağır metaller hücre içersine girdiklerinde moleküllerin özellikle tiyol gruplarına (-SH) bağlanma eğilimindedirler (Nies, 1999). Tiyol gruplarına bağlanan ağır metaller hassas enzimlerin aktivitesini inhibe edebilirler (Nies, 1999). Gram negatif bakterilerde metal katyonları glutatyona bağlanarak, hidrojen peroksit oluşumuna ve oluşan bisglutatyonun redüklenememesi sonucunda hücre içi oksidatif strese neden olurlar (Nies, 1999). Ayrıca ağır metal iyonlarının hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunması, kuvvetli toksik bileşiklerin oluşmasına neden olduğundan fizyolojik açıdan hücre için tehlike oluştururlar. Bu nedenle ağır metal iyonlarının hücre içi konsantrasyonları çok sıkı bir şekilde kontrol edilir.

Bakır elementi periyodik tabloda I B grubuna dahil bir geçiş elementidir. Atom numarası 29, atom ağırlığı ise 63.546’dır. Bakır, insanoğlu tarafından kullanılan ilk metaldir. Bugün elektrik endüstrisi bakır üretiminin yapıldığı başlıca alanlardan biridir. Canlılarda ise bakır, süperoksit dismutaz, sitokrom C oksidaz, katalaz, dopamin hidroksilaz, askorbik asit oksidaz gibi [1] enzimlerin prostetik grubunun parçası olarak iş gören önemli eser elementlerden biridir. Ağır molekül ağırlıklı oksidazlar %0.05-%0.35 oranında bakır içerirler. Bakır tüm vücut dokularında bulunur ve eksikliğinde anemiye, iskelet sisteminde hasarlara, sinir ve üreme sisteminde bozukluklara, saçın yapısında ve renginde bozukluklara neden olur. Demirle birlikte hemoglobin oluşumunda rol oynar. Merkezi sinir sisteminin düzgün çalışmasında ve kollajen oluşumunda C vitamini ile birlikte iş görür. Bakırın azot fiksasyonunda, fotosentezde ve büyük ihtimalle klorofil üretiminde rol oynadığına dair kanıtlar da bulunmaktadır (Steward, 1963). Canlılık için bu derece önemli görevlerde rol alan bakır, proteine bağlı olmadığı durumlarda ise toksik etki gösterir. En fazla beyin ve karaciğerde olmak üzere tüm dokularda görülen bakır konsantrasyonundaki artış, kalıtsal nitelikteki bir hastalık olan Wilson hastalığında görülür.

Kadmiyum, periyodik tabloda II B grubuna dahil bir geçiş elementidir. Atom numarası 48, atom ağırlığı 112.4'dır ve sekiz adet kararlı izotop içerir. Kadmiyum dünyanın dış kabuğunda doğal olarak bulunan bir elementtir. Fakat doğada saf olarak bulunmaz ve oksijen (kadmiyum oksit), klor (kadmiyum klorür) veya kükürt (kadmiyum sülfat, kadmiyum sülfid) ile bileşikler oluşturur. Kadmiyumun oluşturduğu bu bileşikler değişik oranlarda suda çözünürler. En çok çözünen kadmiyum bileşikler kadmiyum klorür ve kadmiyum sülfattır [2].

Başta maden (inko) endüstrisi olmak üzere, nikel-kadmiyum pilleri, elektrokaplama, elektronik, plastik, gübre endüstrisinde, metallerin saflaştırılmasında, boya fabrikaları, imento üretimi ve fosil yakıtlarının yakılması sonucu (Hutzinger, 1980) yaklaşık olarak 4.000-13.000 ton kadmiyumun doğaya, bu miktarın yarısının ise nehirlerle ve okyanuslara salındığı belirtilmiştir [2]. Doğaya karışan bu atıklardaki kadmiyum bileşiklerinin çoğu suda çözünmemektedir. Topraktaki kadmiyumun bir kısmı suya karışır veya bitkiler tarafından alınır. Kadmiyum kirliliğinin bulunduğu ortamda yaşayan tüm canlılar havadan, sudan, topraktan veya besin yoluyla vücutlarına kadmiyumun bazı formlarını alırlar.

Ağır metaller doğada değişik formlara dönüşmeler bile asla doğadan yok olmazlar (Wang vd. 1999), [2]. Besin zincirinde birikir, doğada varlığını devam ettirirler [3] ve organik kirleticiler gibi biyolojik olarak parçalanamadıkları için çevre için tehlike oluştururlar.

Kadmiyum organizmalar için toksik, kanserojenik, nefrotoksik ve teratojeniktir [4]; (International Agency for Research on Cancer, 2002). Kanserijenik metaller zayıf mutajenlerdir ve kanserojenitelerinin mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Beyersmann, 2002). Kadmiyum gibi ağır metallerin, mutajenik ve kanserojenik özelliklerini, doğrudan rol oynayan genotoksik ajanların etkisini artırarak gösterdiği düşünülmektedir (Beyersmann, 2002). Bu özellikler zarar görmüş DNA molekülünün onarımının engellenmesiyle açıklanabilir. Ultraviyole veya DNA molekülüne zarar veren başka tip ajanlarla birleşince kadmiyum komutajenik ve kokanserojenik bir rol oynar (Hatwig, 1995). Kadmiyum iyonları veya reaktif metabolitleri hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan molekülleri etkileyerek gen anlatım kalıplarını değiştirir. Oluşan bu değişimlerin hücre büyümesi ve senesensi inhibe eden genlerle etkileşmesi sonucu, hücre çoğalmasında bozukluk

orataya çıkar. Kadmiyum hücrede en az iki tip geni aktive eder. 1) Metalloitiyonin, glutatyon sentezinde rol oynayan enzimler gibi detoksifiye edici ve hücreyi koruyucu proteinleri kodlayan genler. 2) Hücre çoğalmasının kontrol edilmesiyle ilgili proto-onkogenler (Beyersmann, 2002). Ayrıca kadmiyum iyonlarının hücresel kalsiyum homeostasisini etkilediği belirlenmiştir (Thévenod ve Jones, 1992; Nicotera vd., 1994; Benders vd., 1996).

Kadmiyum gibi ağır metaller hücre içerisinde nükleotidlere bağlanarak DNA'nın tek zincirinde kırılmalara yol açarlar (Hughes ve Poole, 1989; Mitra ve Bernstein, 1978). Bunun yanında kadmiyum biyokimyasal reaksiyonlarda gerekli olan mangan, çinko ve kalsiyumun yerini alarak canlılara zarar verir. Kadmiyumun biyolojik yarı ömrü çok uzundur, bu yüzden böbrek, karaciğer ve kemiklerde sürekli birikime yol açar [5]. Yaşlılıkta bir çok etmenlerin bir araya gelmesiyle kadmiyum birikimi Alzheimer hastalığına da yol açabilmektedir [5].

Bir çok metal canlılar için az miktarda gerekli olmakla birlikte, bugüne kadar kadmiyumun biyolojik aktivitesinin olmadığı düşünülmekteydi. Lane ve Morel (2000)'a göre, kadmiyum bir diatom olan *Thalassioria weissflogii*'nin karbonik anhidraz enziminde prostetik grup olarak rol oynamaktadır.

Ağır metallerin topraktan ve sudan giderimi için daha önce kullanılan kimyasal çöktürme, kimyasal oksidasyon ve redüksiyon, iyon değişimi, filtrasyon ve elektrokimyasal yöntemlerin başka toksik bileşikler oluşturması vb. dezavantajlarından dolayı biyolojik yöntemlerin önemi giderek artmaktadır. Çünkü bu teknikler hem yetersiz kalmakta, hem de özellikle ağır metal konsantrasyonu çok az olduğunda pahalı olmaktadır. Ayrıca bu tekniklerin katı atıklara uygulanması da çok zor olmaktadır. Ön hesaplamalar biyosorpsiyon işleminin, iyon değişim veya kimyasal çöktürmeye göre daha hesaplı bir temizleme yöntemi olduğunu göstermiştir (Ecoles, 1995).

Biyosorpsiyon, biyopresipitasyon, ve bakteri hücrelerinden elde edilen saflaştırılmış biyopolimerler, geleneksel fiziksel ve kimyasal metotlara alternatif ve/veya yardımcı bir yol sağlarlar (Silver, 1991). Ağır metal içeren endüstri atıklarının biyoakümüilasyon ile

temizlenmesi bir çok biyoteknoloji firması tarafından yürütülmektedir (Lovely vd., 1991; Macaskie ve Dean, 1984).

Bakteri, mantar, alg ve *Actinomycetes* gibi mikroorganizmaların sudan metal giderimi için kullanılması giderek artan bir önem kazanmaktadır (Wong vd., 1993; Yakubo ve Dudene, 1986). Bir çok araştırmada hem prokaryot hem ökaryot organizmaların kirli su ve su kaynaklarından ağır metali giderebilme yeteneklerinin olduğu anlaşılmıştır. Canlı veya ölü mikroorganizma biyokütlesi ve ürünleri metallerin hem çözünen hem de çözünmeyen bazı formları için çok yüksek derecede yeterli biyoakümülatör görevi görürler (Silver, 1991; Lovely vd., 1993; Niu vd., 1993). Biyosorpsiyon toprakta ve sudaki ağır metalleri konsantre etmek için önemli bir doğal yoldur (McLean vd., 1996; Berthelin vd., 1995). Ağır metalin sudan mikroorganizmalarca giderilmesinde mikroorganizmanın özgün yüzeysel özellikleri, hücre metabolizması ve çevrenin fizikokimyasal etkisi gibi bir çok faktör rol oynamaktadır (Norberg ve Persson, 1984). Bakterilerin hücre yüzeyi alanlarının hacimlerine oranı çok yüksek olduğundan (Beveridge, 1988), ortamdan metalleri adsorplama kapasitesi fazladır. Bunun yanında tüm mikroorganizmaların hücre yüzeylerinin eksi yüklü olması bakterilere hücre duvarında metal katyonlarını bağlama kapasitesi sağlar (Volesky vd. 1988). Hücreler tarafından toplanan bakırın çoğu bakteri yüzeyinde adsorblanır. Bakır bağlanması, bakırın hücre yüzeyinde bulunan negatif yüklü karboksil ve fosforil gruplarıyla etkileşmesi neticesinde olur (Mullen vd., 1989). Ağır metal katyonları Gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis*'in peptidoglikan tabakasındaki karboksil gruplarına bağlanır (Beveridge, 1985).

Çevreden ağır metal kirliliğinin giderilmesinde bakterilerin kullanılmasının en önemli avantajları, diğer yöntemlerde olduğu gibi toksik ve tehlikeli bileşiklerin kesinlikle oluşmaması (Kratochvil ve Volesky, 1998), işlemin maliyetinin çok daha ucuz olması ve ağır metallerle daha spesifik olmasıdır. Diğer yöntemlerde kontamine olmuş alanın sularla yıkanması gerekebilir, başka yerlere aktarılması gerekebilir. Oysa bakterilerle yapılan *in situ* temizlemede, buna gerek duyulmaz ve hedef kirlletici bulunduğu yerde uzaklaştırılır. Böylelikle aktarım sırasında hem halk hem de çalışanlar için doğabilecek zararlar önlenmiş olur [6]. Biyolojik temizleme dengeli bir ekosistem için uzun vadeli bir çözümdür. Metal adsorplayan mikroorganizmalar kullanıldığında topraktaki metaller bağlanıp, hareketsiz kılınarak, yer altı su kaynaklarının kontaminasyonu da önlenmiş olur (Valentine vd., 1996).

Özellikle atık sistemlerde doğal olarak baskın bulunan veya endüstriyel fermentasyon işlemleri atıklarından elde edilebilecek alg, maya veya bakteri biyokütleleri ile bu işlem daha hesaplı hale getirilebilir (Volesky ve Holan, 1995; Zouboulis vd., 1995). Bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae* de endüstriyel fermentasyon sonucu atık niteliği kazandığında daha sonra değerlendirebilmek üzere, metal tutma kapasitesi bakımından araştırılmaktadır (Volesky ve May-Philips, 1995, Simmons ve Singleton, 1996).

Ağır metallerin biyolojik olarak metal sülfidler halinde çöktürülme işlemi temizleme (remediasyon) çalışmalarında ümit veren başka bir stratejidir. Hidrojen sülfid üreten bakterilerin çoğu anaerobtur. Anaerob bir bakteri olan *Treponema denticola*'nın sistein biyosentez yolunda rol oynayan iki enzimi kodlayan genlerle *E. coli* hücreleri transforme edilmiştir. Böylece aerobik koşullarda ağır metal iyonları metal sülfidler halinde çöktürülerek, ortamdan uzaklaştırılmıştır. (Wang vd., 1999).

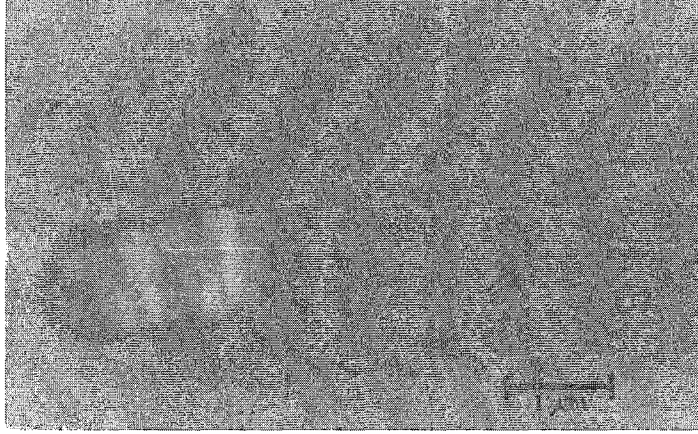
Ağır metal gideriminde kullanılmak üzere, bulunduğu ortamdaki ağır metal konsantrasyonuna dirençli, toprağa adapte edilmiş, yüzeyinde ağır metali bağlayabilen protein veya peptid dizisi taşıyan bakteriler bulunarak çalışılmaya başlanmıştır [7]. Çeşitli *Ralstonia*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri ağır metalce kirlenmiş toprağa adapte edilmiştir. Ağır metal bağlayan proteinler doğal, sentetik veya onların türevleri: aktivitesi veya stabilitesi arttırılmış füzyon proteinleri olabilir [7]. Ağır metal bağlayan protein veya peptidi kodlayan gen bir ekspresyon vektörüne klonlanır. Toprağa adapte olmuş ve ağır metale dirençli bakteri bu vektör ile transforme edilir. Bu tip bir çalışma *Ralstonia eutropha* bakterisinde uygulanmıştır. *Nicotiana bentamiana* bitkisinin yetiştigi toprağa transformant bakteri karıştırıldığında, ağır metalin bitki üstünde göstermiş olduğu toksik etkinin çok azaldığı görülmüştür [7]. (Glu-Sis)<sub>n</sub>Gli bakiyelerinin arttırılmasıyla üretilen sentetik fitokelatinlerin metalotiyoninlere göre daha fazla kadmiyum topladığı anlaşılmıştır (Bae vd., 2000). Hücre içinde metalotiyonin genlerinin ekspresyonunun arttırılması da bakteriye bağlı biyosorpsiyon yöntemlerinin geliştirilmesinde uygulanan başka bir stratejidir (Pazirandeh vd., 1995; Romeyer vd., 1990).

Ağır metal toplamak için bakterilerin yanında tek hücreli veya çok hücreli mantarlar, algler ve bitkiler de kullanılmaktadır. Ayrıca siyanobakterlerden *Synechococcus*'da metal bağlayan

metallotiyonin geni izole edilmiş olup, bu organizma da ağır metal toplamada kullanılmaktadır (Silver ve Ji, 1994). Ökaryotik alglerden *Dunaliella viridis*, *Chlamydomonas reinhardtii* ülkemizde de çalışılan alglerdir. *Agaricus arvenis*, *Lycoperdon giganteum*, *Amanita rubescens*, *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus betulinus* [8], *Dianthus caryophyllus*, *Tagetes erecta* [9] mantarları ağır metal toplama işlemlerinde en çok kullanılan türlerdir. Bitkilerde *Datura innoxia* [10], ve *Thlaspi caerulescens* [11] ağır metal toplamada oldukça yararlanılmaktadır. *Crustacea*'lerde kadmiyum birikimi ve metallotiyonin proteinlerine metallerin bağlanması çalışılmaktadır [12].

Atık ve arıtım sularında baskın bulunan bir bakteri türü olan *Zoogloea ramigera* (Rosello-Mora vd., 1995) ağır metali adsorplama kapasitesi bakımından en çok çalışılan bakteri türlerinden biridir. *Z. ramigera* canlı ve/veya cansız biyokütlesiyle çok miktarda bakır ve kadmiyumu sulu ortamdan toplayabilmektedir (Norberg ve Persson, 1984). Biyolojik arıtım yöntemlerinin geliştirilmesinde *Z. ramigera*'nın kullanılması, bu bakterinin atık sularda baskın bulunmasından dolayı, biyolojik arıtımın (biyoremediasyon) ekonomik hale getirilmesinde oldukça önem taşımaktadır (Volesky ve Holan, 1995; Zouboulis vd., 1995).

*Zoogloea ramigera*, zorunlu aerob, Gram-negatif, spor oluşturmeyen, 0.5-1.0 µm çapında, 1.0-3.0 µm uzunluğunda, kemoorganotrof, fermentasyon yapmayan, çomak şeklinde, polar flagellaya sahip monotrik bir bakteridir (Buchanan vd., 1974) (Şekil 1.1). *Z. ramigera*, sistematik sınıflandırmada *Pseudomonadaceae* familyasına girer (Buchanan vd., 1974) (Çizelge 1.1). Bu familyanın türleri toprakta, kaynak sularında, denizde, başka doğal materyallerde veya bitkilerde ve hayvanlarda hastalık ajanı olarak bulunurlar (Dugan vd., 1981a). Bu familya 86 yıl önce tanımlanmıştır (Winslow vd., 1917) ve *Zoogloea* cinsi dışında üç cinsi daha vardır. Bunlar *Pseudomonas*, *Xanthomonas* ve *Gluconobacter*'dir.



