

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞIR METALLERİN *Pseudomonas aeruginosa*'DA DİRENÇLİLİK, PİGMENT  
ÜRETİMİ ve ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DUYGU (ÖZCAN) GÜÇLÜ**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**MALATYA  
NİSAN 2019**

**Tezin Başlığı:** Ağır Metallerin *Pseudomonas aeruginosa*'da Dirençlilik, Pigment Üretimi ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması

**Tezi Hazırlayan:** Duygu (ÖZCAN) GÜÇLÜ

**Sınav Tarihi:** 26.04.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri**

**Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Dilek ASMA** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Numan YILDIRIM** .....  
Munzur Üniversitesi

**Prof. Dr. Elif APOHAN** .....  
İnönü Üniversitesi

**Dr. Öğretim Üyesi Engin GÜRTEKİN** .....  
Fırat Üniversitesi

**Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL**  
Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “Ağır Metallerin *Pseudomonas aeruginosa*'da Dirençlilik, Pigment Üretimi ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Duygu (ÖZCAN) GÜÇLÜ

*Her zaman yanımda olan canım AİLEM,  
EŞİM ve kızım AYŞENİL, oğlum ALİ NAIM'ime;*



# ÖZET

Doktora Tezi

AĞIR METALLERİN *Pseudomonas aeruginosa*'DA DİRENÇLİLİK, PİGMENT ÜRETİMİ ve ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu (ÖZCAN) GÜÇLÜ

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

142+ xv sayfa

2019

Danışman: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Dünyadaki hızlı nüfus artışı, endüstriyel alanın hızla gelişmesine yol açmıştır. Endüstriyel faaliyetlerin yaygın olarak kullanımının artması çevredeki ağır metallerin de hızla artmasına yol açmaktadır. Ağır metaller çevreye özellikle hayvanlara ve insanlara ciddi toksik etkilere sebep olmaktadır. Biyoremediasyonla, ağır metallerin endüstriyel atık sularından veya ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş çevresel su kaynaklarından giderimi ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde çeşitli algler, bakteriler ve fungus gibi mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların çok yüksek bir biyosorpsiyon kapasitesi sunmaları, sahip oldukları biyomoleküllerin yüksek bir metal ilgisinin varlığıdır. Bu amaçla çalışmamızda, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi kullanılmıştır. Farklı doz ve pH (5,7,9) derecelerinde  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  ağır metallerinin kullanılmasıyla *P. aeruginosa* bakterisinin metal dirençliliği, pigment üretimi ve antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon) üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda; *P. aeruginosa* stres koşullarında, antimikrobiyal etki gösteren önemli bir sekonder metabolit olan piyosiyenin-piyoverdin gibi pigment

üretmiştir. Ağır metallerin etkisiyle, pigmentler başlangıç konsantrasyonunda olumlu etki gösterirken, giderek artan konsantrasyonda olumsuz etki göstermiştir. Sonuçta çeşitli dozlarda  $Mn^{2+}$  bulunan *Pseudomonas* Broth P besiyerinde piyosiyanın miktarında; pH 5 'de pigment üretiminde azalış, pH 7'de ve 9'da artış olduğu görülmüştür.  $Ni^{2+}$  metalinde; pH 5 ve 7'de azalış, pH 9'da ise artış gözlenmiştir.  $Cd^{2+}$  metalinde her üç metalde de pigment üretiminde artış gözlenmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa*'nın enzim ve metal biyosorpsiyon aktivitesinde de avantaj sağladığı görülmüştür. Sonuçta; SOD aktivitesinde, *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında dört metalde de kontrol grubuna göre azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde mangan (42.78 U/mg protein) kontrole (52.75 U/mg protein) yakın bir aktivite gösterirken, kurşunda (32.67 U/mg protein) ise daha düşük bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Pseudomonas aeruginosa*, ağır metal stresi, biyosorpsiyon, pigment, piyosiyanın, enzim, dirençlilik.

## ABSTRACT

Doctorate Thesis

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HEAVY METALS ON *Pseudomonas aeruginosa* RESISTANCE, PIGMENT PRODUCTION AND ANTIOXIDANT SYSTEM

DUYGU (ÖZCAN) GÜÇLÜ

Inonu University  
Institute of Science  
Department of Biology

142+ xv Pages

2019

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Rapid growth in population has generated fast moving industrial area in the world. Extensive usage of industrial activities cause increase of heavy metal pollution. Heavy metal has serious toxic effects on environment, especially on human and animals. Nowadays an intensive work has been started to annihilate heavy metals from industrial waste water and polluted environmental water via bioremediation process. In bioremediation method, several types of microorganisms like algae, bacteria and fungus are used. The fact that these microorganisms present a very high biosorption capacity is the presence of a high metal interest in the biomolecules they have. For this purpose, we used *P. aeruginosa* bacteria in our study. We planned to investigate the effects of *P. aeruginosa* on metal resistance, pigment production and antioxidant defense systems (superoxide dismutase, catalase, glutathione) by using  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  heavy metals at different doses and pH (5,7,9) degrees.