Şekil 1.1 *Z. ramigera* hücresi (Tortora vd.,1989)

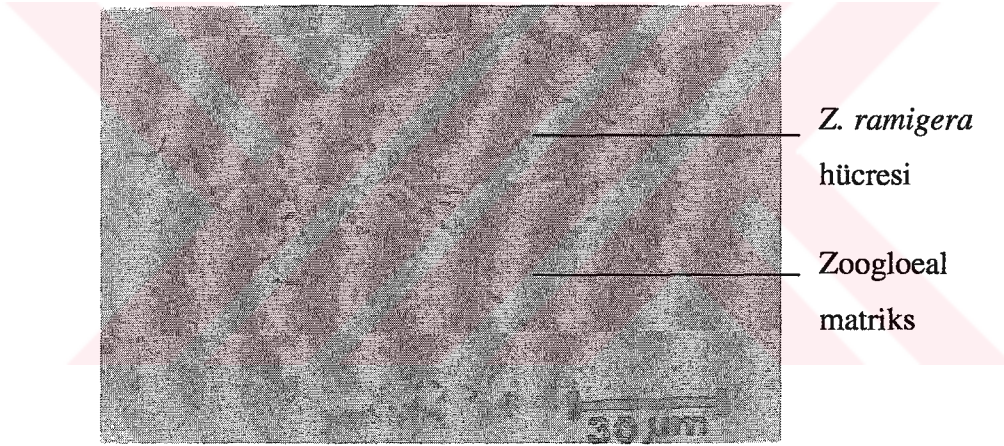
Çizelge 1.1 Bergey'in Sistematik Bakterioloji Kitabına göre *Z. ramigera*'nın sınıflandırılması

|           |                  |
|-----------|------------------|
| Alem      | Procaryotae      |
| Bölüm I   | Gracilicutes     |
| Familya I | Pseudomonadaceae |
| Cins IV   | Zoogloea         |

*Zoogloea* cinsi *Pseudomonadaceae* familyasındaki dört cins içinde en eski bulunmuş olanıdır. İsmi Cohn (1854) tarafından verilmiş ama başlangıçta tanımlanamadığı için yayına kabul edilmemiştir (Zvirbulis ve Hatt, 1967). “Zoogloea” ismi Yunanca’dan gelir ve hayvansal tutkal, hayvan jelatini anlamını taşımaktadır (Dugan vd., 1981b). Yıllar sonra Itzisoohn (1867) doğal ortamında (su ve lağım) rahatlıkla tanımlanabilecek serbestçe yüzen, tipik kümeleşme gösteren, etrafı parmak şeklinde dışarı çıkıntı yapan jelatinimsi matriks ile çevrili, çomak şekilli bakterilere *Zoogloea ramigera* ismini vermiştir (Itzisoohn, 1867; Crabtree ve McCoy,

1967). *Zoogloea* cinsine ait bakterileri, benzer metabolik ve biyokimyasal özelliklere sahip bakterilerden ayırt etmek için kullanılan esas özellik *Zoogloea* bakterilerinin salkım halindeki hücreleri saran bu jelatinimsi matriksdir.

Bu cinsin iki türü vardır: *Z. ramigera* ve *Z. filipedula*. Her iki tür de lağım sularından (Crabtree ve McCoy, 1967; Butterfield vd., 1937; Butterfield vd., 1941; McKinney ve Horwood, 1952), organik maddece zengin oksijenlenmiş sulardan, aktif çamur veya oksidasyon havuzları gibi oksidatif metodlar uygulayan lağım arıtma sistemlerinden izole edilmişlerdir (Dugan vd., 1981b). Her iki tür de hareketsiz kültür koşullarında, kümeden dışarıya parmak şeklinde, dallanmış çıkıntı oluştururlar.



Şekil 1.2 *Z. ramigera* hücreleri ve etraflarını saran polisakkarit tabakası ile kümeleşme oluşumu (Tortora vd., 1989)

Aktive edilmiş çamur sistemlerinde kümeleşme nedeni olduğu kabul edilmektedir (Rosello-Mora vd., 1995). Üreme sonucu hücre kümesi çökerek, göreceli berrak sıvı oluşturur. Zoogloal matriks (Zooglan), bir çok hücreyi saran ve çoğunlukla sıvı besiyerinde kümeleşmiş büyümeyle sonuçlanan kapsüller bir zarftır (Şekil 1.2). Hücre kümesini saran Zoogloal matriks zayıf asidik polisakkaridlerden oluşan (Ikeda vd., 1982) polimer iplikçiklerinin bir bütünüdür (Bush ve Stumm, 1968; Deinema ve Zevenhuizen, 1971;

Finstein, 1969; Friedman ve Dugan, 1968; Friedman vd., 1968; Tago ve Aida, 1977). *Z. ramigera* 115 suşundan elde edilen polisakkarit D-glukoz, D-galaktoz ve purivik asidin 11:3:1.5 oranında birleşmesinden meydana gelmiştir. Küme oluşturan tüm bakteriler, hücre dışına salınan polisakkarit iplikçikleri üretirler. Yalnız küme oluşturan Gram negatif bakterilerin hepsi Şekil 1.2’de görülen karakterde bir Zoogloeal matriks oluşturmazlar.

*Z. ramigera*’nın ürettiği zayıf asidik ve eksi yüklü polisakkaritler, artı yüklü metal iyonlarını adsorplar. Bu yüzden ağır metallerin çok düşük konsantrasyonlarına bile hassastır (Norberg ve Persson, 1984). Kadmiyum en fazla, bu biyopolimerde bulunan purivik asidin karboksil grubu tarafından, hücre duvarında ise sülfidril, hidroksil, fosforil ve karboksil grupları tarafından adsorplanır (Park vd., 1999).

*Escherichia coli*’de *Cad* operonu lizin/kadavrin antiporterı CadB’yi ve lizin dekarboksilaz enzimi CadA’yı kodlayan *cadB* ve *cadA* genlerinden oluşur. Bu operonun anlatımı operonun yukarısında bulunan regülatör protein olan CadC proteinine bağlıdır. Promotör  $p_{cad}$ ’nin ekspresyonu düşük pH, düşük oksijen konsantrasyonu, zengin besi ortamı ve fazla lizin ile indüklenir. Bütün bu sinyaller *cadBA* ekspresyonunu *cadC*-bağımlı yol ile aktive eder (Meng ve Bennett, 1992; Meng ve Bennett, 1992; Neely ve Olson, 1996; Watson vd., 1992). Aynı zamanda *cadC* geni *Staphylococcus aureus* pl258 plazmitinde de bulunur ve kodladığı protein, Cd (II), Pb(II) ve Zn(II) metallerinin hücre dışına atılmasında rol oynayan, hücrenin metale karşı direncini sağlayan ve *cad* operonunun regülasyonundan sorumlu, metale duyarlı bir proteindir (Busenlehner vd., 2002). CadC, ArsR ailesine aittir ve metale bağımlı olarak *cad* operonunu transkripsiyonel repressörüdür (Busenlehner vd., 2001). Ağır metale karşı gösterilen bu direnç, *cad* operonunda bulunan, kadmiyumun hücre dışına atılmasından sorumlu *cadA* geni ve kadmiyuma cevap veren transkripsiyon regülatörü *cadC* geni sayesinde gerçekleşmektedir. CadC proteini beş adet sistein içerir. Üç sistein amino asidi bakiyesinin proteinden çıkarılmasıyla birlikte, hem *in vivo* hem de *in vitro*’da CadC tarafından metale bağımlı regülasyonun kaybolduğu görülmektedir. Bu durum bu üç sistein amino asidi bakiyesinin Cd (II), Pb(II) ve Zn(II)’ye cevap vermesinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Sun vd., 2001)

Bu tez kapsamında, doğal ortamı atık su arıtım sistemleri olan ve burada baskın bir tür olarak bulunan *Z. ramigera*'nın ağır metallere bakır ve kadmiyumu toplama kapasitesi araştırılmıştır. Ağır metalleri polisakkarit tabakasıyla oldukça fazla oranda adsorplama kapasitesi olan *Z. ramigera*'nın bakır ve kadmiyumu, hücre duvarında ve sitosolde ne kadar topladığı incelenmiştir. Bakır ve kadmiyum toplanmasının hücre metabolizmasına bağlı olup olmadığı araştırılmış, kadmiyumun alınımının metabolizmaya bağımlı olduğu düşünüldüğünden, *S. aureus*'ta *cad* operonun düzenlenmesinden sorumlu, metale duyarlı *cadC* geninin *Z. ramigera* genomunda varlığı DIG sistemi ile incelenmiştir.



## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1 Organizmalar ve plazmit

#### 2.1.1 Organizmalar

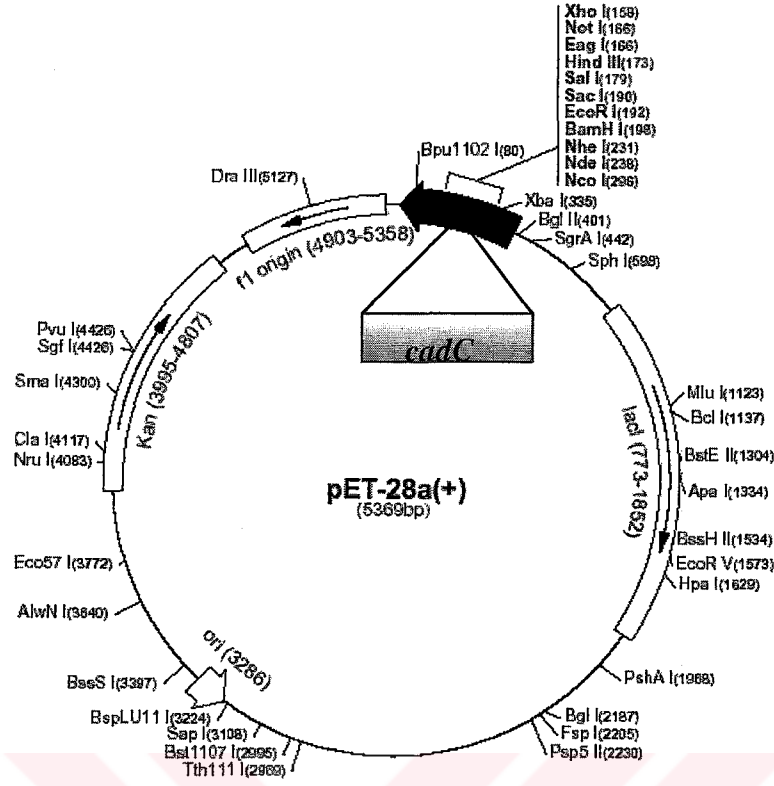
Bu çalışmada *Zoogloea ramigera* DSM 287 suşu kullanılmıştır. Bu suş, Almanya’da bulunan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) şirketinden temin edilmiştir. Plazmit çoğaltılmasında kullanılan *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  suşu Wayne State Üniversitesi, Tıp Fakültesinden, Prof. Dr. Barry Rosen’dan elde edilmiştir. *Z. ramigera* ve *E. coli* ırklarına ait özellikler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan *Z. ramigera* ve *E. coli* ırklarının özellikleri

| İrklar                      | Özellikler                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Z. ramigera</i> DSM 287  | Yabani tip                                                                                                                                                     |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)<br><i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> |

#### 2.1.2 Plazmit

Southern Hibridizasyonu için prob olarak *cadC* geni kullanılmıştır. *S. aureus*’tan izole edilmiş olan bu gen, Wayne State Üniversitesi, Tıp Fakültesinden, Prof. Dr. Barry Rosen tarafından pET 28-a plazmiti içerisinde gönderilmiştir. Plazmitin genetik haritası Şekil 2.1’de verilmiştir. pET-28a plazmitinin taşıdığı *cadC* geni *Xba* I ve *Hind* III enzimlerinin kesim noktalarında bulunmakta ve gen T7*lac* promotörünün kontrolü altındadır.



Şekil 2.1 pET-28a plazmidinin genetik haritası

## 2.2 Kullanılan besiyerleri

Çalışmadaki organizmaların üretilmesinde kullanılan besiyeri içerikleri Çizelge 2.2 [15]; [16] ve 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.2 *Z. ramigera*'nın üretiminde kullanılan besiyeri (pH 7)\*

| İçerik                      | Konsantrasyon (g/l) |
|-----------------------------|---------------------|
| Pepton (Oxoid)              | 5                   |
| Et ekstresi (Mikrobiologie) | 3                   |
| Bacto agar (Difco)          | 15                  |
| (Katı Besiyeri için)        |                     |

\*Besiyeri pH'sı 10 N NaOH ile ayarlandı.

Çizelge 2.3 *E. coli*'nin üretiminde kullanılan besiyeri

| Besiyeri                             | İçerik (g/l)                           |
|--------------------------------------|----------------------------------------|
| “Luria Bertani” sıvı besiyeri (LB)*  | Bacto tryptone (Mikrobiologie) 10 g    |
|                                      | Bacto yeast extract (Mikrobiologie) 5g |
|                                      | NaCl 10 g                              |
| “Luria Bertani” katı besiyeri (LBA)* | LB besiyeri                            |
|                                      | Bacto agar 15 g                        |

\*Rekombinant *E. coli* hücrelerinin seçimi için LB ve LBA besiyerlerine millipore filtre (Schleicher&Schuell, por büyüklüğü: 0.45 µm) ile steril edilmiş kanamisin (35 mg/l) eklendi.

Tüm besiyerleri hazırlandıktan sonra 25 dakika, 121 °C, 1.5 Atm basınç altında otoklavda sterilize edildi.

Ağır metal içeren besiyerleri için 1 M CuCl<sub>2</sub> ve 1 M CdCl<sub>2</sub> stok çözeltileri dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlandı, millipore filtre ile steril edildi. 25 ml’lik besiyerlerinde, çalışılan ağır metal konsantrasyonlarını (Malzeme ve Yöntem 2.6) sağlayabilmek için, stok CuCl<sub>2</sub> çözeltisi 1/10, stok CdCl<sub>2</sub> çözeltisi 1/100 sdH<sub>2</sub>O ile sulandırılarak hem sıvı hem de katı besiyerlerine (Çizelge 2.2) otoklavda sterilizasyondan sonra çalışılan konsantrasyonlarda eklendi.

### 2.3 Organizmaların üretimi ve saklanması

Çalışmalar sırasında kullanılan organizmaların çalışma süresince üretilmesi ve saklanması Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3’de belirtilen besiyerleri kullanıldı.

#### 2.3.1 *Z. ramigera*’nın üretilmesi ve saklanması

DSMZ şirketinden temin edilen liyoflize edilmiş *Z. ramigera* DSM 287’i kültürü, steril ortamda açılarak, 1 ml Çizelge 2.2’de açıklanan sıvı besiyerinde süspanse edildi [17]. Steril pastör pipetle iyice karıştırıldıktan sonra hem katı hem de sıvı besiyerine birer damla inoküle

edildi ve 30 °C'de 2 gün üretildi. Katı besiyerinde üreyen kolonilerden tekrar azaltma yöntemiyle katı besiyerine ekilerek, 30 °C'de 2 gece üremeye bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen hücreler 4 °C'de saklandı. Çalışma süresince kültürler her ay yenilendi.

### 2.3.2 *E. coli* DH5α irkının üretilmesi

%50 gliserol içerisinde -20 °C'de saklanan stok *E. coli* suşundan alınan bir öze dolusu örnek, 5 ml LB (Çizelge 2.3) besiyerinde 37 °C'de 150 devir/dakikada 1 gece üretildi. Elde edilen doymuş kültürler, LBA (Çizelge 2.3) besiyerine aktarıldı ve 37 °C'de 1 gece üremeye bırakıldı. LBA üzerinde üreyen hücreler 4 °C'de saklandı. Çalışma süresince kültürler her ay yenilendi. Rekombinant *E. coli* hücrelerinin seçimi için kanamisin içeren LBA besiyeri kullanıldı.

### 2.4 *Z. ramigera*'nın zamana bağlı üremesinin saptanması

*Z. ramigera* üremesi sırasında kümeleşen bir bakteri olduğundan zamana bağlı olarak üremesinin saptanması için üreyen hücrelerin kuru biyokütlesi saptandı. Bunun için daha önce ekilmiş, üremiş ve +4 °C'de saklanan katı besiyerindeki kültürden tek koloni sıvı besiyerine ekildi, 30 °C'de 90 devir/dakika 2 gece üremeye bırakıldı. Daha sonra bu kültürden 20 ml sıvı besiyeri (Çizelge 2.2) içeren 100 ml'lik erlenlere, besiyerinin % 1 hacmi (200 µl) kadar ekim yapılarak, 30 °C'de 90 devir/dakika üremeye bırakıldı. Bir mikrosantrifüj tüpünün darası alındı ve ekim yapılan kültürden, ekim yapılan hacim kadar ilave edildi. 10000 rpm'de 5 dakika çöktürme işleminden sonra, üst faz atıldı. Tüp tartıldı ve ağzı açık olarak 105 °C'lik etüvde 1 gece, son ağırlığının değişmediği zamana kadar kurutuldu ve tartıldı (Gerhardt vd., 1981). Böylece inoküle edilen hücrelerin kuru biyokütlesi saptanmış oldu.

Belirli zaman aralıklarında kültürler yukarıda anlatılan şekilde toplandı ve kuru biyokütleleri saptandı. Son ağırlıktan tüpün darası çıkarıldığında, zamana bağlı kuru ağırlık olarak hücre sayısındaki değişim saptanmış oldu. Üreme grafiğinin çıkarılması için bu deney iki kez

tekrarlandı.

## 2.5 Generasyon süresinin hesaplanması

Hücrelerin logaritmik üreme sırasında iki katına çıkmaları için gerekli süre olan generasyon süresi ( $S_t$ ), doğal logaritma denklemi kullanılarak hesaplandı.

$$\log \hat{Y} = \log a + b (\log e) X$$

$a$  = Sabit terim       $b$  = Eğim

## 2.6 *Z. ramigera*'nın farklı bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında üreme durumlarının incelenmesi

Bu çalışmada uygulanacak maksimum  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  konsantrasyonları, üremenin tamamen durduğu konsantrasyon olarak belirlendi. *Z. ramigera*'nın 2 günlük katı besiyerindeki kültürlerinden tek koloni, steril besiyeri ile (Çizelge 2.2) sulandırılarak iki ağır metali de içeren katı besiyerlerine ekildi ve üreme gözlemlendi. Buna göre  $\text{CuCl}_2$  için belirlenen konsantrasyonlar 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 0.8, 0.9 ve 1 mM,  $\text{CdCl}_2$  için belirlenen konsantrasyonlar 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40  $\mu\text{M}$ 'dir.  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  besiyerinde birlikte bulunduğu, her iki metal için de kullanılan konsantrasyonlar aynıdır ve bu değerler 0, 0.025 ve 0.05 mM'dır. Saptanan konsantrasyonlarda hem katı hem de sıvı besiyerleri hazırlandı. Yukarıda açıklanan konsantrasyonlarda bakır ve kadmiyum içeren petrilere, 2 günlük ağır metal içermeyen katı besiyerindeki kültürlerden alınan tek koloni,  $10^{-3}$  ve  $10^{-2}$  oranlarında steril besiyeri ile sulandırılarak, bu karışımdan 100'er  $\mu\text{l}$  yayma yöntemi ile ekildi. Petriler 4-6 gün  $30^\circ\text{C}$ 'de üremeye bırakıldı.

Ağır metal içeren sıvı besiyerlerine ekim yapılmadan önce, katı besiyerindeki 2 günlük *Z. ramigera* kültüründen tek koloni alınarak sıvı besiyerine ekildi ve  $30^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcı etüvde (90 devir/dakika), logaritmik fazın ortalarına kadar üretildi. Bu kültürden, 100 ml'lik erlenlerde yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda bakır ve kadmiyum içeren 25 ml sıvı besiyerine 250  $\mu\text{l}$  ekim yapıldı. Kültürler,  $30^\circ\text{C}$ 'de, 90 devir/dakikada çalkalanarak,

logaritmik fazın sonlarına kadar (44 saat) üremeye bırakıldı. Üreme sonunda 25 ml'lik kültürler 4000 rpm'de 30 dakika çöktürüldü. Üst faz tüpte yaklaşık 1 ml kalacak şekilde dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücreler darası alınmış mikrosantrifüj tüplerinde toplandı ve 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı faz dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre biyokütlesi mikrosantrifüj tüpüyle tartıldı. Mikrosantrifüj tüpünün ağırlığı çıkarılarak her ağır metal konsantrasyonunda üremiş hücrelerin yaş ağırlığı saptandı.