As a result of our study; *P. aeruginosa* under stress condition produced pigment like pyocyanin-pyoverdine, which is an important secondary metabolite with an antimicrobial effect. Due to the effect of heavy metals, the pigments showed a positive effect at the initial concentration and had a negative effect on increasing concentrations. It is observable that *P. aeruginosa* also has an advantage in enzyme and metal biosorption activity. In the amount of pyocyanin in *Pseudomonas* Broth P medium with various doses of  $Mn^{2+}$ ; the decrease in pigment production at pH 5 was observed to increase at pH 7 and 9. Decrease in pH 5 and 7 and increase in pH 9 were observed. In  $Cd^{2+}$  metal, an increase in pigment production was observed in all three metals. In addition, *P. aeruginosa* has an advantage in enzyme and metal biosorption activity. The result; In SOD activity, *P. aeruginosa* bacteria were found to be decreased in all four metals after 24 hours of metal application compared to the control group. In four metals, manganese (42.78 U / mg protein) showed close activity to control (52.75 U / mg protein) while lead (32.67 U / mg protein) showed a lower enzyme activity. No activity was recorded in the bacteria after the application of cadmium metal.

**KEY WORDS:** *Pseudomonas aeruginosa*, heavy metal stress, biosorption, pigment, pyocyanin, enzyme, resistivity.



## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemedeni beni yönlendiren danışman hocam İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Her türlü desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan ikinci danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Aysel ALKAN UÇKUN ve değerli eşi Dr. Öğretim Üyesi Miraç UÇKUN'a,

Laboratuvar imkanlarından faydalandığım, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA'ya,

Yardım ve desteklerinden dolayı İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e ve Ahmet ULU'ya,

Çalışmanın yürütülmesinde proje desteğinden dolayı İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (proje no: 2017/981),

Ayrıca beni maddi ve manevi açıdan destekleyen ve bugüne gelmemi sağlayan canım annem Güler ÖZCAN, canım babam Vahap ÖZCAN ve kardeşlerim Ali, Tuba ve Tülay ÖZCAN'a, kuzenim Tayfun ÖZCAN'a,

Son olarak da bana inanan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Eftal GÜÇLÜ'ye, bu zor süreçte benim hayat enerjilerim kızım AYŞENİL ve oğlum ALİ NAİM'e

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Ağır Metal.....	2
1.1.1. Kadmiyum .....	5
1.1.2. Kurşun.....	6
1.1.3. Nikel.....	7
1.1.4. Mangan .....	8
1.2. Stres ve Ağır Metal Stresi.....	8
1.3. Metallerin Mikroorganizma Üzerine Etkisi .....	10
1.3.1. Mikroorganizmaların metallere karşı direnç mekanizmaları.....	10
1.4. Biyobirikim.....	12
1.5. Biyosorpsiyon .....	12
1.5.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları .....	15
1.5.2. Biyosorpsiyonu etkileyen faktörler .....	19
1.6. <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri .....	19
1.6.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın genel özellikleri.....	22
1.7. Sekonder Metabolitler.....	26
1.7.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın sekonder metabolitleri .....	27
1.7.1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pigment üretimi.....	29
1.7.1.1.1. Piyosiyanin.....	30
1.7.1.1.2. Piyoverdin (Flouressein).....	31
1.7.1.1.3. Piyorubin.....	32
1.7.1.1.4. Piyomelanin.....	32
1.8. Serbest radikaller .....	32
1.8.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	33

1.9. Antioksidanlar .....	35
1.9.1. Endojen antioksidanlar .....	36
1.9.1.1. Enzim olan endojen antioksidanlar .....	36
1.9.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	36
1.9.1.1.2. Katalaz.....	37
1.9.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar .....	38
1.9.1.2.1. Glutasyon (GSH).....	38
1.9.2. Eksojen antioksidanlar .....	38
1.9.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar .....	38
1.9.2.2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar .....	39
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	49
3.1. Araştırmalarda Kullanılan Bakteri ve Saklanma Koşulları.....	49
3.2. Araştırmalarda Kullanılan Besiyerleri .....	49
3.3. Araştırmalarda Kullanılan Metaller .....	50
3.4. Kültür Koşulları .....	51
3.5. <i>P. aeruginosa</i> Bakterisinin Üreme Eğrisinin Belirlenmesi.....	51
3.6. Pigment Analizi Tayini .....	52
3.6.1. Piyosiyenin analizi .....	52
3.6.2. Piyoverdin analizi.....	52
3.6.3. Piyorubin analizi.....	53
3.6.4. Piyomelanin analizi.....	53
3.7. Toplam Protein Miktarı Tayini .....	53
3.8. Enzim Aktivite Tayini.....	54
3.8.1. Katalaz aktivitesinin ölçümü.....	55
3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü.....	55
3.8.3. Toplam glutasyon (GSH) miktarı .....	55
3.9. Metal Dirençlilik Tayini .....	56
3.9.1. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması.....	56
3.9.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın belirlenen metal derişimlerdeki direnç tespiti.....	56
3.9.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) tayin metodu .....	56
3.9.4. Biyobirikim deneyleri .....	57
3.9.5. Besiyerinde kalan metal miktarı .....	57

3.9.6. Hücre yüzeyinde emilim-tutunma.....	57
3.9.7. Hücre içinde birikim .....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	59
4.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Üreme Eğrisinin Belirlenmesi .....	59
4.2. Metal Uygulama Sonrası Pigment Analiz Tayini.....	61
4.2.1. Piyosiyanın analizi .....	62
4.2.1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $MnCl_2$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi.....	63
4.2.1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $NiCl_2$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi.....	66
4.2.1.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $CdSO_4$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi.....	69
4.2.1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $PbCl_2$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi.....	72
4.2.2. Piyoverdin analizi.....	75
4.2.2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $MnCl_2$ içeren ortamda piyoverdin üretimi.....	75
4.2.2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $NiCl_2$ içeren ortamda piyoverdin üretimi.....	78
4.2.2.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $CdSO_4$ içeren ortamda piyoverdin üretimi.....	81
4.2.2.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $PbCl_2$ içeren ortamda piyoverdin üretimi.....	84
4.2.3. Piyorubin analizi.....	86
4.2.3.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $MnCl_2$ içeren ortamda piyorubin üretimi.....	87
4.2.3.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $NiCl_2$ içeren ortamda piyorubin üretimi.....	90
4.2.3.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $CdSO_4$ içeren ortamda piyorubin üretimi.....	93
4.2.3.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $PbCl_2$ içeren ortamda piyorubin üretimi.....	96
4.2.4. Piyomelanin analizi.....	99
4.2.4.1. Piyomelanin kontrol grubu.....	99
4.2.4.2. $MnCl_2$ içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi.....	100
4.2.4.3. $NiCl_2$ içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi.....	101
4.2.4.4. $CdSO_4$ içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi.....	102
4.2.4.5. $PbCl_2$ içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi.....	103
4.3. Metal Uygulama Sonrası Enzim Aktivite Tayini.....	104
4.3.1. Metal uygulama sonrası SOD aktivitesi.....	104
4.3.2. Metal uygulama sonrası KAT aktivitesi.....	105
4.3.3. Metal uygulama sonrası toplam glutatyon miktarı .....	106
4.4. Metal Dirençlilik Tayini .....	108
4.4.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın metal toleransının tespiti .....	108
4.4.2. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) tayini .....	110

4.4.3. Biyobirikim deneyleri .....	111
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	113
5.1. Ağır Metal Uygulamasının <i>P. aeruginosa</i> 'nın Üreme Potansiyeli Üzerine Etkisi .....	113
5.2. Ağır Metal Uygulamasının Pigment Üretimi ve Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması .....	116
5.3. Ağır Metal Uygulamasının Metal Dirençliliği Üzerine Etkisinin Araştırılması .....	120
KAYNAKLAR .....	126
ÖZGEÇMİŞ .....	142



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Ağır metallerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2. Ağır metallerin hücre içi etkileri .....	5
Şekil 1.3. Stres sınıflandırılması.....	9
Şekil 1.4(a-b). Biyosorpsiyon mekanizması (a) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırılmış (b) Metal alımının gerçekleştiği bölgelere göre sınıflandırılmış.....	17
Şekil 1.5. <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin genel görüntüsü.....	23
Şekil 1.6. <i>P.aeruginosa</i> 'nın elektron mikroskop görüntüsü.....	23
Şekil 1.7. <i>P. aeruginosa</i> PAO1'in genom dizisi.....	24
Şekil 1.8. <i>P. aeruginosa</i> 'nın ürettiği piyosiyanın molekülü a) nötr veya bazik pH'ta zwitteriyon olarak davranır ve mavi renklidir b) asidik ortamda ise kırmızı renklidir.....	31
Şekil 1.9. Reaktif oksijen türleri.....	34
Şekil 1.10. SOD etkinliği.....	37
Şekil 1.11. Katalaz etkinliği.....	37
Şekil 3.1. Enzim aktivite tayininde işlem sırası.....	54
Şekil 4.1. a) <i>P. aeruginosa</i> 'nın $MnCl_2$ uygulama sonrası üreme potansiyeli.....	59
Şekil 4.1. b) <i>P. aeruginosa</i> 'nın $NiCl_2$ uygulama sonrası üreme potansiyeli.....	60
Şekil 4.1. c) <i>P. aeruginosa</i> 'nın $CdSO_4$ uygulama sonrası üreme potansiyeli.....	60
Şekil 4.1. d) <i>P. aeruginosa</i> 'nın $PbCl_2$ uygulama sonrası üreme potansiyeli.....	61
Şekil 4.2. Piyosiyanın pigmenti.....	62
Şekil 4.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm $MnCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. ....	63
Şekil 4.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm $MnCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. ....	64
Şekil 4.5. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm $MnCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	65
Şekil 4.6. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm $NiCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	66
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm $NiCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	67
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm $NiCl_2$ içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	68

<b>Şekil 4.9.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	69
<b>Şekil 4.10.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	70
<b>Şekil 4.11.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	71
<b>Şekil 4.12.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	72
<b>Şekil 4.13.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	73
<b>Şekil 4.14.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi.....	74
<b>Şekil 4.15.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	75
<b>Şekil 4.16.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	76
<b>Şekil 4.17.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	77
<b>Şekil 4.18.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	78
<b>Şekil 4.19.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	79
<b>Şekil 4.20.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	80
<b>Şekil 4.21.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	81
<b>Şekil 4.22.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	82
<b>Şekil 4.23.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	83
<b>Şekil 4.24.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	84
<b>Şekil 4.25.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	85