## **2.7 *Z. ramigera* tarafından bakır ve kadmiyum alınımının ölçülmesi**

*Z. ramigera*'nın bakır ve kadmiyum içeren ortamdan bakır ve kadmiyumu uzaklaştırma kapasitesi ölçüldü.

Bakır ve kadmiyum toplanmasının *Z. ramigera*'nın metabolizmasına bağlı olup olmadığının anlaşılması için 2.6'da bahsedilen konsantrasyonlarda bakır ve kadmiyum içeren ortamdan, hücre sitosolünde toplanan metal konsantrasyonu tayin edildi

Bakır ve kadmiyum elementlerinin analizinde kullanılan malzemelerden gelebilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla, cam malzemeler önce deterjanlı suda temizlendikten sonra, çeşme suyu ve ardından  $\text{bdH}_2\text{O}$  ile çalkalandı. Bu aşamadan sonra  $\text{bdH}_2\text{O}$  içersinde çözülmüş 1 N HCl çözeltisinde 16 saat bekletildikten sonra  $\text{bdH}_2\text{O}$  iyice çalkalanarak etüvde kurutuldu.

### **2.7.1 *Z. ramigera* biyokütlesi tarafından bakır ve kadmiyum alınımının tayini**

*Z. ramigera* DSM 287 suşu, sıvı besiyerine (Çizelge 2.2), katı besiyerindeki üremiş kültürden tek koloni ekim yapılarak,  $30^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcı etüvde (90 devir/dakika), 2 gün üretildi. 100 ml'lik erlenlerde 2.6'da belirtilen konsantrasyonlarda bakır ve kadmiyum içeren 25 ml sıvı besiyerine hacmin %1'i kadar bu kültürden ekim yapıldı. Kültür,  $30^\circ\text{C}$ 'de, 90 devir/dakikada çalkalanarak, logaritmik fazın sonlarına kadar (44 saat) üremeye bırakıldı. Üreme sonunda 25

ml'lik kültürler 4000 rpm'de 30 dakika çöktürüldü. Üst faz alındı, bakır ve kadmiyum konsantrasyonu Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (Solar, Unicam 929 AA Spectrometer) ile ölçülmek üzere gerekli seyreltmeler yapıldı.

Bakır alınınının tayininde kullanılan stok standart solüsyonu 1000 mg Cu'nun (Sigma) balon jojede son hacmi 1lt olacak şekilde bdH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Bu stok standart solüsyonları değişik oranlarda seyreltilerek 1-2 ve 4 mg/lt'lik konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltileri kullanıldı.

Kadmiyum alınınının tayininde kullanılan stok standart solüsyonu 1000 mg Cd'nin (Pancreac) balon jojede son hacmi 1lt olacak şekilde bdH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek hazırlandı. Bu stok standart solüsyonlar değişik oranlarda seyreltilerek 0.2-0.4-0.8-1 ve 1.6 mg/lt'lik konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiler kullanıldı.

Bakır ve kadmiyum için ölçüm şartları Çizelge 2.4'te verildi.

Çizelge 2.4 Bakır ve kadmiyum miktarlarının ölçümlerinde atomik absorpsiyon spektrofotometresinde kullanılan parametreler

| Element  | Işık Aralığı (nm) | Dalga Boyu (nm) | Alev          | Alev (mg/lt) | Yakıt (lt/dk) | Ölçme Süresi (sn) | Emme Süresi (sn) | Okuma Sayısı |
|----------|-------------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|-------------------|------------------|--------------|
| Bakır    | 0.5               | 324.8           | Hava/Asetilen | 0.041        | 0.8-1.1       | 2                 | 2                | 3            |
| Kadmiyum | 0.5               | 228.8           | Hava/Asetilen | 0.032        | 1-1.3         | 2                 | 2                | 3            |

### 2.7.2 Bakır ve kadmiyumun hücre sitosolüne alınımının tayini

Hücre sitosolünde toplanan bakır ve kadmiyumun tayini için yaş ağırlığı saptanan hücreler bdH<sub>2</sub>O ile süspansiyon haline getirildikten sonra, ultrasonikatörde (Soniprep 150) 12 Micro Amplitude'de, parçalandı. Tüm örnekler bdH<sub>2</sub>O ile aynı hacime tamamlandı ve ortamdan hücre duvarını uzaklaştırmak amacıyla 15000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası sıvı faz temiz bir tüpe alındı ve 2.7.1'de açıklandığı şekilde ve aynı standartlar kullanılarak Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi ile ölçüldü.

## 2.8 Digoksinin (DIG) sistemi ile Southern Hibridizasyonu

DNA, RNA ve oligonükleotidlerin işaretlenerek tek gen kopyalarının belirlenmesi amacıyla geliştirilen Digoksinin (DIG) sisteminin temelini, pek çok alanda yaygın biçimde kullanılan immunolojik analizler oluşturur.

Bu çalışmada *E. coli* DH5 $\alpha$  suşunun içerdği pET-28a plazmitinde bulunan *cadC* geni prob olarak kullanılmış ve *Z. ramigera*'nın genomunda *cadC* geninin varlığı DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer Mannheim, Kat. No: 1093657) kullanılarak analiz edilmiştir.

### 2.8.1 Southern hibridizasyonu için *Z. ramigera* genomik DNA'sının hazırlanması

#### 2.8.1.1 *Zoogloea ramigera*'dan genomik DNA izolasyonu

*Z. ramigera*'dan genomik DNA, Ausubel vd.'nin (1995) geliştirdikleri yöntemde değişiklikler yapılarak izole edildi.

- 50 ml sıvı besiyerine (Çizelge 2.2), 2 günlük kültürden tek koloniden ekim yapıldı. 90 devir/dakikada, 30<sup>0</sup>C'de, 2 gece boyunca üretildi.
- 50 ml'lik kültür 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- Çöktürme işleminden sonra, üst faz atıldı. Çökelti 18 ml TE (Çizelge 2.5) içersinde çözüldü ve tekrar 4000 rpm'de, 30 dakika çöktürüldü.
- Üst faz atıldı, pellet halindeki hücreler 18 ml TE'de çözüldü ve üzerine 1 ml % 10 SDS (w/v) eklendi, tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- Süspansiyon 37<sup>0</sup>C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun sonunda, süspansiyona 3 ml 5 M NaCl eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- Bu karışımın üzerine 3 ml CTAB/NaCl karışımı (Çizelge 2.5) eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.

- Daha sonra 65 °C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- Süspansiyona 23 ml kloroform/izoamil alkol (25:1) karışımı eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 10000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü.
- Çöktürme işleminin ardından üst faz temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 23 ml fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) karışımı eklendi. Tüp alt üst edildi.
- 10000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz alınarak temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 23 ml kloroform/izoamil alkol (25:1) eklendi.
- 10000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz yeniden temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 600 µl izopropanol eklendi. Tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 10000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü.
- Çöktürme işleminin ardından üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve çökelmiş DNA'yı tuzdan uzaklaştırmak amacıyla 1 ml 4 °C'de soğutulmuş % 70'lik EtOH eklendi.
- 10000 rpm'de 1 dakika çöktürüldü.
- Üst faz uzaklaştırıldı. Pellet halindeki örnek oda sıcaklığında kurutuldu.
- DNA çökeltisi 100 µl TE'de çözüldü.
- Ortamdan RNA'yı uzaklaştırmak için son konsantrasyon 20 µg/ml olacak şekilde 4µl RNaz eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra parçalanmış RNA'ları ve RNaz'ı uzaklaştırmak için bu karışımın üzerine 200 µl (2 x hacim) fenol eklendi, alt üst edilerek karıştırıldı.
- 13000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü.
- Çöktürme sonucu genom DNA'sının bulunduğu üst faz ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak, 200 µl kloroform/izoamil alkol (25:1) karışımı eklenerek 30 saniye

vorteks yapıldı.

- 13000 rpm'de 5 dakika çöktürme işleminin ardından, üst faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak, 15 µl (hacmin 1/10'u kadar) 3 M NaAc eklendi, iyice karıştırıldı.
- Bu karışım üzerine 375 µl (hacmin 2.5 katı kadar) -20 °C'de soğutulmuş % 100 EtOH eklenerek, 16 saat -20 °C'de bekletildi.
- Süre sonunda 4 °C, 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz atıldıktan sonra, çökelti üzerine 500 µl 4 °C'de soğutulmuş % 70 EtOH (v/v) eklendi, DNA çökeltisinin çözünmemesine dikkat ederek, tüp birkaç kez alt üst edildi.
- 4 °C'de 13000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü.
- Alkol fazı dikkatlice uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında kurutuldu.
- Daha sonra 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) içerisinde çözüldü.

Çizelge 2.5 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

| Tampon ve Çözeltiler           | İçerik                          |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Tris-EDTA (TE) tamponu (pH 8)* | Tris-HCl 10 mM                  |
|                                | EDTA (Carlo Erba Reagenti) 1 mM |
| CTAB/NaCl                      | CTAB (Sigma) %20 (w/v)          |
|                                | NaCl 0.7 M                      |

\* Tampon hazırlandıktan sonra 25 dakika, 121 °C, 1.5 Atm basınç altında otoklavlandı.

### 2.8.1.2 DNA miktarı ve saflığının tayini

*Z. ramigera*'dan izole edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflığının tayininde spektral yöntem kullanıldı. TE ile 1/500 oranında sulandırılan örneklerdeki DNA miktarı aşağıda gösterilen formül kullanılarak hesaplandı (Maniatis vd., 1982). 1 OD, çift iplikli DNA için 50µg/ml'ye karşılık gelmektedir.

DNA konsantrasyonu (µg/ml) = OD<sub>260</sub> x 50 x sulandırım oranı

DNA molekülünün saflığı, 260 nm dalga boyundaki absorbans değerinin 280 nm dalga

boyundaki absorbans değerine oranına göre belirlendi. Miktarı belirlenen DNA mikrosantrifüj tüplere aktarıldı, bazıları stok olarak uzun süre saklamak için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de, agaroz jele yüklenecek örnekler  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 2.8.1.3 Agaroz jel hazırlanışı ve DNA'nın elektroforezi

Genomik DNA'nın elektroforetik analizi için % 0.8 (w/v) konsantrasyonunda agaroz jel kullanıldı. % 0.8'lik agaroz içeren 1X TAE (Çizelge 2.6) tamponu, agarozun erimesi için 2 dakika mikrodalga fırında eritildi. Isısı  $50-55^{\circ}\text{C}$ 'ye düştüğünde, DNA'nın UV altında görülmesini sağlayan, son konsantrasyonu  $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde EtBr (Çizelge 2.6) eklendi. Jel karışımı, yatay elektroforez kasetine döküldü ve polimerize olması beklendi. Polimerizasyon sonrası tankın içerisine yerleştirilen jele örnek DNA'lar yüklendi. Yükleme yapılmadan önce örnek DNA'ların jel kuyularına çökmesini sağlamak için 1 X yükleme boyası (Çizelge 2.6) ile iyice karışması sağlandı. Aynı zamanda jele sonuçların analizi için boyutu bilinen *EcoR* I ve *Hind* III enzimleriyle kesilmiş  $\lambda$  DNA'sı da (Fermentas) yüklendi. Elektroforez işlemi 1 X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankında (Biogen) yaklaşık 1.5 saat  $60\text{ V}$  akımda gerçekleştirildi. Elektroforez sonuçları, jellerin kameralı transillüminatörde ( UVI tec, UVI Pro, BTS-20-M)  $312\text{ nm}$  UV ışık altında gözlenerek, fotoğrafları bilgisayara aktarıldı.

Çizelge 2.6 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

| Tampon ve Çözeltiler                                            | İçerik                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Tris-asetat (TAE) tamponu (5 X)*<br>(Toplam 1 litre hacim için) | Trizma Base (Sigma) 24.2 g<br>Glasiyel asetik asit 5.71 ml<br>0.5 M EDTA (pH 8) 10 ml |
| Yükleme Tamponu (6 X)**                                         | Bromo Fenol Mavisi %0.25<br>Sukroz %40 (w/v)                                          |
| Etidium Bromid (EtBr)                                           | Etidium Bromid 5 mg/ml                                                                |

\* TAE hazırlandıktan sonra 25 dakika,  $121^{\circ}\text{C}$ , 1.5 Atm basınç altında otoklavlandı.

\*\* Yükleme tamponu hazırlandıktan sonra  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### 2.8.1.4 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

İzole edilmiş genomik DNA, probun tamamlayıcısı olduğu dizileri tanıyıp bağlanabilmesini kolaylaştırmak için, *Hinc* II (Promega), *Hind* III (Fermentas), *Pvu* II (Promega), *EcoR* I (Promega), *Sal* I (Promega), *Xho* I (Promega) restriksiyon enzimleri ile kesime maruz bırakıldı. Her enzim reaksiyonu için 10 µg genomik DNA kullanıldı.

Çizelge 2.7 Restriksiyon enzimlerinin konsantrasyonları ve birlikte kullanılan tamponlar

| Restriksiyon Enzimleri ve Konsantrasyonları | Enzim Tamponu                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Hinc</i> II (10 U/µl)                    | Multicore Tamponu (Fermentas) |
| <i>Hind</i> III (10 U/µl)                   | E Tamponu (Promega)           |
| <i>Pvu</i> II (10 U/µl)                     | B Tamponu (Promega)           |
| <i>EcoR</i> I (10 U/µl)                     | H Tamponu (Promega)           |
| <i>Sal</i> I (10 U/µl)                      | D Tamponu (Promega)           |
| <i>Xho</i> I (10 U/µl)                      | D Tamponu (Promega)           |

Çizelge 2.8 Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

|                    |       |
|--------------------|-------|
| DNA                | 2 µl  |
| sdH <sub>2</sub> O | 15 µl |
| Enzim Tamponu      | 2 µl  |
| Enzim              | 1 µl  |
| Toplam Hacim       | 20 µl |

Her enzim kesim reaksiyonu için, bir mikrosantrifüj tüpüne Çizelge 2.8'de belirtilen sırada maddeler eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Kesim reaksiyonu sonucu oluşan kesim ürünleri, pozitif kontrol olarak *cadC* genini içeren pET-28a plazmiti ve negatif kontrol olarak da *EcoR* I, *Hind* III enzimleriyle kesilmiş λ DNA'sı %1'lik agaroz jele yüklenerek 1.5 saat 60 V akımda ayrıldı.

### 2.8.1.5 Southern blotting

2.8.1.4'de açıklandığı gibi restriksiyon enzimleriyle kesime maruz bırakılan *Z. ramigera*'nın genomik DNA'sı ile birlikte pET-28a plazmiti ve standart  $\lambda$  DNA'sı %1'lik Agaroz Jel Elektroforezinde ayrıldıktan sonra Southern Blotting yöntemi ile Zeta-Probe membrana (Biorad) transfer edildi. Southern blotting için (Maniatis vd., 1982)'de açıklanan yöntem değiştirilerek uygulandı;

- Elektroforez sonrası, jel kendi boyutlarına uygun bir kaba alındı ve üzerini örtecek şekilde 0.25 N HCl çözeltisi içinde 15 dakika çalkalandı.
- Süre sonunda kabın içerisindeki çözelti döküldü ve denatürasyon tamponu ilave edildi. Jel, denatürasyon tamponunda (Çizelge 2.9) 2 kez 15'er dakika çalkalandı.
- Denatürasyon tamponu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, jel 2 kez 15'er dakika 0.5 M Tris-HCl (pH 7), 3 M NaCl çözeltisi içerisinde çalkalandı.
- Bu aşamanın ardından jel, sdH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve gereksiz parçaları kesildi.
- Jelin kenarlarından 2'er cm fazla olacak şekilde 4 adet 3MM filtre kağıdı (Whatman) kesildi.
- DNA'ların transfer edileceği Zeta-Probe membranı jelin kenarlarından 1'er cm fazla olacak şekilde kesildi.
- Zeta-Probe membranı ve filtre kağıtları 20 X SSPE (Çizelge 2.9) çözeltisi ile doyurulacak şekilde ıslatıldı.
- Bir sünger kalıbı geniş bir kaba yerleştirildi, üzerine 500 ml 20 X SSPE tamponu eklendi. Süngerin hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde tamponu iyice emmesi sağlandı.
- Sünger üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde 2 adet 20 X SSPE ile ıslatılmış 3MM filtre kağıdı yerleştirildi.
- DNA'ların yüklendiği taraf üst yüzeyde olacak şekilde 3MM filtre kağıtlarının üzerine jel yerleştirildi.
- Jelin üzerine 20 X SSPE ile ıslatılmış Zeta-Probe membranı ve tekrar iki kat 3MM

filtre kağıdı hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi.

- Süngerin açıkta kalan kısımları parafilm ile kapatıldı ve 3 MM filtre kağıtlarının üzerine havlu kağıtlardan hazırlanan kalın bir parça eklenip, üzerine cam bir plaka yerleştirildi. Onun da üzerine kabın yüksekliğine denk gelecek şekilde bir ağırlık yerleştirildi ve gece boyu transferin gerçekleşmesi için oda sıcaklığında bekletildi.
- Ertesi gün membran çıkarıldı ve DNA parçalarını sabitlemek için membran UV ışık (Bio-rad GS Gene linker, C1 programı, 50 mJoule), altında kurutuldu.

Çizelge 2.9 Southern blotting için kullanılan tampon ve çözeltiler \*

| Tampon ve Çözeltiler | İçerik                                  |
|----------------------|-----------------------------------------|
| Denatürasyon Tamponu | NaOH 0.5 M                              |
|                      | NaCl 1 M                                |
| 20 X SSPE            | NaCl 3M                                 |
|                      | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM |
|                      | pH 7.4                                  |
|                      | EDTA 20 mM                              |

\* Tablodaki tampon ve çözeltiler sdH<sub>2</sub>O ile hazırlanmıştır.

## 2.8.2 Southern hibridizasyonu için prob hazırlanması

### 2.8.2.1 Plazmit izolasyonu

*E. coli* DH5α suşundan Kaynama Metodu (Hot Boiling Method) (Holmes ve Quigley, 1981) değiştirilerek pET-28a plazmiti izole edildi.

- pET-28a plazmitinde bulunan kanamisin direnç genine göre bu plazmiti taşıyan kolonilerden rastgele seçilen bir tanesi 3 ml kanamisinli LB (Çizelge 2.3) besiyerine ekildi, 150 devir/dakika, 37 °C'de 1 gece inkübe edildi.
- Üreme sonunda hücreler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- Üst faz tüpte bir miktar LB kalacak şekilde döküldü. Tüp vorteksenerek, karıştırıldı.

- 350 µl STET (Çizelge 2.10) ve 20 µl lizozim (Çizelge 2.10) eklendi, hafifçe karıştırılarak 5 dakika buzda inkübe edildi.
- Ardından 1 dakika kaynayan suda inkübe edildi.
- Süre sonunda tüp, 5 dakika buzda inkübe edildi.
- 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda oluşan jelatinimsi pellet steril kürdan ile uzaklaştırıldı.
- Sıvı faza 200 µl 4 M NH<sub>4</sub>Ac ve mikrosantrifüj tüpünü dolduruncaya kadar soğuk isopropanol eklendi. Tüp vortekslenerek karıştırıldı ve -20 °C'de 1 gece inkübe edildi.
- Ertesi gün 13000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı faz uzaklaştırıldı, 500 µl %70 EtOH (v/v) eklendi.
- 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı faz dikkatlice ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında kurutuldu.
- Pellet 25 µl TE'de çözüldü.