<b>Şekil 4.26.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi.....	86
<b>Şekil 4.27.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	87
<b>Şekil 4.28.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	88
<b>Şekil 4.29.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	89
<b>Şekil 4.30.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	90
<b>Şekil 4.31.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	91
<b>Şekil 4.32.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	92
<b>Şekil 4.33.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	93
<b>Şekil 4.34.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	94
<b>Şekil 4.35.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	95
<b>Şekil 4.36.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	96
<b>Şekil 4.37.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	97
<b>Şekil 4.38.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi.....	98
<b>Şekil 4.39.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın piyomelanin pigmenti kontrol grubu görüntüsü.....	99
<b>Şekil 4.40.</b> a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm MnCl <sub>2</sub> içeren <i>P. aeruginosa</i> 'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.....	100
<b>Şekil 4.41.</b> a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm NiCl <sub>2</sub> içeren <i>P. aeruginosa</i> 'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.....	101
<b>Şekil 4.42.</b> a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm CdSO <sub>4</sub> içeren <i>P. aeruginosa</i> 'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.....	102



<b>Şekil 4.43.</b> a)100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm PbCl <sub>2</sub> içeren <i>P. aeruginosa</i> 'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.....	103
<b>Şekil 4.44.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın MnCl <sub>2</sub> , PbCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> ve CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası SOD enzim aktivitesi. CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrasında aktivite gözlenmemiştir.....	105
<b>Şekil 4.45.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın MnCl <sub>2</sub> , PbCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> ve CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası KAT enzim aktivitesi. CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrasında aktivite gözlenmemiştir.....	106
<b>Şekil 4.46.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın MnCl <sub>2</sub> , PbCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> ve CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası TGSH miktarı. CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrasında herhangi bir değer gözlenmemiştir.....	107
<b>Şekil 4.47.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın PbCl <sub>2</sub> metal uygulama sonrası canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafiği.....	108
<b>Şekil 4.48.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın PbCl <sub>2</sub> metal uygulama sonrası üreme potansiyeli ...	109
<b>Şekil 4.49.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafiği.....	109
<b>Şekil 4.50.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası üreme potansiyeli..	110
<b>Şekil 4.51.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın PbCl <sub>2</sub> metal uygulama sonrası MIC değeri (mavi çizgi).....	110
<b>Şekil 4.52.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın CdSO <sub>4</sub> metal uygulama sonrası MIC değeri (yeşil çizgi).....	111

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. Mikroorganizmalar ve metal biyosorpsiyon çeşitleri.....	15
Çizelge 1.2. Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türleri.....	34
Çizelge 3.1. Besiyeri ve çözeltiler.....	49
Çizelge 3.2. Metal isimleri ve MA'sı, tuz formlarının kimyasal formülü ve MA'sı..	50
Çizelge 4.1. Metallerin pigmentler üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın $MnCl_2$ , $PbCl_2$ , $NiCl_2$ , ve $CdSO_4$ metal uygulama sonrası SOD, KAT enzim aktivitesi ve TGSH miktarı.....	104
Çizelge 4.3. Kurşun metali uygulama sonucunda atomik adsorbsiyon sonuçları...	112
Çizelge 4.4. Kadmiyum metali uygulama sonucunda atomik adsorbsiyon sonuçları...	112



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B.thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EPS	Ekzopolisakkarit
YYA	Yeterli yoğunluk algılaması
PA	<i>Pseudomonas</i> agar
PCA	Plate Count agar
PBP	<i>Pseudomonas</i> Broth P besiyeri
EPS	Ekstrasellüler Polisakkarit Tabaka
ppm	Milyonda bir birime verilen isim
OD	Optik Dansitite
AAS - ABS	Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
GSH	Glutatyon
GSH-R	Glutatyon redüktaz
GST	GlutatyonS-transferaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
SOD	Süperoksit dismutaz
KAT	Katalaz
RO <sup>·</sup>	Alkoksil
ROO <sup>·</sup>	Peroksil
ROOH	Lipid hidroperoksitler
NO	Nitrik oksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Süperoksit radikali
·OH	Hidroksil radikali
NaOH	Sodyum hidroksil
HCl	Hidroklorik asit
EDTA	Etilendiamintetra asetik asit
LC <sub>50</sub>	% 50 öldüren metal doz
U	Unite

## 1.GİRİŞ

Dünyadaki hızlı nüfus artışı, endüstriyel alanın hızla gelişmesine yol açmıştır. Bu gelişim doğal dengenin bozulmasına, çeşitli çevresel ve sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Çoğu mikroorganizma çevresel ve sağlık sorunlarına sebep olmaktadır. Mikroorganizmalar sorunlara sebep olurken aynı zamanda bu sorunların gideriminde de etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