Çizelge 2.10 Kaynama metoduyla yapılan plazmit izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

| Tampon ve Çözeltiler                      | İçerik                           |
|-------------------------------------------|----------------------------------|
| STET                                      | Sukroz (Fluka) %8 (w/v)          |
|                                           | EDTA (pH 8) 50 mM                |
|                                           | Tris-HCl (pH 8) 10 mM            |
|                                           | Triton X-100* (Sigma) %0.5 (v/v) |
| Lizozim (250 mM Tris-HCl (pH 7.5) içinde) | Lizozim 20 mg/ml                 |

\* Triton X-100, 25 dakika, 121 °C, 1.5 Atm basınç altında otoklavlandıktan sonra eklendi.

### 2.8.2.2 Plazmit kesimi

İzolasyon sonrası, pET-28a plazmitinin içerdiği *cadC* genini elde etmek için, plazmit *Xba* I (10 Unite/ $\mu$ l) (Promega) ve *Hind* III (10 Unite/ $\mu$ l) (Fermentas) enzimleriyle kesime maruz bırakıldı.

Çizelge 2.11 Plazmit DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>DNA</b>                 | 8 $\mu$ l  |
| <b>sdH<sub>2</sub>O</b>    | 6 $\mu$ l  |
| <b>D Tamponu (Promega)</b> | 2 $\mu$ l  |
| <b>E Tamponu (Promega)</b> | 2 $\mu$ l  |
| <b><i>Xba</i>I*</b>        | 1 $\mu$ l  |
| <b><i>Hind</i> III**</b>   | 1 $\mu$ l  |
| <b>Toplam Hacim</b>        | 20 $\mu$ l |

\* *Xba* I enzimi için D tamponu kullanılmıştır.

\*\* *Hind* III enzimi için E tamponu kullanılmıştır.

Enzim reaksiyonu için bir mikrosantrifüj tüpüne, Çizelge 2.11'deki maddeler çizelgede belirtilen sırada eklendi, ve 37 °C'lik su banyosunda 2 saat inkübe edildi.

Kesilen plazmit DNA'sında *cadC* genini ayırıp izole edebilmek için elektroforetik analiz yapıldı. Geni, jelden geri kazanırken DNA'nın bozulmasını önlemek amacıyla NuSieve (düşük erime sıcaklığına sahip) agaroz (FMC NuSieve GTG) kullanıldı. Elektroforetik analiz için final konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde NuSieve agaroz 1 X TAE içinde, ısıtılarak eritildi. Eritilen agaroz, ısısı 50-55 °C'ye düştüğünde, son konsantrasyonu 0.5  $\mu$ g/ml olacak şekilde EtBr ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan jel, yatay elektroforez kasetine döküldü ve polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra 1 X TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Kesime maruz bırakılmış plazmit DNA'sının jele yüklenmesi sırasında DNA'nın jel kuyularına çökmesini sağlamak üzere, örneklerin bulunduğu tüplere, Çizelge 2.6'da belirtilen 1 X yükleme tamponu eklenerek iyice karışması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan örnekler ile birlikte standart olarak, 1 kb DNA Ladder'ı

(Promega) yüklendi. Jele uygulanan DNA'lar 70 V/50 mA elektrik akımında 1-1.5 saat yürütüldü. Elektroforez sonucu transillüminatörde 312 nm UV ışık altında gözlenerek, fotoğrafları bilgisayara aktarıldı.

### 2.8.2.3 Agaroz jelden DNA'nın geri kazanımı

*CadC* geninin jelden geri kazanılmasında Weislander (1979) ve Parker ve Seed (1980)' nin açıkladığı yöntem değiştirilerek kullanıldı.

- Jelde genin bulunduğu bölge steril bistüri ile kesilip alındı ve bir mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Üzerine 100 µl TE (Çizelge 2.5) eklendi.
- 65 °C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek, geni içeren jel parçası eritildi.
- Karışım oda sıcaklığına gelince üzerine 0.1 M Tris-HCl (pH 8) ile doyurulmuş eşit hacim (100 µl) fenol eklendi, vortekslenerek karıştırıldı. 65 °C'lik su banyosunda 1 dakika bekletildi.
- 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra, üst sıvı faz temiz bir tüpe aktarıldı.
- Tüpün içerisindeki alt faza 100 µl TE eklendi, tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra, üstteki sıvı faz, bir önceki faza eklendi.
- Oda sıcaklığında 200 µl fenol eklendi, alt üst edilerek karıştırdı ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı faz temiz bir tüpe aktarıldı ve 200 µl kloroform/izoamil (25:1) alkol karışımı eklendi.
- 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı faz temiz bir tüpe aktarıldı ve hacmin 1/10'u kadar 3 M NaAc pH 6, ve 1/25 hacim kadar -20 °C'de soğutulmuş % 100 EtOH eklendi.
- -20 °C'de 1 saat bekletildi.
- 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz atıldı. 500 µl %70 EtOH (v/v) eklendi, 5 dakika 10000 rpm’de santrifügasyon ile çöktürüldü.
- EtOH uzaklaştırıldı, DNA pelleti oda sıcaklığında kurutuldu.
- Çökelti 10 µl TE içerisinde çözülde, daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 4 °C’de saklandı.

#### 2.8.2.4 Jelden geri kazanılmış *cadC* genine ait DNA’nın konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesi

Saflaştırılan *cadC* geninin miktar ve saflığı 2.8.1.2’de açıklandığı şekilde spektrofotometrik ölçüm yapılarak analiz edildi.

#### 2.8.2.5 Proben hazırlanması ve kontrolü

*E. coli* DH5α suşunun içerdığı pET-28a plazmitinden kesilen *cadC* geni, DIG işaretli hibridizasyon problemlerinin hazırlanmasında kalıp olarak kullanıldı.

Prob hazırlamakta kullanılacak olan kalıp DNA’nın, son derece saf olması gerektiği için, gen önce düşük erime noktalı agaroz jel elektroforezinde ayrıldı (2.8.2.2) daha sonra da jelden geri izole edildi (2.8.2.3). Bu şekilde elde edilen *cadC* geni, aşağıdaki prosedürün uygulanmasıyla DIG ile işaretli probun sentezinde kullanıldı.

İşaretli probun sentezi için 1000 ng DNA kullanıldı. DNA’nın denatürasyonu için tüp, 100 °C’lik su banyosunda 10 dakika bekletildi ve hemen ardından buza alınıp 2 µl hekzanükleotid karışımı 10 X (Çizelge 2.12), 2 µl dNTP karışımı (Çizelge 2.12), ve 1 µl Klenow enzimi (Çizelge 2.12) ilave edildi. Böylece reaksiyon hacmi 20 µl’ye tamamlandı ve DIG işaretli problemlerin sentezlenmesi amacıyla tüpler 16 saat 37 °C’deki su banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak için 2 µl 0.2M EDTA (pH 8) ilave edildi ve 65 °C’lik

su banyosunda 10 dakika bekletildi.

Çizelge 2.12 Prob hazırlanmasında kullanılan bileşikler\*

| Bileşik                   | İçeriği                                                   | Konsantrasyon  |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|
| Hekzanükleotid Karışımı   | Random Hekzanükleotidler                                  | 6.25 A260 U/ml |
|                           | Tris-HCl                                                  | 50 mM          |
|                           | MgCl <sub>2</sub>                                         | 10 mM          |
|                           | Dithioerythritol (DTE)                                    | 0.1 mM         |
|                           | BSA (pH 7.2)                                              | 0.2 mg/ml      |
| dNTP Karışımı             | dATP                                                      | 0.1 mM         |
|                           | dCTP                                                      | 0.1 mM         |
|                           | dGTP                                                      | 0.1 mM         |
|                           | dTTP                                                      | 0.065 mM       |
|                           | DIG-11-dUTP                                               | 0.035 mM       |
| Klenow Enzimi             | <i>E. coli</i> DNA Polimeraz<br>enziminin büyük altbirimi | 100 U/μl       |
| İşaretlenmiş Kontrol DNA  | DIG ile işaretlenmiş<br>pBR328 plazmiti                   | 5.2 ng/μl      |
| DNA Sulandırma<br>Tamponu | Ringa balığı Sperm DNA'sı                                 | 50μg/ml        |
|                           | Tris-HCl                                                  | 10 mM          |
|                           | EDTA (pH 8)                                               | 1 mM           |

\* Bu Çizelgedeki tüm çözelti, enzim ve tamponlar DIG DNA Labelling and Detection Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Sentezlenen *cadC* genine ait probun, DIG ile işaretli olduğunu kanıtlamak üzere kontrol deneyi yapıldı. Bunun için sentezlemiş olduğumuz *cadC* gen probundan ve işaretlendiğini kontrol etmek amacıyla DIG DNA Labelling and Detection Kit içerisinde hazır bulunan işaretlenmiş kontrol DNA'dan Çizelge 2.13'deki gibi ayrı ayrı sulandırma serileri hazırlandı.

Çizelge 2.13 Sulandırma serileri

| Tüp no | DNA (µl) | # no'lu Tüpten | DNA Sulandırma Tamponu (µl) | Sulandırma | Son Konsantrasyon |
|--------|----------|----------------|-----------------------------|------------|-------------------|
| 1      |          | -              | -                           | -          | 1 ng/µl           |
| 2      | 5        | 1              | 495                         | 1:100      | 10 pg/µl          |
| 3      | 15       | 2              | 35                          | 1:3.3      | 3 pg/µl           |
| 4      | 5        | 2              | 45                          | 1:10       | 1 pg/µl           |
| 5      | 5        | 3              | 45                          | 1:10       | 0.3 pg/µl         |
| 6      | 5        | 4              | 45                          | 1:10       | 0.1 pg/µl         |
| 7      | 5        | 5              | 45                          | 1:10       | 0.03 pg/µl        |
| 8      | 5        | 6              | 45                          | 1:10       | 0.01 pg/µl        |
| 9      | 0        | -              | 50                          | -          | 0                 |

Hem hazırlanan *cadC* genin probu ve hem de kit içinde bulunan kontrol probdan Çizelge 2.13'de gösterildiği gibi hazırlanan sulandırma serileri, Zeta-Probe membrana 1'er µl'lik noktalar halinde uygulandı. DNA'ların membrana sabitlenmesi için membran UV ışık altında bekletilerek kurutuldu. Daha sonra membran, içerisinde 20 ml maleik asit tamponu (Çizelge 2.14) bulunan plastik bir taşıyıcıya aktarıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. Süre sonunda maleik asit tamponu ortamdan uzaklaştırılarak, membran 30 dakika 10 ml bloklama solüsyonunda 1 X (Çizelge 2.14) inkübe edildi. Bu işlemten sonra bloklama solüsyonu dökülerek, membran 30 dakika antikor solüsyonunda bekletildi. Bu aşama sonunda, antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırılarak, membran 2 kez 15'er dakika yıkama tamponuyla çalkalanarak yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra, membran 2-5 dakika kadar deteksiyon tamponunda dengelendi. Daha sonra renk-substrat solüsyonunda, karanlıkta çalkalanmadan bekletildi. 30 dakika içinde renklenme başladı. Renklenme oluştuktan sonra renk-substrat solüsyonu uzaklaştırıldı ve membranı kaplayacak şekilde TE eklendi. Çalkalama yapılarak reaksiyon durduruldu.

### 2.8.3 Ön hibridizasyon

Hibridizasyon sırasında probun, genomik DNA üzerinde özgül olmayan bölgelere bağlanarak yanıltıcı sonuçlar vermesini önlemek amacıyla, örneklerin transfer edildiği membran, öncelikle ön hibridizasyon işlemine tabi tutuldu.

Ön hibridizasyon işlemi; ısıya dayanıklı ve ağzı kapaklı hibridizasyon tüpüne yerleştirilen membranın üzerine, Çizelge 2.14’de belirtilen önceden 50 °C’ye ısıtılmış 20 ml hibridizasyon standart solüsyonu eklenerek, 50 °C’de çalışan hibridizasyon etüvünde 30 dakika inkübe edilmesiyle yapıldı.

### 2.8.4 Hibridizasyon

Prob olarak kullanılan DIG işaretli DNA parçasının, kesime maruz bırakılmış genomik DNA dizileri üzerindeki tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanmasını sağlamak amacıyla Southern hibridizasyonu yapıldı.

- Ön hibridizasyonun bitmesine 10 dakika kala, 17 µl prob (25 ng/ml) 5 dakika boyunca kaynar suda tutmak suretiyle denatüre edildi.
- Ardından tüp buza alındı ve 4 ml önceden 48 °C’ye ısıtılan hibridizasyon standart solüsyonu içerisine eklendi. Bu arada membranı doyuran solüsyon dökülerek, elde ettiğimiz prob-hibridizasyon solüsyonu membranın bulunduğu şişeye eklendi ve membran gece boyu hafifçe çalkalandı.
- Ertesi gün probu içeren hibridizasyon standart solüsyonu döküldü ve membran oda sıcaklığındaki hibridizasyon sonrası yıkama solüsyonu I içinde 20 °C’de ve 2 kez 5’er dakika sabit bir çalkalama ile 1. yıkama yapıldı.
- Kabın içerisindeki solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra hibridizasyon sonrası yıkama solüsyonu II ile 68 °C’de, 2 kez 15’er dakika sabit bir çalkalama ile 2. yıkama yapıldı.

### 2.8.5 İmmunolojik belirleme

Bu aşamada hibridize olan probun yapısında bulunan, DIG-11-dUTP'lerin taşıdığı digoksinine özgül anti-digoksinin antikoru ortama ilave edildi. Antikora bağlı alkalın fosfotaz enziminin, uygun substratlar varlığında renk oluşturması ile *cadC* geninin varlığı incelendi.

İmmunolojik belirleme sürecinde, yapılan tüm inkübasyon işlemleri oda sıcaklığında yavaşça karıştırılarak yapıldı.

- Membran 5 dakika yıkama tamponunda (Çizelge 2.14) çalkalandı.
- Yıkama tamponu ortamdaki uzaklaştırılarak, 50 ml bloklama solüsyonu (Çizelge 2.14) ilave edildi ve 30 dakika hafifçe çalkalandı.
- Bloklama solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra antikor solüsyonu (Çizelge 2.14) ilave edilerek 30 dakika hafifçe çalkalandı.
- 2 kez 15'er dakika yıkama tamponunda (Çizelge 2.14) yıkama yapıldı.
- 5 dakika deteksiyon tamponunda ekilibrasyon yapıldı.
- Membran taze hazırlanmış renk-substrat solüsyonunda, uygun bir taşıyıcı içerisinde ve karanlıkta karıştırılmadan 16 saat inkübe edildi.

16 saat sonunda reaksiyonu durdurmak için, membran 50 ml TE tamponunda 5 dakika yıkanarak oda sıcaklığında iki filtre kağıdı arasında kurutuldu ve saklandı.

Çizelge 2.14 DIG sisteminde kullanılan tampon ve çözeltiler

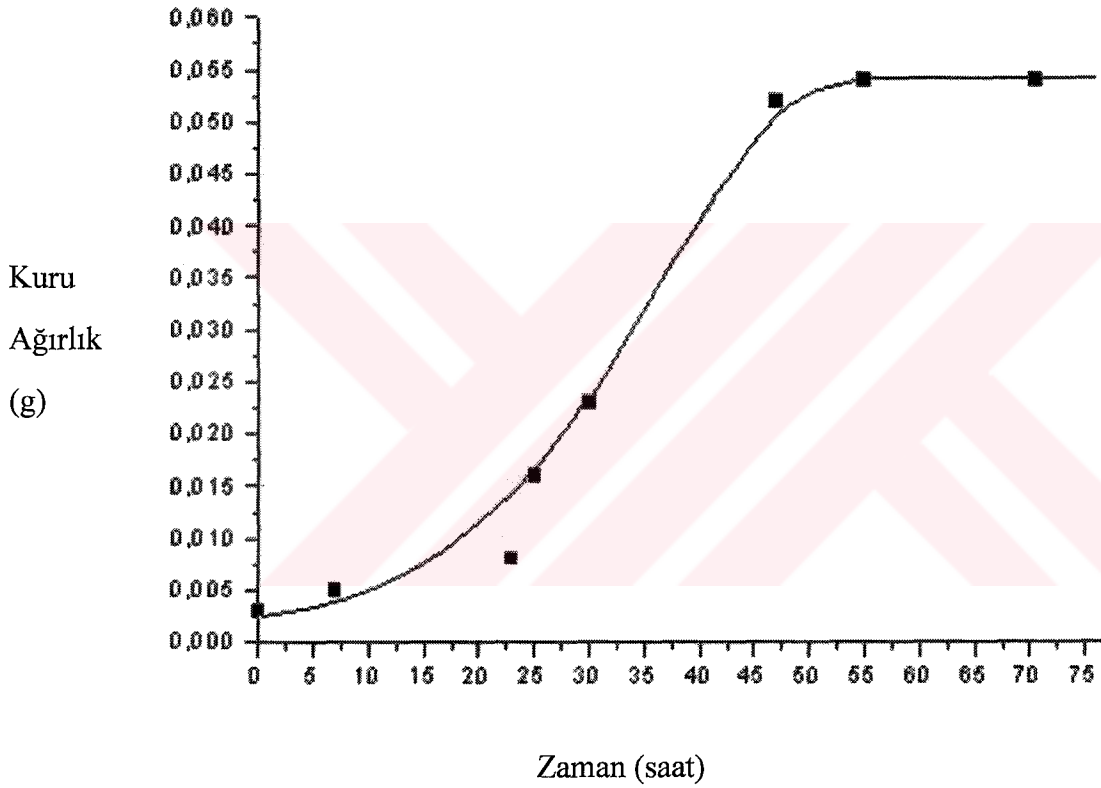
| Tampon ve Çözeltiler                          | İçerik                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Maleik Asit Tamponu *                         | Maleik Asit 0.1 M<br>NaCl 0.15 M<br>pH 10 N NaOH ile 7.5'a ayarlandı.                                                                     |
| Bloklama Solüsyonu 10 X*                      | Bloklama maddesi 1 g<br>Maleik Asit Tamponu 10 ml<br>Gerekli sulandırım maleik asit tamponu ile yapıldı.                                  |
| Antikor Solüsyonu                             | Anti-DIG-AP kullanılmadan önce 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve 150 mU/ml olacak şekilde bloklama solüsyonu içinde dilue edildi. |
| Yıkama Tamponu *                              | Maleik Asit 0.1 M<br>NaCl 0.15 M<br>pH 7.5 (20 °C)<br>Tween 20 %0.3 (v/v)                                                                 |
| Deteksiyon Tamponu *                          | Tris-HCl 0.1 M<br>NaCl 0.1M<br>pH 9.5 (20 °C)                                                                                             |
| Renk-Substrat Solüsyonu                       | NBT/BCIP 40 µl<br>Deteksiyon Tamponu 2ml                                                                                                  |
| Hibridizasyon Standart Solüsyonu*<br>(pH 7.2) | EDTA 1 mM<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M<br>SDS %7                                                                             |
| 10 X SSC (pH 7)*                              | NaCl 1.5 M<br>Na-sitrat 0.15 M                                                                                                            |
| Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu I      | SSC 2 X<br>SDS %0.1                                                                                                                       |
| Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu II     | SSC 0.5 X<br>SDS %0.1                                                                                                                     |

\* Solüsyonlar sdH<sub>2</sub>O ile hazırlandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 *Z. ramigera*'nın zamana bağılı üremesinin saptanması

Üreyen hücreler Malzeme ve Yöntem 2.4'de açıklandığı gibi belirli saatlerde toplanarak kuru biyokütle hesaplandı ve buna göre *Z. ramigera*'nın zamana bağılı üreme grafiğı çıkarıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Zoogloea ramigera*'nın zamana bağılı üreme grafiğı

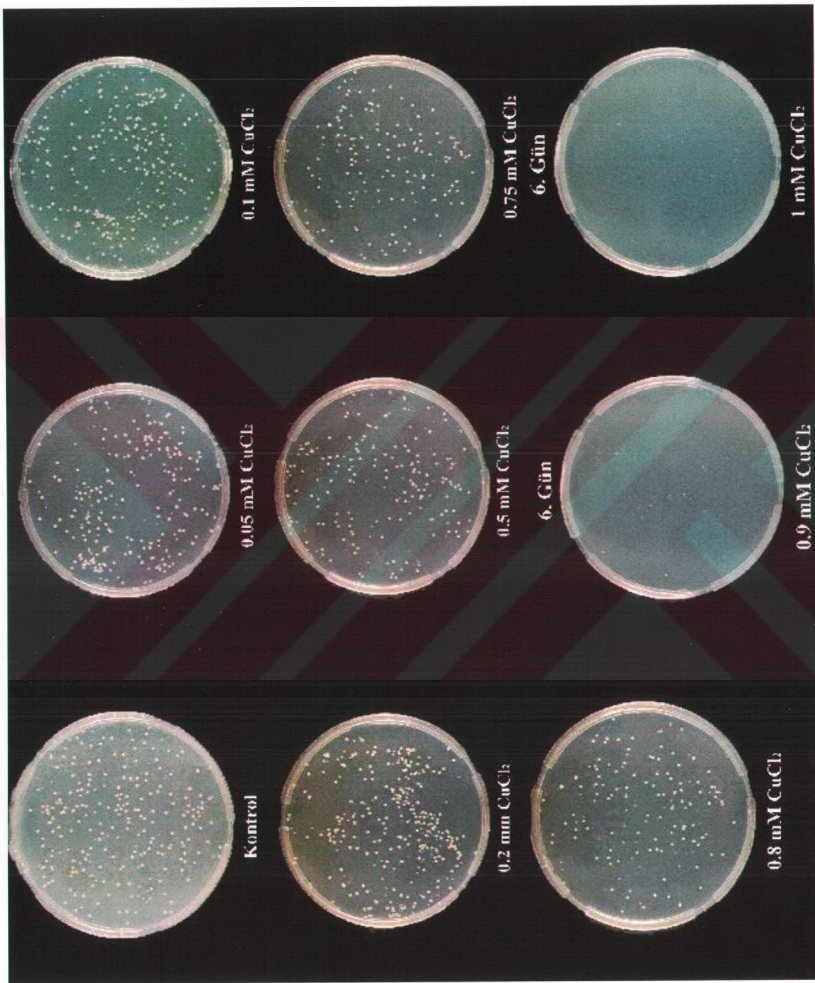
Bu grafiğı göre 0- 23. saatler arası lag fazda olan üreme, bu saatten itibaren 47. saate kadar log fazında, 47. saatten itibaren de durağan faza girmiştir.

### 3.2 *Z. ramigera*'nın generasyon süresinin hesaplanması

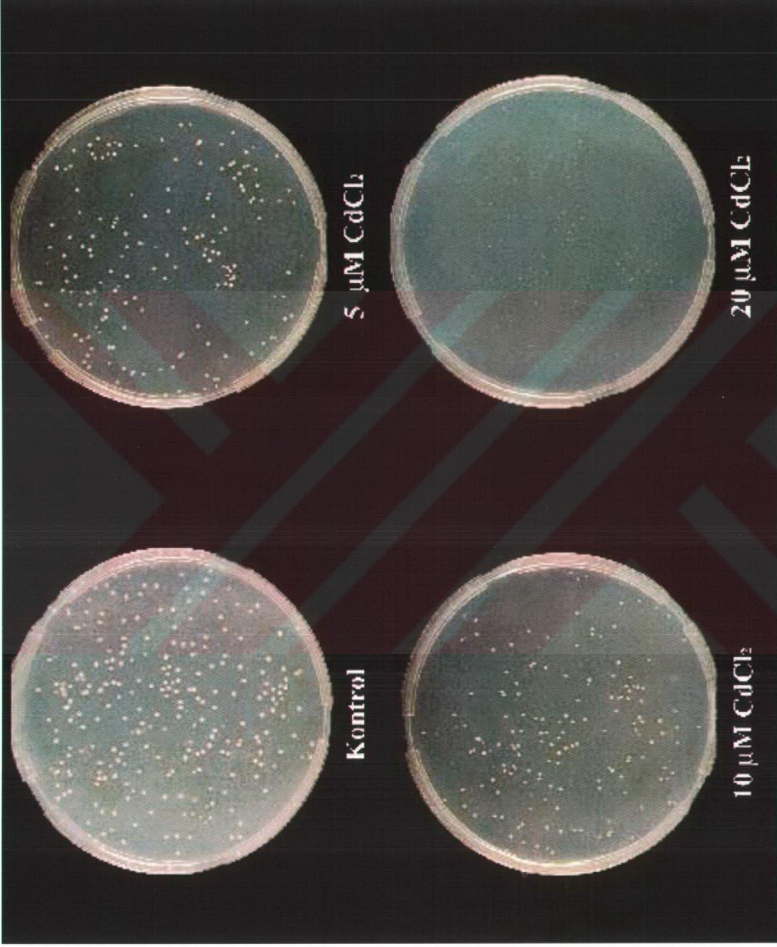
Biyokütlenin logaritmik üreme sırasında iki katına çıkması için gerekli süre, Malzeme ve Yöntem 2.5'te belirtilen doğal logaritma denklemi ile hesaplanarak 13 saat bulunmuştur.

### 3.3 *Z. ramigera*'nın farklı bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında üreme durumlarının incelenmesi

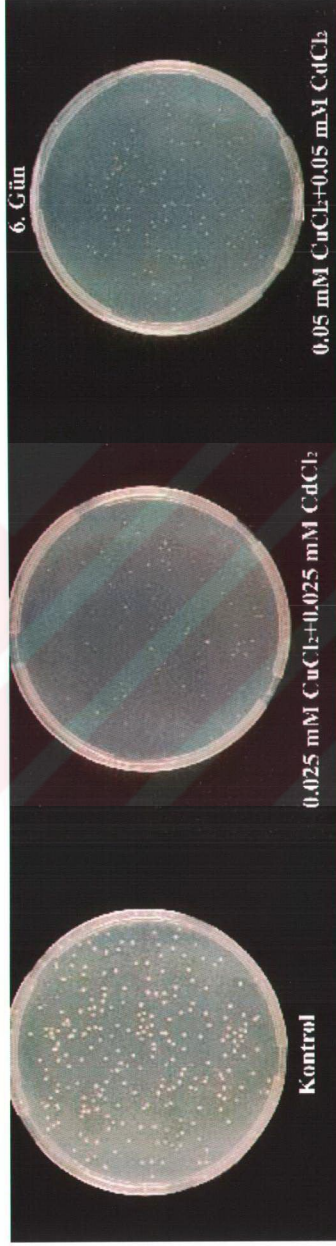
*Z. ramigera*'nın ağır metalde üreme durumlarının incelenmesi için seçilen konsantrasyonlar,  $\text{CuCl}_2$  için 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 0.8, 0.9 ve 1 mM,  $\text{CdCl}_2$  için 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40  $\mu\text{M}$ 'dır.  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  besiyerinde birlikte bulunduğunda, her iki metal için de kullanılan konsantrasyonlar aynıdır ve bu değerler 0, 0.025 ve 0.05 mM'dır. Bu konsantrasyonları içeren katı besiyerlerine bakır ve kadmiyumun üreme üzerine etkisinin anlaşılması için Malzeme ve Yöntem 2.6'da açıklandığı gibi iki farklı yoğunlukta hücre ekilmiştir.



Şekil 3.2 Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır konsantrasyonunda üremesi



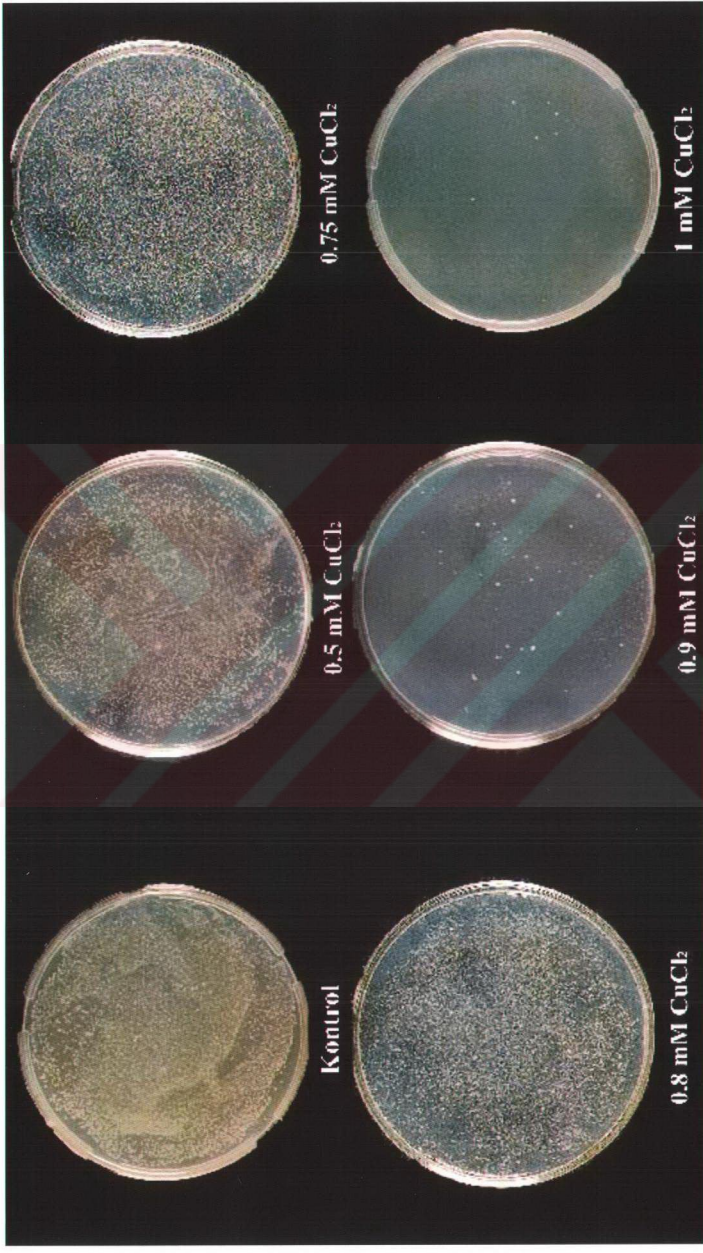
Şekil 3.3. Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan kadmiyum konsantrasyonunda üremesi



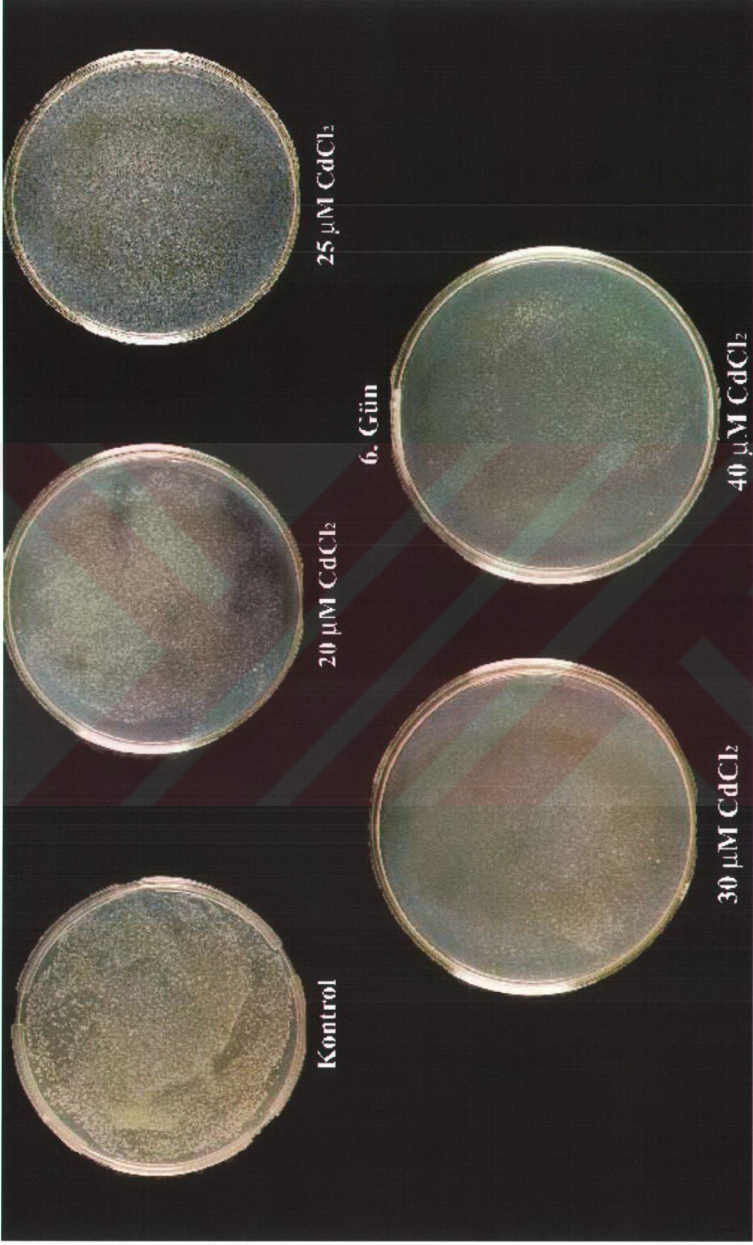
Şekil 3.4 Az yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunda üremesi

Az yoğunlukta ekilen hücrelerde ağır metal içermeyen kontrol besiyerinde 4. günde 165-195 koloni gözlenmiş (Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4), 0.9, 1 mM  $\text{CuCl}_2$  ve 0.05 mM  $\text{CuCl}_2$  ile  $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerinde 6. gün üreme görülmüş (Şekil 3.2 ve Şekil 3.4), 25, 30 ve 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerinde üreme görülmemiştir (Şekil 3.3).

Şekil 3.2'de görüldüğü gibi kolonilerin sayı ve büyüklüğü bakımından 0.75 mM  $\text{CuCl}_2$  içeren besiyerlerine kadar kontrol grubundan belirgin bir fark görülmemektedir. 0.8 mM  $\text{CuCl}_2$ 'de koloni sayısında biraz düşme görülmekle beraber 6. günde üreme görülen 0.9 mM  $\text{CuCl}_2$ 'de koloni sayısında ve büyüklüğünde çok ciddi bir düşüş görülmüş, 1 mM  $\text{CuCl}_2$ 'de ise koloniler görülemeyecek kadar küçülmüş ve koloni sayısı da 0.9 mM  $\text{CuCl}_2$  içerene göre azalmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi 5 ve 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerlerinde oluşan koloni sayısı kontrole göre daha az olmakla birlikte, kendi aralarında ciddi bir fark görülmemektedir. Oysa 20  $\mu\text{M}$ 'da koloni sayı ve büyüklüğünde birden düşüş olmakta, koloniler görülemeyecek kadar küçülmektedir. Şekil 3.4 incelendiğinde 0.025 mM  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ 'yi beraber içeren besiyerinde oluşan koloni sayısı ve büyüklüğünde kontrole göre ciddi bir düşüş görülmektedir. 0.05 mM (50  $\mu\text{M}$ )  $\text{CdCl}_2$ 'de hiçbir şekilde üreme gözlemlenmezken 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerinde 6. gün üreme görülmüştür. Fakat bu üreme 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ 'de gözlemlenen üremeden çok daha azdır (Şekil 3.2).



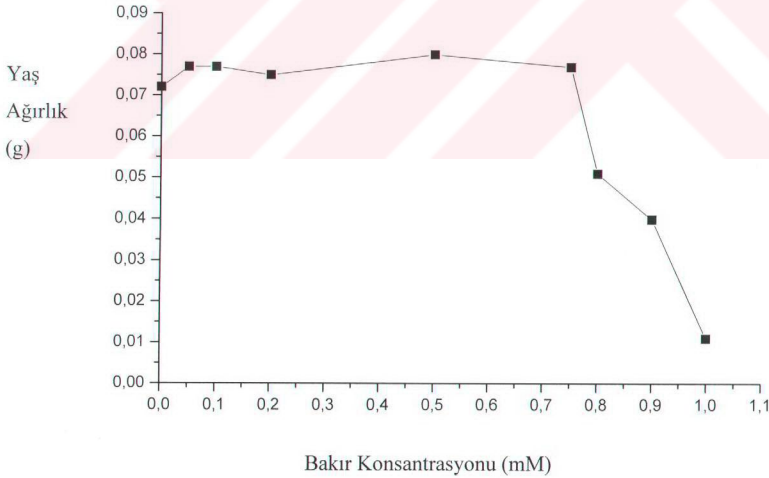
Şekil 3.5 Çok yoğunlukta ekilen hücrelerin artan bakır konsantrasyonlarında üremesi



Şekil 3.6 Çok yoğunlukta ekilen hücrelerin artan kadmiyum konsantrasyonunda üremesi

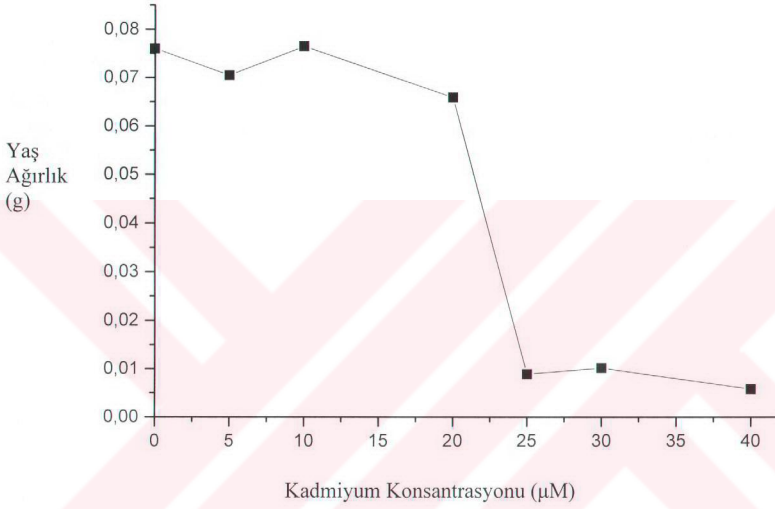
Daha fazla yoğunlukta ekilen hücrelerde ağır metal içermeyen kontrol besiyerinde 950-1000 koloni gözlenmiş (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6), 0,9, 1 mM  $\text{CuCl}_2$  ve 25, 30  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerlerinde 4. gün (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6), 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerinde 6. gün üreme görülmüştür (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Daha fazla yoğunlukta hücre ekildiğinde, Şekil 3.5’de görüldüğü gibi kontrolde görülen üreme ile 0,5, 0,75 ve 0,8 mM  $\text{CuCl}_2$ ’de gözlenen üreme çok farklı olmamaktadır. Fakat az yoğunlukta hücre ekildiğinde 6. günde üreme görülen 0,9 ve 1 mM  $\text{CuCl}_2$  besiyerinde, çok yoğunlukta hücre ekildiğinde 4. günde üreme gözlenmektedir. Koloni sayısı ve büyüklüğünde ise Şekil 3.2’ye göre farklılık göze çarpmaktadır.