“Mikroorganizma” terimi bakteri, fungus, alg ve protozoaları da içeren mikrobeyutlardaki geniş yelpazede birçok canlıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. Bakteriler bunlar arasında ve hatta tüm canlılar arasında yerküre üzerinde en çok sayı ve çeşit içeren mikroorganizmalardır. Yapılan çalışmalar, dünyamızda farklı türde bakteri olabileceğini göstermektedir. Bakterilerin bazıları patojenik özellik gösterirken, bazıları ise bu özelliği göstermezler. Mikroorganizmalar ortamdaki atık organik maddeleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmakta ve yeni organik maddelere dönüştürebilmektedirler. Bu organik maddeler dönüşümden sonra ortama verilerek başka organizmaların besin ve enerji kaynağını oluşturmaktadır (Bruins vd., 2000a; Chang vd.,1997; Kerry, 1993;). Ancak günümüzde bu doğal denge olumsuz yönde bozulmuştur. İnsanoğlu ilerde sağlıklı bir yaşam ve daha temiz bir gelecek için ya atık üretimini azaltmalı ya da çevresel kirliliğe neden olan maddeleri ortamdaki uzaklaştırmalıdır. Son zamanlarda çevresel kirliliğin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla mikroorganizmaların biyoparçalayabilirlik özelliğinden yararlanılmaktadır (Lehay ve Colwell, 1990). Mikroorganizmaların bu özellikleri çeşitli dış faktörlerden etkilenmektedir (Gülcan, 2006).

Sudaki ağır metal kirliliği, endüstriyel atıksuların bırakılması sonucu oluşmakta ve bu da sucul ekosistemleri tehdit eden en önemli sorun haline gelmektedir (Rajendran vd., 2003). Endüstriyel faaliyetlerin yaygın olarak kullanımının artması çevredeki ağır metallerin de hızla artmasına yol açmaktadır. Ağır metaller çevreye özellikle hayvanlara ve insanlara ciddi toksik etkilere sebep olmaktadır (Singh vd., 2012). Metaller diğer zararlı kirleticilerden farklı olarak canlı dokular içerisinde birikebilir. Sonuç olarak, metaller besin zincirinde yoğun olarak bulunup üst basamaklara doğru gitgide artmaktadır.

Gerek saprofit ve gerekse patojen mikroorganizmalar arasında pigment adı verilen renkli maddeler oluşturabilen türler vardır. Bunlar katı ortamlarda üretildikleri zaman cinslerine ve türlerine özel renkte koloniler oluştururlar.

*Pseudomonas aeruginosa*; bakteriler arasında bilinen en etkin pigment üreten bakteridir (Özcan, 2011).

Serbest oksijen radikalleri (SOR), eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Bunların gideriminde antioksidan enzim sistemi kullanılmaktadır. Antioksidanlar, organizmaların pro-oksidan/antioksidan dengesinin sağlanmasında ve sağlıklı bir yaşam sürdürülmesinde çok önemlidir. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan "antioksidan savunma sistemi" vardır ve bu sistem çeşitli yollarla etki göstermektedir. Bunlardan bazıları, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimidir (Torlak, 2014).

Çeşitli ağır metallerin kullanılmasıyla yapacağımız çalışmada; *P. aeruginosa* bakterisinin dirençliliği, pigment üretimi ve antioksidan savunma sistemleri üzerine ağır metalin etkisi araştırılacaktır. *P. aeruginosa* bakterisi üzerine ağır metal kullanılarak yapılan çalışmaların sayısı çok azdır. Bu tez çalışmasında da bakterinin dirençliliği, pigment üretimi ve antioksidan enzimleri analiz edilecektir. Araştırma konusu tümü ile orijinal olup ülkemiz ve dünya bilimine katkı sağlayacaktır.

## **1.1. Ağır Metal**

Periyodik tabloda fiziksel özellikleri bakımından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$  ten daha yüksek olan oda sıcaklığında cıva hariç katı halde bulunan, ısı ve elektriği ileten, plaka ve tel haline gelebilen, metalik bir renk parlaklığı olan, elektron vererek (+) değerlikli iyon durumuna geçebilen, asitlerde mevcut olan hidrojen (H) iyonları ile yer değiştirebilen metaller ağır metal olarak adlandırılır (Nies, 1999). Tıpta ise ağır metal tanımı, elementlerin atomik ağırlıklarına bakılmaksızın tüm toksik özelliği taşıyan metaller olarak tanımlanır (Özbolat ve Tuli, 2016). Bu grup kadmiyum, nikel, kurşun, mangan, demir, krom, kobalt, bakır, cıva ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal elementini içermektedir (Hu., 2000; Türkmen vd., 2001).

Ağır metaller (metaloitler) biyolojik veya kimyasal olarak parçalanamadıkları için bertaraf edilmesi en zor kirleticiler arasındadır. Farklı kirleticiler arasında ağır metaller hala önemli bir problemdir (Chiado vd., 2013; Işık, 2017). Yıllık olarak tabii çevrim ve beşeri faaliyetler sonucunda tonlarca ağır metal atmosfere karışmaktadır.

Kalsiyum, bakır, krom, demir, sodyum, potasyum, magnezyum, mangan, nikel, çinko gibi bazı metal elementleri esansiyeldir ve besinsel rollere sahiptirler.

Gümüş, alüminyum, kadmiyum, kurşun, altın ve civa gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel özellik göstermezler (Rajendran vd., 2003). Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonları katalizlemek, gen ekspresyonunu düzenlemek, protein ve bakteri hücre duvar yapısını stabilize etmek, osmotik dengeyi korumak, biyomolekülleri aktive etmek, elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli role sahiptirler (Ehrlich, 1997; Bruins vd., 2000b).