Ağır metal içeren sıvı besiyerinde üreyen hücrelerin biyokütlesine bakıldığında, katı besiyerinde gözlenen üremeden çok farklı olmadığı anlaşılmaktadır. Şekil 3.7’da görüldüğü gibi 0,75 mM  $\text{CuCl}_2$ ’e kadar neredeyse üremiş hücrelerin biyokütlesinde değişme görülmezken, 0,75 mM  $\text{CuCl}_2$ ’den sonra azalmaya başlamaktadır. Üreme, 0,8 mM  $\text{CuCl}_2$ ’da %33,5, 0,9 mM  $\text{CuCl}_2$ ’da %47,72, 1 mM  $\text{CuCl}_2$ ’da ise %85,25 oranında inhibe olmuştur.



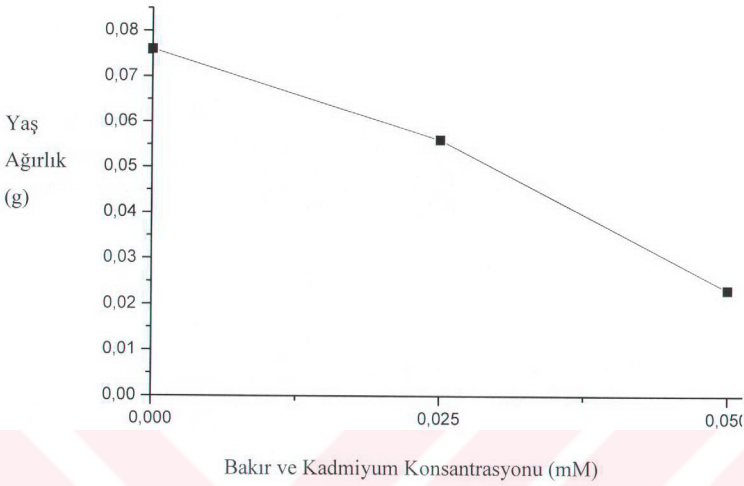
Şekil 3.7 Artan bakır konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle

Şekil 3.8’de ise 20  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ’den itibaren hücre üremesi birden azalmıştır. Üreme, 20  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ’da %13.86, 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ’da %88.37, 30  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ’de %86.67 ve 40  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ’de ise %92.42 oranında inhibe olmuştur.



Şekil 3.8 Artan kadmiyum konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle.

Şekil 3.9’da görüldüğü gibi üreme 0.025 mM  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ’de %26.19, 0.05 mM  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ’de % 69.48 oranında inhibe olmuştur.



Şekil 3.9 Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonuna göre üreyen biyokütle.

### 3.3.1 *Z. ramigera*'da bakır alınımının tayini

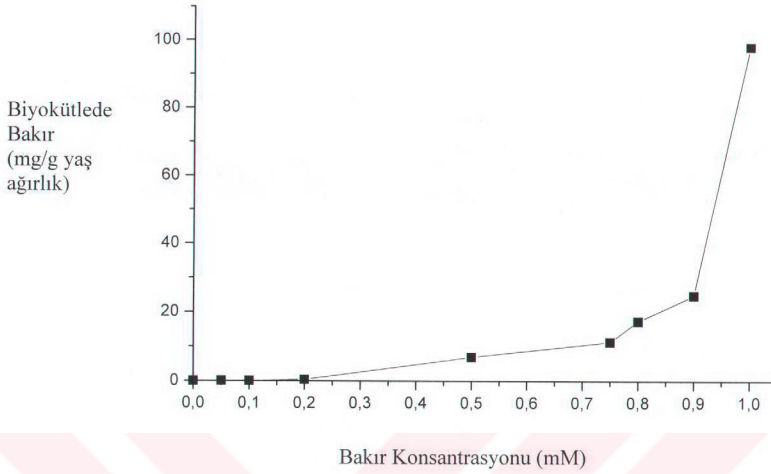
*Z. ramigera*'da bakır alınımının ölçülmesi Malzeme ve Yöntem 2.7.1'de açıklanan yöntemle yapıldı.

Biyokütleden bağımsız olarak, ortamdaki  $\text{CuCl}_2$  konsantrasyonu arttıkça, 0.75 mM konsantrasyona kadar bakırın % toplanma verimi artmakta ve en yüksek % toplanma verimi bu konsantrasyonda görülmektedir. 0.75 mM'dan fazla olan konsantrasyonlarda, bakırın % toplanma verimi 0.75 mM'dakinden çok az farklı olan 0.5 mM'daki toplanma verimine düşmekte ve artan konsantrasyonlarda da değişmemektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Hücrelerce toplanan bakır oranı

| Besiyerindeki Cu Konsantrasyonu |       | Üreme Sonunda Besiyerindeki Cu Konsantrasyonu | Cu Toplanma Verimi |
|---------------------------------|-------|-----------------------------------------------|--------------------|
| (mM)                            | (ppm) | (ppm)                                         | (%)                |
| 0                               | 0.21  | 0.21                                          | 0                  |
| 0.05                            | 3.18  | 3.1                                           | 2.52               |
| 0.1                             | 6.36  | 6.2                                           | 2.52               |
| 0.2                             | 12.72 | 11.448                                        | 10                 |
| 0.5                             | 31.8  | 9.568                                         | 69.9               |
| 0.75                            | 47.7  | 12.912                                        | 72.9               |
| 0.8                             | 50.88 | 15.504                                        | 69.6               |
| 0.9                             | 57.24 | 17.505                                        | 69.5               |
| 1                               | 63.6  | 19.27                                         | 69.8               |

Toplanan bakırın (mg), biyokütle (g) oranına bakıldığında, özgül bakır toplanmasının en fazla 1 mM  $\text{CuCl}_2$ 'da olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10). Ortamdaki  $\text{CuCl}_2$  konsantrasyonu arttıkça 1 g yaş ağırlıkta toplanan mg bakır miktarında da artış olduğu gözlenmektedir.



Şekil 3.10 Artan bakır konsantrasyonuna göre özgül bakır toplanması.

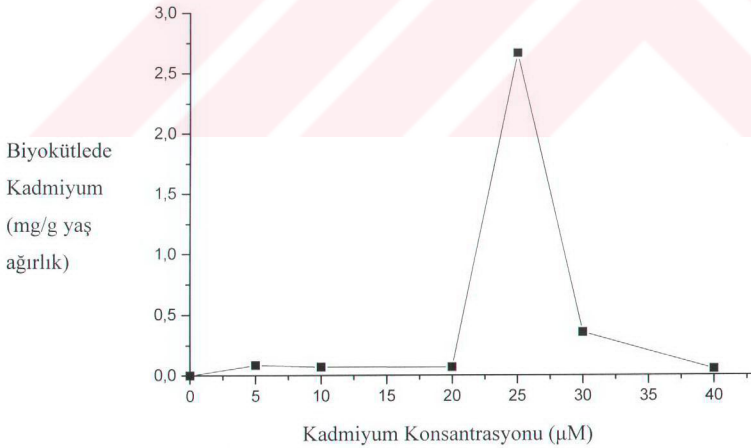
### 3.3.2 *Z. ramigera*'da kadmiyum alınımının tayini

*Z. ramigera*'da kadmiyum alınımının ölçülmesi Malzeme ve Yöntem 2.7.1'de açıklanan yöntemle yapıldı.

Biyokütleden bağımsız olarak, besiyerlerinde azalan kadmiyum miktarları karşılaştırıldığında, en fazla kadmiyum % toplanma verimi 5  $\mu\text{M}$ 'da görülmektedir (Çizelge 3.2). Toplanan kadmiyumun (mg), biyokütleye (g) oranına bakıldığında, özgül kadmiyum toplanmasının en fazla 25  $\mu\text{M}$ 'da olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.11).

Çizelge 3.2 Hücrelerce toplanan kadmiyum oranı

| Besiyerindeki Cd Konsantrasyonu |       | Üreme Sonunda Besiyerindeki Cd Konsantrasyonu (ppm) | Cd Toplanma Verimi (%) |
|---------------------------------|-------|-----------------------------------------------------|------------------------|
| ( $\mu\text{M}$ )               | (ppm) |                                                     |                        |
| 0                               | 0     | 0                                                   | 0                      |
| 5                               | 0.562 | 0.325                                               | 42.2                   |
| 10                              | 1.124 | 0.909                                               | 19.1                   |
| 20                              | 2.248 | 2.067                                               | 8.1                    |
| 25                              | 2.81  | 1.861                                               | 33.8                   |
| 30                              | 3.372 | 3.227                                               | 4.31                   |
| 40                              | 4.496 | 4.484                                               | 0.27                   |



Şekil 3.11 Artan kadmiyum konsantrasyonuna göre özgül kadmiyum toplanması

### 3.3.3 *Z. ramigera*'da bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarında bakır ve kadmiyum alınımının tayini

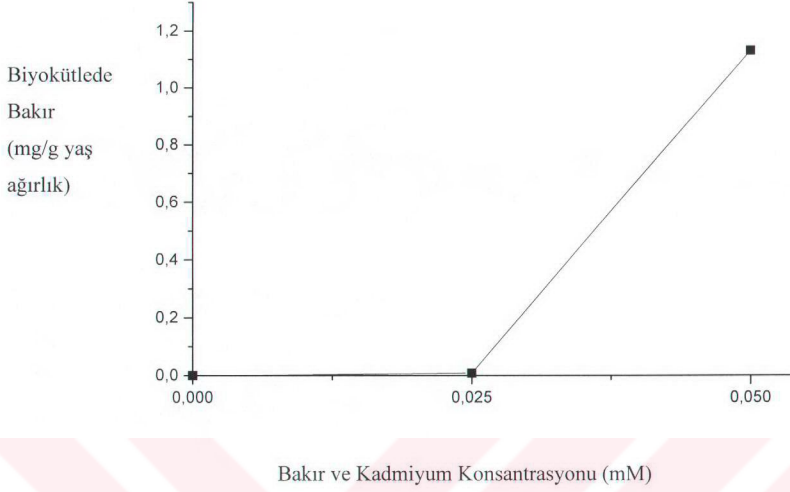
*Z. ramigera*'da bakır ve kadmiyum alınımının ölçülmesi Malzeme ve Yöntem 2.7.1'de açıklanan yöntemle yapıldı.

Biyokütleden bağımsız olarak bakıldığında, bakır ve kadmiyum içeren besiyerinde bakırın % toplanma verimi, bakır konsantrasyonu arttıkça artmaktadır (Çizelge 3.3). Biyokütlede (g) toplanan bakır (mg) oranına bakıldığında, 0.025 mM'da neredeyse hiç toplanmadığı, 0.05 mM'da ise toplamada artış olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.12).

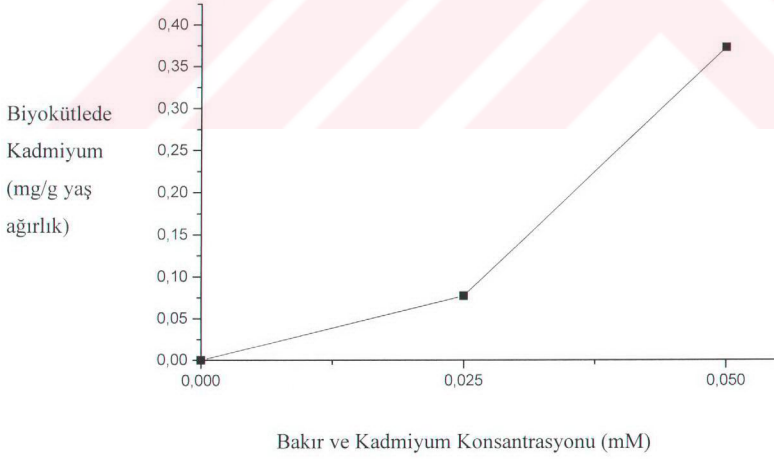
Bakır ve kadmiyum içeren besiyerinde kadmiyum % toplanma verimi kadmiyum konsantrasyonu arttıkça değişmemektedir (Çizelge 3.3), ancak biyokütlede (g) toplanan kadmiyum (mg) oranına bakıldığında, kadmiyum konsantrasyonu arttıkça özgül kadmiyum toplanmasında artış gözlenmiştir (Şekil 3.13).

Çizelge 3.3 Bakır ve kadmiyum içeren besiyerinde, hücrelerce toplanan bakır ve kadmiyum oranı

| Besiyerindeki Cu ve Cd Konsantrasyon |       |       |       | Üreme Sonunda Besiyerindeki Cu ve Cd Konsantrasyonu |       | Cu ve Cd Toplanma Verimi |      |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------------------------|-------|--------------------------|------|
| Cu                                   |       | Cd    |       | (ppm)                                               |       | (% )                     |      |
| (mM)                                 | (ppm) | (mM)  | (ppm) | Cu                                                  | Cd    | Cu                       | Cd   |
| 0.025                                | 1.59  | 0.025 | 2.81  | 1.57                                                | 2.637 | 1.26                     | 6.16 |
| 0.05                                 | 3.18  | 0.05  | 5.62  | 2.13                                                | 5.274 | 33.02                    | 6.16 |



Şekil 3.12 Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunda özgül bakır toplanması.



Şekil 3.13 Artan bakır ve kadmiyum konsantrasyonunun özgül kadmiyum toplanması.

### 3.4.1 Bakırın sitosole alınımının tayini

*Z. ramigera*'da bakırın sitosole alınımının tayini Malzeme ve Yöntem 2.7.2'de açıklanan şekilde yapıldı. Hücre sitosolünde toplanan bakır konsantrasyonu, hücrelerce toplanan bakır konsantrasyonundan çıkarıldığında, bakırın yüksek oranda hücre duvarında toplandığı görülmüştür (Çizelge 3.4). Ortamdaki bakır konsantrasyonu arttıkça hücre sitosolünde toplanan bakır oranı da azalmış, 1 mM  $\text{CuCl}_2$  içeren besiyerinde üremiş hücrelerin sitosolünde neredeyse hiç bakır toplanmamıştır.

Çizelge 3.4 Hücrelerce toplanan bakıra oranla sitosolde bakırın toplanma oranı

| Besiyerindeki Cu Konsantrasyonu |       | Hücrelerce Toplanan Cu Konsantrasyonu | Sitosolde Toplanan Cu Konsantrasyonu | Sitosolde Toplanan Cu | Hücre Duvarında Toplanan Cu |
|---------------------------------|-------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| (mM)                            | (ppm) | (ppm)                                 | (ppm)                                | (%)                   | (%)                         |
| 0.007*                          | 0.45  | 0.421                                 | 0.142                                | 33.7                  | 66,3                        |
| 0.05                            | 3.18  | 0.28                                  | 0.25                                 | 89.2                  | 10.8                        |
| 0.1                             | 6.36  | 0.46                                  | 0.4                                  | 86.9                  | 13.1                        |
| 0.2                             | 12.72 | 1.272                                 | 0.498                                | 39.15                 | 60.85                       |
| 0.5                             | 31.8  | 22.232                                | 1.782                                | 8                     | 92                          |
| 0.75                            | 47.7  | 34.788                                | 1.863                                | 5.4                   | 94.6                        |
| 0.8                             | 50.88 | 35.376                                | 1.397                                | 3.9                   | 96.1                        |
| 0.9                             | 57.24 | 39.735                                | 0.821                                | 2.1                   | 97.9                        |
| 1                               | 63.6  | 44.33                                 | 0.067                                | 0.15                  | 99.85                       |

\* Besiyeri formülasyonunda bulunan bakır.

### 3.4.2 Kadmiyumun sitosole alınımının tayini

*Z. ramigera*'da kadmiyumun sitosole alınımının tayini Malzeme ve Yöntem 2.7.2'de açıklanan şekilde yapıldı. Çizelge 3.5'de belirtildiği gibi sitosolde toplanan kadmiyum oranı hücrelerce toplanan kadmiyuma oranlandığında, toplanan kadmiyumun neredeyse tamamının hücre sitosolünde toplandığı ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 3.5 Hücrelerce toplanan kadmiyuma oranla sitosolde kadmiyum toplanma oranı

| Besiyerindeki Cd Konsantrasyonu |       | Hücrelerce Toplanan Cd Konsantrasyonu (ppm) | Sitosolde Toplanan Cd Konsantrasyonu |       |
|---------------------------------|-------|---------------------------------------------|--------------------------------------|-------|
| ( $\mu$ M)                      | (ppm) |                                             | (ppm)                                | (%)   |
| 0                               | 0     | 0                                           | 0                                    | 0     |
| 5                               | 0.562 | 0.237                                       | 0.236                                | 99.57 |
| 10                              | 1.124 | 0.215                                       | 0.218                                | 101.3 |
| 20                              | 2.248 | 0.181                                       | 0.18                                 | 99.44 |
| 25                              | 2.81  | 0.949                                       | 0.953                                | 100.4 |
| 30                              | 3.372 | 0.145                                       | 0.142                                | 97.93 |
| 40                              | 4.496 | 0.012                                       | 0.011                                | 91.6  |

### 3.4.3 Bakır ve kadmiyumun sitosole alınımının tayini

*Z. ramigera*'da bakır ve kadmiyumun sitosole alınımının tayini Malzeme ve Yöntem 2.7.2'de açıklanan şekilde yapıldı. Bakır ve kadmiyumun birlikte bulunduğu durumda sitosolde toplanan bakır oranında sadece bakırda inkübe edilen hücrelere göre düşme görülmektedir (Çizelge 3.6). Yalnız sitosolde toplanan kadmiyumda bir farklılık gözükmemektedir. Hücrelerce toplanan kadmiyumun neredeyse hepsi hücre sitosolünde toplanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Hücrelerce toplanan bakır ve kadmiyuma oranla sitosolde bakır ve kadmiyum toplanma oranı

| Besiyeri Konsantrasyon |       |       |       | Hücrelerce Toplanan Cu ve Cd (ppm) |       | Sitosolde Toplanan Cu ve Cd (ppm) |       | Sitosolde Toplanan Cu ve Cd (%) |     |
|------------------------|-------|-------|-------|------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|---------------------------------|-----|
| Cu                     |       | Cd    |       | Cu                                 | Cd    | Cu                                | Cd    | Cu                              | Cd  |
| (mM)                   | (ppm) | (mM)  | (ppm) |                                    |       |                                   |       |                                 |     |
| 0.025                  | 1.59  | 0.025 | 2.81  | 0.02                               | 0.173 | 0.028                             | 0.170 | 100                             | 100 |
| 0.05                   | 3.18  | 0.05  | 5.62  | 1.05                               | 0.346 | 0.208                             | 0.35  | 19,8                            | 100 |

### 3.5 DIG sistemi ile Southern Hibridizasyonu

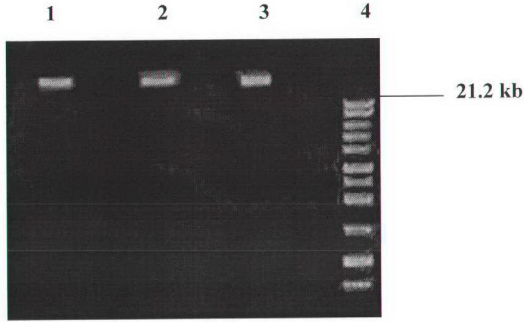
#### 3.5.1 Genomik DNA'nın miktar tayini ve saflık kontrolü

Malzeme ve Yöntem 2.8.1.1'de açıklanan yöntemle izole edilen *Z. ramigera* genomik DNA'sı jel elektroforezinde analiz edildi (Şekil 3.14). Elde edilen DNA'nın 1/1000 oranındaki sulandırımın spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değeri saptandı (Çizelge 3.7). İzole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu 5150 µg/ml olarak belirlendi.