Demir, bakır, nikel gibi esansiyel geçiş metalleri redoks tepkimelerinde rol almaktadırlar. Potasyum ve sodyum hücre içi osmotik basıncın düzenlenmesinde rol alırken, magnezyum ve çinko gibi esansiyel metaller elektrostatik güçleri sayesinde çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize etmektedirler. Demir, nikel, kobalt ve magnezyum düzenleyicilik görevi olan kompleks moleküllerin yapısında bulunmaktadır (Bruins vd., 2000b).

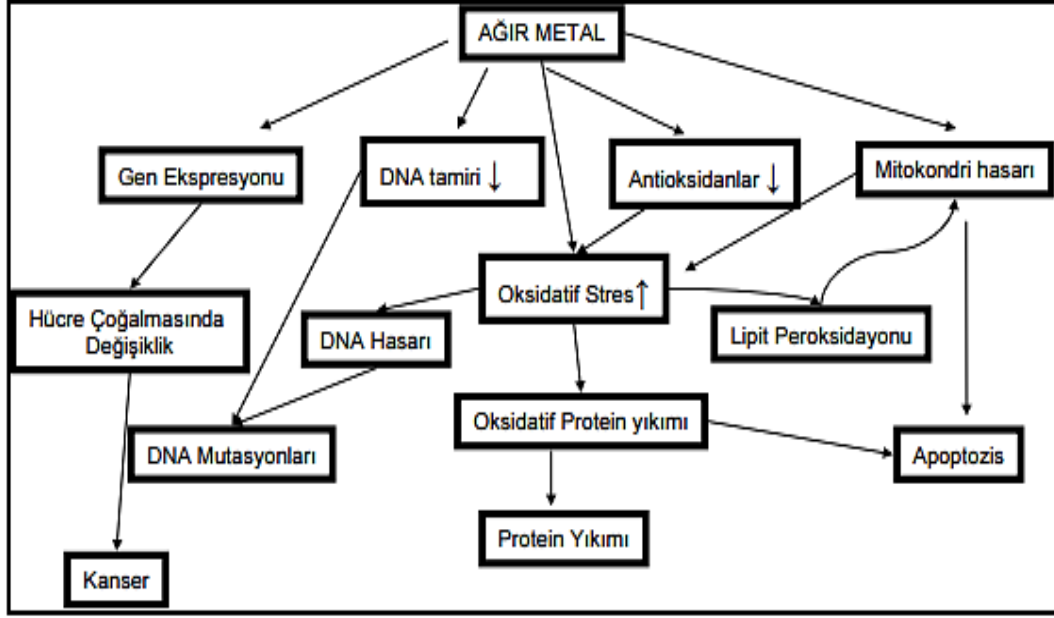
$Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi esansiyel metal iyonlarının yüksek konsantrasyonu ve esansiyel olmayan metal iyonları mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sebep olmaktadır. Esansiyel olmayan metal iyonları, temel gerekli metal iyonlarının bağlandığı doğal bağlanma bölgelerine bağlanarak veya ligandlar ile karşılıklı etkileşime girerek toksik etki meydana getirmektedirler. Bu tür metallerin, tiol (-SH) içeren gruplara veya oksijen bölgelerine olan ilgileri, esansiyel metallerden daha yüksektir (Silver, 1998; Bruins vd., 2000b; Sandrin ve Maler, 2003; Gülcan, 2006).

Ağır metalleri bileşimleri açısından çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Toksisitelerine göre metaller Şekil 1.1'de görüldüğü gibi üç sınıfa ayrılmaktadır (Muneer vd., 2016). Bunlar;

Esansiyel toksik olmayan metaller	• $Mg^{2+}$ ve $Ca^{2+}$
Esansiyel toksik metaller	• $Fe^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Mo^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$
Toksik metaller	• $As^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Cd^{2+}$

**Şekil 1.1.** Ağır metallerin sınıflandırılması

Metal iyonları yüksek konsantrasyonlarda canlılar üzerinde Şekil 1.2’de görüldüğü gibi çeşitli şekillerde toksik etkiye sebep olduğundan canlılarda birçok sağlık sorunları meydana gelmektedir (Matyar ve Akkan, 2010; Kılıç ve Bozkaya, 2017). Toksik etkileri; proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişikliklerin meydana gelmesi, osmotik dengenin bozulması ve oksidatif fosforilasyonu etkilemeleri şeklindedir (Hassen, 1998a; Bruins vd., 2000b; Gülcan, 2006). Bakır; Wilson hastalığı, böbrek fonksiyon yetmezliklerine ve nörolojik rahatsızlıklara, çinko; mide-barsak bozukluklarına, kurşun; beyinde hasar, kansızlık, böbrek yetmezliğine, kadmiyum; çok ciddi solunum yolu hastalıklarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Rajendran vd., 2003; Işık, 2017)



Şekil 1.2. Ağır metallerin hücre içi etkileri (Özbolet ve Tuli, 2016)