Elde edilen genomik DNA'nın spektrometrik OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> değerinin sonucuna göre genomik DNA'nın oldukça saf olduğu saptandı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Genomik DNA'nın spektrofotometrik analiz sonuçları

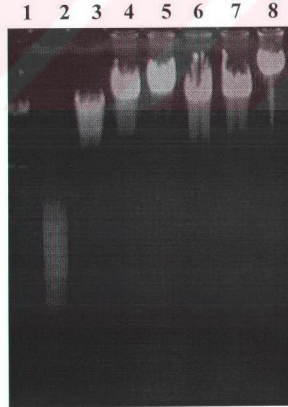
|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| OD <sub>260</sub>                    | 0.103  |
| OD <sub>280</sub>                    | 0.057  |
| OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> | 1.7939 |



Şekil 3.14 Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi. 1-3: genomik DNA 4: DNA standartı;  $\lambda$  DNA+*EcoR* I+*Hind* III

### 3.5.2 Genomik DNA'nın kesimi

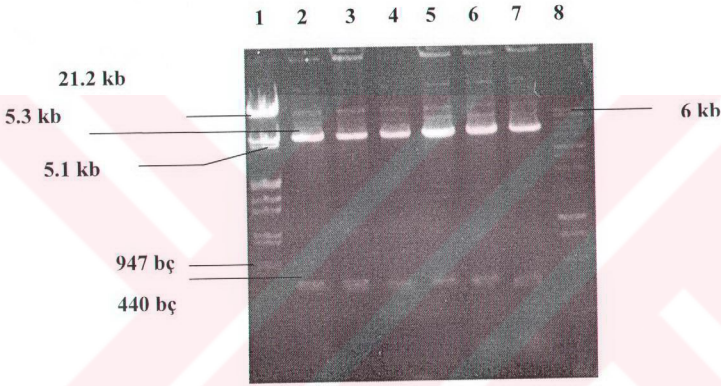
Genomik DNA Malzeme ve Yöntem 2.8.1.4.'de açıklanan yöntemle Southern Hibridizasyon için ayrı ayrı *Hinc* II, *Hind* III, *Pvu* II, *EcoR* I, *Sal* I ve *Xho* I enzimleriyle kesildi. Kesim sonu jel elektroforezi ile analiz edildi.



Şekil 3.15 Genomik DNA'nın enzimlerle kesim sonucu elektroforetik analizleri 1: DNA standartı;  $\lambda$  DNA+ *EcoR* I+*Hind* III (negatif kontrol), 2: *Hinc* II, 3: *Hind* III, 4: *Pvu* II, 5: *EcoR* I, 6: *Sal* I, 7: *Xho* I enzimleriyle kesilmiş *Z. ramigera* genomik DNA'sı, 8: Hibridizasyonda pozitif kontrol olan *cadC* genini içeren plazmit DNA'sı

### 3.5.3 Plazmit izolasyonu

*Z. ramigera*'nın genomik DNA'sında *cadC* geninin olup olmadığını gösterebilmek için *S. aureus*'a ait *cadC* genini içeren pET-28a plazmiti *E. coli*'den Malzeme ve Yöntem 2.8.2.1'de açıklanan şekilde izole edildi. Kontrol ve prob hazırlamak için *Xba* I ve *Hind* III enzimleri ile kesildi. Kesim sonucu jel elektroforezi ile analiz edildi. Kesim sonucunda oluşan 5.3 kb ve 440 bç boyutunda bantlar ile pET-28a plazmitinin boyutunun 5.7 kb olduğu gösterildi.



Şekil 3.16 pET-28a vektörünün *Xba* I ve *Hind* III enzimleriyle kesim ürünlerinin incelenmesi.  
1: DNA standartları;  $\lambda$  DNA + *EcoR* I + *Hind* III, 2-7: pET-28a + *Xba* I + *Hind* III, 8: DNA standartları; 1 kb DNA Ladder

### 3.5.4 Saflaştırılmış *cadC* geninin miktar tayini ve saflık kontrolü

Malzeme ve Yöntem 2.8.2.3'de açıklanan şekilde agaroz jelden geri kazanılan *cadC* geninin 1/100 oranındaki sulandırımın spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değeri saptandı (Çizelge 3.8). Saflaştırılan *cadC* geninin konsantrasyonu 306  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi.

Elde edilen *cadC* geninin spektrometrik  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  değerinin sonucuna göre geninin oldukça saf olduğu saptandı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 *CadC* geninin spektrofotometrik analiz sonuçları

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| <b>OD<sub>260</sub></b>                  | 0.0612 |
| <b>OD<sub>280</sub></b>                  | 0.0322 |
| <b>OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub></b> | 1.827  |

### 3.5.5 İşaretlenen probun kontrolü

DIG sistemi ile sentezlenen *cadC* geni probu, Zeta-Probe membrana transfer edilmiş genomik DNA ile hibridizasyona maruz bırakılmadan önce, probun işaretlendiğini kontrol etmek amacıyla Malzeme ve Yöntem 2.8.2.5'te açıklanan şekilde analiz edildi.

1 2



Şekil 3.17 İşaretlen prob ile kit içerisinde hazır bulunan işaretli probdan hazırlanan sulandırma serilerinin Zeta-Probe membranda analizi 1: İşaretlenmiş hazır prob, 2: Southern hibridizasyonunda prob olarak kullanılacak işaretlenmiş *cadC* geni

### 3.5.6 Southern hibridizasyonu

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 3.18 *CadC* geni ile hazırlanan prob ile hibridize edilmiş Zeta-Probe membran 1: *cadC* genini taşıyan pET-28a, 2: *Xho* I, 3: *Sal* I, 4: *Eco*R I, 5: *Pvu* II, 6: *Hind* III, 7: *Hinc* II enzimleriyle kesilmiş *Z. ramigera* genomik DNA'sı, 8: *Eco*R I ve *Hind* III enzimleriyle kesilmiş  $\lambda$  DNA'sı

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce yapılan çalışmalarda *Zoogloea ramigera*'nın hücre dışına çok fazla miktarda saldıgı eksi yüklü asidik polisakkarit tabakasının metalleri adsorplama kapasitesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Norberg ve Persson, 1984). Özellikle bakır toplanmasında *Z. ramigera* biyokütlesi bir çok bakteriye göre en yüksek özgül bakır toplama değerini vermiştir (Esposito vd., 2001). Bu çalışmada ilk kez, habitatı atık su arıtım sistemleri olan *Z. ramigera* tarafından bakır ve kadmiyum toplanmasının metabolizmayla ilişkisi anlaşılmaya çalışıldı. Bakterinin metale direncinin anlaşılabilmesi için; en son üreme gösterdiği bakır ve kadmiyum konsantrasyonları, bakır ve kadmiyumun birlikte üremeye etkisi ve üreme inhibisyon oranları ilk defa belirlendi. Bu bulgular ileriki çalışmalarımızda bu bakterinin sudan ağır metal gideriminde kullanılabilmesi için, ağır metal toplanmasının üreme ve metabolizmayla ilişkisinin aydınlatılması bakımından önem taşımaktadır.

*Z. ramigera*'nın üreme gösterdiği en son bakır konsantrasyonu 1 mM'dır. Başlangıçta ekilen hücre yoğunluğuna göre katı besiyerinde koloni oluşum zamanında farklılıklar ortaya çıktı. Az yoğunlukta hücre ekildiğinde, 0,9 ve 1 mM  $\text{CuCl}_2$  içeren ortamlarda koloni oluşumu 6. gün görülürken, fazla yoğunlukta hücre ekildiğinde bu konsantrasyonlarda koloni oluşumu 4. gün gözlemlendi. Bu farklılık ekilen hücre yoğunluğundaki artışın metal içeren ortamda üreme şansını arttırması şeklinde açıklanabilir. *Z. ramigera*'nın üreme gösterdiği en son kadmiyum konsantrasyonu başlangıçta ekilen hücre yoğunluğuna göre değişmektedir. Az yoğunlukta hücre ekildiğinde koloni oluşumunun gözlemlendiği en son konsantrasyon 20  $\mu\text{M}$  iken, ekilen hücre yoğunluğu arttırıldığında 25 (4. gün), 30 (4. gün) ve 40  $\mu\text{M}$  (6. gün) kadmiyum içeren besiyerinde üreme görüldü. Wang vd., (1997) tarafından yapılan çalışmaya göre *Z. ramigera* ile aynı familyaya ait olan *Pseudomonas aeruginosa*'da 1 ve 3 mM kadmiyumda üreme gözlenmiştir.

Kadmiyum ve bakırın üremeye etkisi incelendiğinde 0.05 mM  $\text{CuCl}_2$ 'de kontrol ile aynı düzeyde koloni oluşumu görülürken bakırın ve kadmiyumun aynı konsantrasyonda (0.05 mM) birlikte bulunmasıyla koloni sayısında kontrole göre ciddi düşüş gözlemlendi. 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ 'de hiç üreme görülmezken iki metalin birlikte bulunduğu durumda 6. günde üreme

görüldü. Bunun nedeni iki metalin biyolojik öneminden kaynaklanmaktadır. Bakır tüm canlılarda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda eser element olarak rol oynamakta, oysa kadmiyumun biyolojik aktivitesi şimdiye kadar sadece *Thalassioria weissflogii* diyatomunda görülmektedir (Lane ve Morel, 2000). Kadmiyum canlılar için son derece toksik ve kanserojen bir metaldir (Beyersmann, 2002). Bakır ve kadmiyumun hücre içersine aynı taşıyıcı sistemle alınması halinde, bakır ve kadmiyum ortamda birlikte bulunduğu, bakteri eser bir element olan bakırı öncelikle tercih edeceğinden her iki metali de 0.05 mM'da içeren ortamda yaşamını sürdüreceği düşünülebilir.

Üremenin gözlemlendiği bakır ve kadmiyum konsantrasyonlarını içeren sıvı besiyerlerinde, üremenin optimum olduğu sıcaklık ve çalkalama devrinde inkübasyondan sonra hücreler toplanarak, toplanan bakır ve kadmiyum konsantrasyonları ölçüldü. Bunun sonucunda özgül bakır toplanması kadmiyuma göre çok daha fazladır. Bu durumda bu metallerin giderimindeki çekim ilgisi serisi  $Cu^{+2} > Cd^{+2}$ 'dir. Bu sonuç Mullen vd., (1989) tarafından *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *B. Subtilis* ve *E. coli* ile yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Esposito vd., (2001) tarafından yapılan çalışmada ise aynı sonuç *Sphaerotilus natans* bakterisiyle alınmıştır. Bu durum muhtemelen kadmiyum ve bakır iyon yüklerinin, kütlelerine oranındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Bakır ve kadmiyumun yükleri aynıdır fakat kadmiyumun kütlesi neredeyse bakırın kütlelerinin iki katıdır. Kadmiyumda sterik engelleme daha fazla olduğundan, bakteri hücre yüzeyi tarafından adsorplanmasının da engelleneceği düşünülebilir.

Mullen vd., (1989)'nın çalışmasına göre çalışılan dört bakteriden en fazla bakır toplanması *Z. ramigera* ile aynı familyaya ait olan *P. aeruginosa*'da görülmüştür. Esposito vd., (2001) tarafından yapılan çalışmada en fazla özgül bakır toplanması *Z. ramigera* tarafından olmuş, Vegliö vd., (1997)'ye göre ise *Z. ramigera* bakır toplamasında bakteriler içinde ikinci sırada yer almıştır. Bu çalışmada ortamdaki bakır konsantrasyonu arttıkça özgül bakır toplanmasında da artış görüldü. Norberg ve Persson, (1984) da *Z. ramigera*'da aynı sonucu elde etmiştir. Bunun yanında aynı sonuçlar Boyer vd., (1998)'nin çalışmasında, *Thiobacillus ferrooxidans* bakterisinde, Mullen vd. (1989)'nin *P. aeruginosa* ve *B. cereus* bakterileriyle yaptığı çalışmada, Wong vd., (2001)'nin çalışmasında ise *Micrococcus* sp. bakterisinde alınmıştır.

*Z. ramigera* tarafından özgül kadmiyum toplanması incelendiğinde, bu çalışmada en yüksek değer ortam kadmiyum konsantrasyonu 25  $\mu\text{M}$  iken alındı. Diğer konsantrasyonlarda neredeyse hiç toplanma gözlenmedi. Literatürde, *Z. ramigera*'da özgül kadmiyum toplanmasının, ortam konsantrasyonuna bağlılığına ilişkin bir bilgiye rastlanmazken, Mullen vd. (1989)'un yaptığı çalışmaya göre *P. aeruginosa* ve *B. cereus* bakterilerinde ortam kadmiyum konsantrasyonu arttıkça özgül kadmiyum toplanmasında artış saptanmıştır.

Bakır ve kadmiyum ortamda birlikte bulunduğu 0.05 mM  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  içeren ortamdan özgül bakır toplanması, sadece 0.05 mM bakır içerene göre oldukça artış gösterdi, 0.025 mM  $\text{CuCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  içeren besiyerinde kadmiyum toplanması ise, sadece 0.025 mM kadmiyum içerene göre oldukça azaldı. Sonuç olarak, bu çalışmada kadmiyum ve bakırın birlikte bulunmasının, kadmiyum ve bakırın toplanmasında farklılığa neden olduğu anlaşılmıştır. Norberg ve Persson (1981)'nin ölü *Z. ramigera* biyokütlesiyle yaptığı çalışmada ortamda kadmiyum bulunması özgül bakır toplanmasını etkilememektedir.

Atık sulardan ağır metal gideriminde kullanılan biyosorpsiyon yönteminin mekanizması, kullanılan mikroorganizmanın canlılığı ve metabolizması göz önüne alındığında ikiye ayrılır (Vegliò ve Beolchini, 1997): 1- Metabolizmaya bağımlı, 2-Metabolizmadan bağımsız. Metallerin hücre zarından taşınarak hücre içersinde toplanması, organizmanın metabolizmasına bağlı bir biyosorpsiyon yoludur. Metabolizmadan bağımsız olarak ağır metal katyonları ile hücre duvarı arasındaki elektrostatik etkileşimle bakır, kadmiyum, çinko ve kobalt gibi bir çok metal toplanmaktadır (Kuyucak ve Volesky, 1988).

Bakır ve kadmiyum toplanmasında *Z. ramigera*'nın metabolizmasının rolünü anlamak için, hücreler parçalanarak hücre sitosolünde toplanan bakır ve kadmiyum konsantrasyonları incelendi. Bu çalışmada alınan sonuçlara göre ortam bakır konsantrasyonu arttıkça, hücre sitosolünde toplanan bakır oranında azalma göze çarpmaktadır. Bu durumda, hücre duvarında toplanan bakır oranında da artış olduğu söylenebilir. Mullen vd., (1989)'a göre bakır bağlanması esas olarak bakteri hücre duvarında bulunan eksi yüklü karboksil ve fosforil gruplarına bağlanması ile kontrol edilmektedir. Aksu vd., (1992)'in çalışmasına göre elektrostatik etkileşimler bakır iyonlarının *Z. ramigera*'nın hücre duvarında toplanmasında rol

oynamaktadır. Boyer vd., (1998)'e göre bakır iyonları *T. ferrooxidans*'ın metabolizmasına bağlı olarak toplanmakta, Baillet vd., (1997)'nin yaptığı bir çalışmaya göre de  $UO^{3+}$  ve  $Cr^{3+}$  iyonları *T. ferrooxidans*'ın hücre duvarında birikmektedir. *B. subtilis*'te  $Ag^+$ , *E. coli*'de  $La^{3+}$  iyonlarının hücre yüzeyinde toplandığı gösterilmiştir (Mullen vd., 1989). Uranyum iyonlarının da bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre yüzeyinde biriktiği açıklanmıştır (Strandberg vd., 1981).

Sitosolde toplanan kadmiyum oranına bakıldığında, *Z. ramigera* biyokütlesi tarafından toplanan kadmiyumun neredeyse tamamının hücre sitosolünde biriktiği görüldü. Bu açıdan kadmiyumun aktif taşıma sistemiyle hücre içine girdiği ve bu nedenle kadmiyum toplanmasının hücre metabolizmasına ve üremesine bağlı olduğu düşünülmektedir. *Z. ramigera* ile aynı familyaya mensup *P. aeruginosa*'da da kadmiyum toplanmasının hücre üremesi olmadığında gerçekleşmediği, toplanmanın metabolizmaya bağıllığı gösterilmiştir (Wang vd., 1999). *B. subtilis*'te de kadmiyum hücre içerisine Mangan Taşıma Sistemi ile taşınarak toplanmaktadır (Mullen vd., 1989). Literatürde bir çok metal katyonunun özgül olmayan aktif taşıma sistemi ile çeşitli bakteri ve maya türlerinde hücre içersinde biriktirildiği gösterilmiştir (Costa ve Leite, 1990; Gadd vd., 1988; Gourdon vd., 1990; Huang ve Morehart, 1990; Nourbakhsh vd., 1994; Peng ve Koon, 1993).

Bu çalışmada *Z. ramigera*'da kadmiyum toplanmasının, bakterinin metabolizmasına bağlı olduğu düşünüldüğünden, DIG sistemi kullanılarak, *Z. ramigera* genomunda *cadC* geninin varlığı incelenmiştir. Literatürde *cadA* geninin kadmiyum varlığına spesifik olarak anlatım yaptığı gösterilmiştir (Corbisier vd., 1993; Silver ve Walderhaug, 1992). *CadA* geninin bulunduğu *cad* operonu *cadC* geni tarafından negatif yönde düzenlenir. Bu gen, yaptığımız southern hibridizasyonu çalışmalarında *Z. ramigera* genomunda görülmemiştir. *CadC* geni genomda nadir bulunan bir gen olduğu için (Busenlehner vd., 2002), DNA konsantrasyonu arttırılarak veya başka restriksiyon enzimleri ile kesime maruz bırakılarak bu çalışma tekrarlanabilir. Babai ve Ron (1998)'nin çalışmasında, *E. coli* hücrelerinde kadmiyum varlığında ekspresyon yapan *zntA* genini bulunmuş fakat *cadC* genine homoloji gösteren bir gene rastlanmamıştır. *Z. ramigera*'da da kadmiyum varlığına tolerans göstermesinden ve taşınmasından sorumlu başka taşıyıcı proteinleri ve ATPaz'ları kodlayan genler rol oynayabilir.