### 1.1.1. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum (Cd), yüksek derecede toksik etki gösteren metallere biridir (Chakraborty ve Das, 2014). Ağır metallere kadmiyum (Cd), çinko üretimine eşlik eden element olarak üretilmiştir. Çinko üretiminde kullanımı ortaya çıkıncaya kadar çevrede, yiyeceklerde doğal süreçlerle önemli miktarlarda bulunmamıştır (Alexei vd., 2000). Dünya çapında her yıl 13.000 ton  $Cd^{2+}$  üretimi gerçekleştirilerek çeşitli bileşimler halinde ve çeşitli sektörlerde günlük hayatımızın içerisinde bulunmaktadır. Endüstriyel olarak Ni/Cd pillerde, korozyona karşı olma özelliği deniz koşullarındaki dayanıklılığından dolayı gemi sanayisinde çeliklerin kaplanmasında, PVC stabilizatörü olarak, boya sanayisinde, alaşımlarda ve elektronik sanayide, deterjanlarda, fosfatlı gübrelerde ve petrol türevlerinde yaygın olarak kullanılan metaller arasında yerini almıştır (Alexei vd., 2000). Bunun yanında günümüzde Cd çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında da yerini almıştır (Yuuka vd., 2008). Kadmiyum kirliliği kaynakları arasında boya, galvanik, bakır alaşımları, kağıt hamuru ve kâğıt, alkalik pil, madencilik, gübre ve çinko arıtımı üreten endüstriler bulunmaktadır (Chakraborty ve Das, 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar,  $Cd^{2+}$  maruziyetinin genotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir (Gerene vd., 2003). Kadmiyumun yüksek organizmalar üzerindeki toksik etkileri yaygındır (Chakraborty ve Das, 2014). Meydana gelen



toksik etkiler sonucunda hücrelerde çeşitli dejenerasyon veya transmutasyon meydana gelmektedir (Aytan, 2009). Aynı zamanda kanser gelişiminde rol oynadığı raporlanarak International Agency of Cancer Research tarafından tip 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (Budzikiewicz, 1993; Özcan, 2011; Coşan vd., 2017).

Mikroorganizmalar kadmiyuma karşı çeşitli şekillerde direnç gösterirler. *P. putita* 2,5 mg /l Cd konsantrasyonunu sıvı ortamda % 100 bağlayabilmektedir (Bruins vd., 2000b). *P. aeruginosa*'da Cd<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> gibi belli metaller için ramnolipid gibi sürfektanlar üretirler (Rajendran vd., 2003). Bakteriler membranında çeşitli konformasyonel değişiklikler meydana getirerek metal iyonlarının girişini engellerler. Genelde bakteriler 0,01 den 0,1 nM oranında kadmiyumun düşük konsantrasyonuna dirençlidir. Duyarlı bakteriler dirençli bakterilere göre 3 den 15 kata kadar Cd biriktirebilirler (Bruins vd., 2000b).

Literatür çalışmaları sonucunda Cd'un DNA'da indirekt oksidatif strese neden olarak apoptotik mekanizma indüklenmesi ve DNA onarım mekanizmasının bloklanması, proteinoksidasyonu, lipid peroksidasyon artışı gibi hücre içinde gerçekleşen olayları tetiklemesine sebep olduğu saptanmıştır (Daly vd., 1984; Supriya ve Nutan, 2010). Serbest radikal oluşumunu aktive eder ve lipid peroksidasyonuna karşı savunmada rol oynayan glutatyon peroksidaz enzimini inhibe eder (Chakraborty ve Das, 2014). Ayrıca geçiş metallerinin toksisiteleri genellikle dokuda oksidatif strese neden olarak gerçekleşmektedir. Redoks-aktif metaller (demir, bakır ve krom gibi) redoks döngüsünü hedeflerken, redoks-inaktif metaller (kurşun, kadmiyum, civa gibi) hücredeki reaktif oksijen türevlerinin artışına sebep olarak önemli antioksidanların (özellikle tiyol içeren antioksidanlar ve enzimler) azalmasına neden olurlar (Coşan ve Dal, 2017).

Bu sebeplerden dolayı, Cd'nin çevre ve canlı sistemler üzerindeki toksik etkisi düşünüldüğünde organizmaların Cd'ye maruz kaldıklarında nasıl tepki oluşturacakları hayati öneme sahiptir.

### **1.1.2. Kurşun**

Periyodik cetvelin 4A grubuna ait olan kurşun (Pb) atom sayısı 82, atom değerliliği 207.2 g/mol, özgül ağırlığı 11.34 g/cm<sup>3</sup> ve buharlaşma ısısı 175 °C'dir. 500 °C'nin üzerinde duman/tütsü (füme) verir, kaynama noktası 1740 °C'dir. Doğada, kütle numaraları 208, 206, 207 ve 204 olmak üzere 4 izotopu vardır.

Doğada en çok bulunan kurşun bileşikleri; sülfür içeren galena (PbS), karbonat içeren serüsit (PbCO<sub>3</sub>) ve sülfat içeren anglesittir (PbSO<sub>4</sub>) (Özbolet ve Tuli, 2016). Kısmen zayıf bir iletkenliğe sahip olan kurşun parlak mavimsi, çok yumuşak olduğundan kolayca dövülebilir, şekillendirilebilir bir metaldir. Havayla temas ettiğinde yüzeyi kararırken aşınmaya dayanıklıdır. Yeryüzünde çoğunlukla galen adı verilen kurşun sülfür şeklinde veya Fe, Zn, Cu ve Ag ile bileşik halinde bulunur (Kahvecioğlu ve ark., 2003; Dündar ve Aslan, 2005; Işık, 2017).