Atık sulardan ağır metal giderimi için kullanılacak mikroorganizmaların:

- 1- Biyokütlelerinin üretilmesi ekonomik olmalı;
- 2- Arıtım işleminden sonra mikroorganizma biyokütlesi kolay, ekonomik bir yol ile sudan ayrılabilmelidir.

*Z. ramigera* biyokütlesinin eldesi çok ucuz olmakta, hücreler bulundukları ortamda kümeleşme yaptıklarından, arıtmadan sonra sadece yer çekimine dayalı olarak sistemden kolayca ayrılabilir. Norberg ve Persson (1984)'nın çalışmasında, metallerin toplanması ve geri kazanımı için gerekli optimum pH saptanmıştır. Gelişmekte olan ülkemizde de, tüm dünyada olduğu gibi ağır metal kirliliği maden ve metal endüstrilerine bağlı olarak önemli bir sorun haline gelmektedir. *Z. ramigera*'nın büyük boyutlarda arıtmada kullanılabilmesi için, hücrelerin canlılığı ve üremesinin, ağır metal toplanmasına etkisinin bilinmesi önem taşımaktadır. İleriki çalışmalarda, *Z. ramigera*'da metal toplanmasından sorumlu genler araştırılabilir, toplamayı arttıracak genler aktarılabilir. *Z. ramigera* büyük boyutlarda arıtım için kullanılması en uygun türlerden biridir.

## KAYNAKLAR

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1995), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley and Sons Inc., USA

Babai, R., Ron, E. Z., (1998), "An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals", *FEMS Microbiology Letters*, 167: 107-111

Bae, W., Chen, W., Mulchandani, A., Mehra, R., (2000), "Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin", *Biotechnol. Bioeng.*, 70:518-523

Benters, J., Schaefer, T., Beyersmann, D., Hechtenberg, S., (1996), "Agonist-Stimulated Calcium Transients are Effected Differentially by Cadmium and Nickel", *Cell Calcium*, 20: 441-446.

Berthelin, J., Munier-Lamy, C., Leyval, C., (1995), *Effect of Microorganisms on Mobility of Heavy Metals in Soils., Enviromental Impact of Soil Component Interactions*, Volume 2, Boca Raton, CRC Press.

Beveridge, T. J., (1985), "Metal Fixation by Bacterial Cell Walls", *Can. J. Earth Sci.*, 22:1893-1898

Beveridge, T. J., (1988), "The bacterial surface: general considerations towards design and function", *Can. J. Microbiol.*, 34:363-372

Beyersmann, D., (2002), "Effects of Carcinogenic Metals on Gene Expression", *Toxicology Letters*, 127: 63-68.

Boyer, A., Magnin, J. P., Ozil, P., (1998), "Copper Ion Removal by *Thiobacillus ferrooxidans* Biomass", *Biotechnology Letters*, 20:187-190.

Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Holt, J. G., Liston, J., Murray, R. G. E., Niven, C. F., Ravin, A. W., Stainer, R. Y., (1974), "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", 8<sup>th</sup> Edition, Williams and Wilkins Company: Baltimore.

Busenlehner, L. S., Cosper, N. J., Scott, R. A., Rosen, B. P., Wong, M. D., Giedroc, D. P., (2001), "Spectroscopic properties of the metalloregulatory Cd(II) and sites of *S. aureus* pl258 CadC", *Biochemistry*, 14:4426-4436

Busenlehner, L. S., Apuy, J. L., Giedroc, D. P., (2002), "Characterization of metalloregulatory bismuth (III) site in *Staphylococcus aureus* pl258 CadC repressor", *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7: 551-559

Butterfield, C. T., Ruchhoft, C. C., McNamee, P. D., (1937), "Studies of Sewage Purification. VI. Biochemical Oxidation by Sludges Developed by Pure Cultures of Bacteria Isolated from Activated Sludge", *U. S. Public Health Reports*, 52: 387-391.

Butterfield, C. T., Wattie, L., (1941), "Studies of Sewage Purification. XV. Effective Bacteria in Purification by Trickling Filters", *U. S. Public Health Reports*, 56: 2445-2464.

Busch, P. L., Stum, W., (1968), "Chemical interactions in the aggregation of bacteria bioflocculation in waste treatment", *Enviromental Science and Technology*, 2:49-53

Cohn, F., (1854), "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der mikroskopischen Algen und Pilze", *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae naturae*

curiosorum, 24: 101-256.

Corbisier, P., Ji, G., Nuyts, G., Mergeay, M. and Silver, S., (1993), "*luxAB* gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258", FEMS Microbiol. Lett. 110: 231-238.

Costa, A. C. A., Leite, S. G. F., (1990), "Cadmium and zinc biosorption by *Chlorella homosphaera*", Biotechnol. Lett. 12: 941-944

Crabtree, K., McCoy, E., (1967), "*Zoogloea ramigera* Itzigsohn, Identification and Description", International Systematic Bacteriology, 17: 1-10.

Deinema, M. H., Zevenhuizen, L. E. T. M., (1971), "Formation of cellulose fibrils by Gram negative bacteria and their role in bacterial flocculation", Archives of Microbiology, 78:42-57

Dugan, Patrick R. Et al., (1981), The Prokaryotes, Volume I, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ecoles, H., (1995), "Removal of Heavy Metals from Effluent Streams-Why Select A Biological Process", 5-16.

Engl, A., Kunz, B., (1995), "Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces cerevisiae*: Effects Of Nutrient Conditions", J. Chem. Technol. Biotechnol., 63:257-261

Esposito, A., Pagnanelli, A., Lodi, C., Solisio, C., Vegliò, F, (2001), "Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations", Hydrometallurgy, 60: 129-141

Finstein, M. S., (1969), "Growth and flocculation in a *Zoogloea* culture", Applied Microbiology, 15: 1671-1682

Friedman, B. A., Dugan, P. R., (1968), "Identification of *Zoogloea* species and the relationship to zoogloeal matrix and floc-formation", Journal of Bacteriology, 95:1903-1909

Friedman, B. A., Dugan, P. R., Pfister, R. M., Remsen, C. C., (1968), "Fine structure and composition of the zoogloeal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*", Journal of Bacteriology, 96: 2144-2153

Gadd, G. M., White, C., De Rome, L., (1988), Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts, Biohydrometallurgy, UK

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B., (1981), Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC 20006.

Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E., Sofer, S. S., (1990), "Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge", Biotechnol. Lett., 11: 839-842

Hartwig, A., (1995), "Current Aspects in Metal Genotoxicity", Biometals, 8:3-11.

Holmes, D. S., Quigley, M., (1981), "A Rapid Boiling Method for The Preparation of Bacterial Plasmids", Anal. Biochem., 114: 193.

Huang, C. P., Morehart, A. L., (1990), "The removal of Cu (II) from dilute aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*", Water Res., 24: 433-439

Hughes, M. N., Poole, R. K., (1989), *Metals and microorganisms*, Chapman and Hall, New York, N. Y.

Hutzinger, O., (1980), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Heidelberg, Germany.

Ikeda, F., Shuto, H., Saito, T., Fukui, T., Tomita, K., (1982), "An Extracellular Polysaccharide Produced by *Zoogloea ramigera* 115", *European Journal of Biochemistry*, 123:437-445.

International Agency for Research on Cancer, European Union.

Itzigsohn, H., (1867), "Entwicklungsvorgänge von *Zoogloea*, *Oscillatoria*, *Synedra*, *Staurastrum*, *Spiriotaenia* und *Chroolepus*", *Sitzungs-Berichte der Gesellschaft naturforschender Freunde*, 19 November, Berlin.

Kratochvil, D., Volesky, B., (1998), "Advances in The Biosorption of Heavy Metals", *Tib. Tech.*, 16:291-300.

Kuyucak, N., Volesky, B., (1988), "Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions", *Biotechnol. Lett.*, 10: 137-142

Lane, T. W., Morel, F. M. M., (2000), "A biological function for cadmium in marine diatoms", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:4627-4631.

Leusch, A., Holan, Z. R., Volesky, B., (1995), "Biosorption of Heavy Metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by Chemically-Reinforced Biomass of Marine Algae", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 62:279-288.

Lovely, D., R., Phillips, E., J., P., Gorby, Y., A., Landa, E., R., (1991), "Microbial Reduction of Uranium", *Nature*, 350:413-416.

Lovely, D., R., Widman, P., K., Woodward, J., C., Phillips, E., J., P., (1993), "Reduction of Uranium by Cytochrome C<sub>3</sub> of *Desulfovibrio vulgarism*", *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 59:3572-3576.

Macaskie, L., E., Dean, A., C., R., (1984), "Cadmium Accumulation by A *Citrobacter* sp.", *J. Gen. Microbiol.*, 130:53-62.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, 0 87969 3096, Cold Spring.

McKinney, R. E., Horwood, M. P., (1952), "Fundamental Approach to The Activated Sludge Process, I. Floc Producing Bacteria", *Sewage and Industrial Wastes*, 24: 117-560.

McKinney, R. E., Weichlein, R. G., (1953), "Isolation of Floc-Producing Bacteria from Activated Sludge", *Applied Microbiology*, 1: 259-261.

McLean, R. J. C., Fortin, D., Brown, D. A., (1996), "Microbial Metal-Binding Mechanisms and Their Relation to Nuclear Waste Disposal", *Can. J. Microbiol.*, 42:392-400.

Meng, S. Y., Bennett, G. N., (1992), "Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH", *J. Bacteriol.*, 174: 2659-2669.

Meng, S. Y., Bennett, G. N., (1992), "Regulation of the *Escherichia coli* cad operon: location of a site required for acid induction", *J. Bacteriol.*, 174: 2670-2678.

Mitra, R. S., Bernstein, I. A., (1978), "Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli*

exposed to  $\text{Cd}^{+2}$ ", J. Bacteriol., 133:75-80

Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Flemming, C. A., Bailey, G. W., (1989), "Bacterial Sorption of Heavy Metals", Appl. Environ. Microbiol., 55: 3143-3149

Neely, M. N., Olson, E. R., (1996), "Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine", J. Bacteriol., 178: 5522-5528.

Nicotera, P., Zhiyotosky, B., Orrenius, S., (1994), "Nuclear Calcium Transport and The Role of Calcium in Apoptosis", Cell Calcium, 16: 279-288.

Nies, D. H., (1999), "Microbial Heavy Metal Resistance", App. Microbiol. Biotechnol., 51: 730- 750.

Niu H., Xu, X., S., Wang, J., H., (1993), "Removal of Lead from Aqueous Solutions by Penicillin Biomass", Biotechnol. And Bioeng., 42:785-787.

Norberg, B., Persson, H., (1984), "Accumulation of Heavy-Metal Ions by *Zoogloea ramigera*", Biotechnology and Bioengineering, 16:239-246.

Nourbakhsh, M., et al., (1994), "A comparative study of various biosorbents for removal of Cr (VI) ions from industrial waste waters", Process Biochem., 29: 1-5

Park, J. K., Jin, Y. B., Chang, H. N., (1999), "Reusable Biosorbents In Capsules From *Zoogloea ramigera* Cells For Cadmium Removal", Biotechnology and Bioengineering, 63: 116-121

Parker, R. C., Seed, B., (1980), "Two-Dimensional Agarose Gel Electrophoresis "Sea plaque" Agarose Dimensions", Methods Enzymol., 65:358.

Parsons, A., Dugan, P., R., (1971), "Production of Extracellular Polysaccharide Matrix by *Zoogloea ramigera*", Applied Microbiology, 21:657-661.

Pazirandeh, M., Chrisey, L. A., Mauro, J. M., Campbell, J. R., Gaber, B. P., (1995), "Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect on heavy-metal uptake", Appl. Microbiol. Biotechnol., 43:1112-1117

Peng, T. Y., Koon, T. W., (1993), "Biosorption of cadmium and copper by *Saccharomyces cerevisiae*", Microb. Util. Renewable Resor. 8: 494-504

Romeyer, F. M., Jacobs, F. A., Brousseau, R., (1990), "Expression of a *Neurospora crassa* metallothionein and its variants in *Escherichia coli*", Appl. Environ. Microbiol. 56:2748-2754

Roselló-Mora, R. A., Wagner, M. Amann, R., Schleifer, K. H., (1995), "The Abundance of *Zoogloea ramigera* in Sewage Treatment Plants", Appl. Environ. Microbiol., 61: 702- 707.

Silver, S., (1991), Bacterial Heavy Metal Resistance Systems and Possibility of Bioremediation, Biotechnology, Bridging Research and Applications, Kluwer Academic Publishers, London.

Silver, S. and Walderhaug, M., (1992), "Gene regulation of plasmid-and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria", Microbiol. Rev. 56: 195-228.

Silver, S., Ji, G., (1994), "Newer Systems for Bacterial Resistance to Toxic Heavy Metals", Environ. Health Perspect., 102:107-113.

Simmons, P., Singleton, I., (1996), "A Method To Increase Silver Biosorption by An

Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 45:278-285.

Steward, F. C., et al, (1963), Plant Physiology, Vol. III, Academic Press.

Stoll, A., Duncan, J. R., (1996), "Enhanced Heavy Metal Removal From Waste Water By Viable, Glucose Pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells", Biotechnol. Lett., 18:1209-1212.

Strandberg, G. W., Shumate II, S. E., Parrott, Jr, J. R., (1981), "Microbial cells as biosorbent for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*", Applied and Environmental Microbiology, 41: 237-245

Sun, Y., Wong, M. D., Rosen, B. P., (2001), "Role of Cysteiny Residues in Sensing Pb(II), Cd(II), and Zn(II) plasmid p1258 CadC repressor", J. Biol., Chem., 18:14955-14960

Tago, Y., Aida, K., (1977), "Exocellular Mucopolysaccharide Closely Related To Bacterial Flocc-Formation", Applied and Environmental Microbiology, 34:308-314

Thévenod, F., Jones, S. W., (1992), "Cadmium Block of Calcium Current in Frog Sympathetic Neurons", Biophysics Journal, 63: 162-168.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., (1989), Microbiology An Introduction, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 390 Bridge Parkway, Redwood City, California, USA.

Wang, C. L. et al, (1999), "Cadmium Precipitation by *Escherichia coli* Producing Cysteine Desulfhydrase", Applied and Environmental Microbiology

Watson, N., Dunyak, D. S., Rosey, E. L., Slonczewski, J. L., Olson, E. R., (1992), "Identification of Elements Involved in Transcriptional Regulation of The *Escherichia coli* *cad* operon by external pH", J. Bacteriol., 174: 530-540.

Weislander, L., (1979), "A Simple Method to Recover Intact High Molecular Weight RNA and DNA after Electrophoretic Separation in Low Melting Temperature Agarose Gels", Anal. Biochem., 98:305.

Wilhelmi, B. S., Duncan, J. R., (1995), "Metal Recovery From *Saccharomyces cerevisiae* Biosorption Columns", Biotechnol. Lett., 17:1007-1012.

Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., Smith, G. H., (1917), "The Families and Genera of The Bacteria. Preliminary report of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types", Journal of Bacteriology, 2: 505-566.

Wong, M. F., Chua H., Lo, W., Leung, C. K., Yu, P. H. F., (2001), "Removal and recovery of copper (II) ions by bacterial biosorption", Applied Biochemistry and Biotechnology, 93:447-457

Wong, P. K., So, C. M., (1993), "Copper Accumulation by A Strain of *Pseudomonas putida*", Microbios., 73:113-121.

Valentine, N. B., Bolton, H. Jr., Kingsley, M. T., Drake G. R., Balkwill D. L., Plymate, A. E., (1996), "Biosorption of Cadmium, Cobalt, Nickel and Strontium by *Bacillus simplex* Strain Isolated from The Vadose Zone", J. Indust. Microbiol., 16:189-196.

Vegliò, F., Beolchini, F., Gasbarro, A., (1997), "Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobactersp.*", Process Biochemistry, 32:99-105

Vegliò, F., Beolchini, F., (1997), "Removal of metals by biosorption: a review", *Hydrometallurgy*, 44:301-316

Volesky, B., Kuyucak, N., (1988), Biosorbent for gold, US Patent, 4,769,233.

Volesky, B., Holan, Z. R., (1995), "Biosorption of Heavy Metals", *Biotechnol. Prog.*, 11:235-250.

Volesky, B., May-Phillips, H. A., (1995), "Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42:797-806.

Yakubo, N., A., Dudeney, A., W., L., (1986), "Biosorption of Uranium with *Aspergillus niger*. In: Immobilization of Ions by Biosorption. Eccles, H. And S. Hunt, Eds., Ellis Horwood, Chichester.

Zouboulis, A. I., Solari, P., Matis, K. A., Stadilis, G. A., (1995), "Toxic Metals Removal from Dilute Solutions by Biosorptive Flotation", *Wat. Sci. Tech.*, 32:211-220.

Zvirbulis, E., Hatt, H. D., (1967), "Status of The Generic Name *Zoogloea* and Its Species", *International Systematic Bacteriology*, 17: 11-12

## INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.digitalnaturopath.com/cond/C514041.html#G563>
- [2] <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/phs8808.html>
- [3] <http://gophisb.biochem.vt.edu/brarg/brasym96/malekzadeh96.htm>
- [4] [http://www.chemsoc.org/viselements/pages/data/cadmium\\_data.html](http://www.chemsoc.org/viselements/pages/data/cadmium_data.html)
- [5] [http://www.imm.ki.se/edu\\_project.html](http://www.imm.ki.se/edu_project.html)
- [6] <http://www.enviroturn.com>
- [7] <http://www.beids.lt/Naujienos/Projektai/26.htm>
- [8] <http://www.umweltbundesamt.de/whocc/AHR10/II-HM-3.htm>
- [9] <http://www.flyash.org/2001/ashpdf/092.pdf>
- [10] [http://www-ssrl.slac.stanford.edu/pubs/activity\\_rep/ar97/IE37-DeWitt.pdf](http://www-ssrl.slac.stanford.edu/pubs/activity_rep/ar97/IE37-DeWitt.pdf)
- [11] <http://www.rycomusa.com/aspp2000/public/M10/1101.html>
- [12] [http://www.biology.sdu.dk/gb/research\\_groups/ecotox/gruppe.html](http://www.biology.sdu.dk/gb/research_groups/ecotox/gruppe.html)
- [13] <http://www.adbio.com/bioremediation/bioremediation-section/advantages.htm>
- [14] <http://www.acs-analytical.duq.edu/AMC219papers1-244.pdf>
- [15] <http://www.dsmz.de/strains/no000287.htm>
- [16] <http://www.dsmz.de/media/med001.htm>
- [17] <http://www.dsmz.de/strains/open.htm>

**ÖZGEÇMİŞ**

|               |            |                                                                                                 |
|---------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Doğum tarihi  | 02.07.1977 |                                                                                                 |
| Doğum yeri    | İstanbul   |                                                                                                 |
| Lise          | 1987-1994  | Özel Moda Lisesi                                                                                |
| Lisans        | 1994-2000  | İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi<br>Biyoloji Bölümü                                          |
| Yüksek Lisans | 2000-2003  | Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü<br>Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programı |

**Çalıştığı kurum**

2000-Devam ediyor YTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Araştırma Görevlisi