Kurşun potansiyel bir zararlı kirleticidir (Kalita ve Joshi, 2017). Tabii şekilde ve endüstride sık kullanımından ötürü çevrede çok bulunur. Çevredeki birincil etkileşim yerleri, benzinin buharındaki kurşun, endüstriyel etkileşim, içme suları ve kurşun içeren besinlerdir. Kurşunun başlıca emilim yolu mide-barsak ve solunum sistemi aracılığı ile olurken, mide-barsak emilimi çocuklarda % 40 ve yetişkinlerde % 10 civarındadır (Baldwin ve Marshall, 1999; Işık, 2017). Ayrıca kurşun proteinler üzerindeki sülfidril, fosfat ya da karboksil gruplarına bağlanarak enzimleri etkisizleştirir. Kalsiyum, çinko ve demir ile etkileşerek hücre zarlarını etkiler, sinirsel iletiyi bozar, hücrenin redoks olaylarını etkiler ve nükleotid metabolizmasını bozarak çoklu sistem hasarına sebep olur (Özbey, 2014; Terzioğlu vd., 2017).

### **1.1.3. Nikel**

Nikel (Ni) ağır metali, periyodik çizelgenin 8. grubunda yer alan, atom sayısı 28, atom değeri 58.59 g/mol, özgül ağırlığı 8.90 g/cm<sup>3</sup>, buharlaşma ısı 2913 °C olan gümüş-beyazı renkte oldukça sert bir metaldir. Yer kabuğunun yaklaşık % 2'sini oluşturmaktadır (Murathan vd., 2008). Aşınmaya ve paslanmaya karşı dayanıklılığı sebebiyle alkali ve çoğu asidik maddelere oldukça dayanıklıdır. Sert yapısı sayesinde çok sayıda metal karışımının içerisine katılır. Saf veya yarı saf nitelikteki nikelden güçlü bazik çözeltilerine karşı oldukça sağlam olmasından dolayı, para yapımında ve kimya sanayinde kullanılır. Ayrıca, sülünmüş nitrik asitle kolaylıkla çökebilir (Anonim, 2015e; Işık, 2017). Çelik imalatı, elektroliz ile kaplama, alkali pil üretimi, boya ve elektronik madde imalatı gibi alanlarda nikelden yararlanır (Işık, 2017).

İnsanlara nikel en çok, hava, besin ve tütün mamulleri vasıtasıyla geçer. (Özdilek, 2002; Türkmen, 2003; Işık, 2017). Nikel aşırı miktarda vücuda alındığında

kanser riskini artırmasının yanı sıra, akciğerlerde tıkanmaya, solunum yetersizliğine, astım, kronik bronşit gibi hastalıklara neden olmaktadır (Terzioğlu vd., 2017).

#### **1.1.4. Mangan**

Manganın (Mn) yoğunluğu 7,21 g/cm<sup>3</sup>, atom ağırlığı 54.938 g/mol ve atom numarası 25 olan, grimsi metal renkli ve periyodik tabloda 7B grubunda yer alan bir metaldir. Çeliğin dayanımını geliştiren bir alaşım elementi olması ile en önemli metallere biridir (Charlwood vd., 2010). Yer kabuğundaki mangan miktarı 900 mg/kg'dır. Bitkiler manganı topraktan Mn<sup>2+</sup> iyonu formunda veya kompleks oluşturuculara bağlanmış şekilde alırlar (Ishimaru ve ark., 2012; Yıldırım, 2017).

Mangan modern tarımda vazgeçilmez bir gübre içeriği olarak kullanılır. Pek çok enzim için aktivatör olarak iş gören manganez ve süperoksit dismutaz enzimlerinin yapısında yer almaktadır. Mangan indirgenme, yükseltgenme ve dekarboksilasyon gibi hidrolitik tepkimeleri katalizleyen pek çok enzimin aktivasyonunda görev alan bir kofaktördür (Babtie ve ark., 2010). Çok kolay yükseltgendiğinden oksijen içermeyen radikallerin toksik etkilerinin giderilmesinde ve fotosentezde elektron taşınmasında önemli rol almaktadır (Kabata-Pendias ve Mukherjee, 2007; Yıldırım, 2017).

#### **1.2. Stres ve Ağır Metal Stresi**

Stres, bir canlının normal yaşamını tehlikeye sokan, sahip olduğu kapasitesini azaltan veya zorlayan canlı ve çevre arasındaki etkileşim olarak tanımlanmaktadır. Stresin oluşması için, canlının yaşamını sürdürdüğü ortam ve çevrede meydana gelen değişimlerin, canlıyı belli seviyede etkilemesi gerekmektedir. Bu nedenle canlılar stresle baş edebilmek için stres yanıtları oluşturmuşlardır. Stres etkenlerine karşı koymak ve onunla başa çıkmaya çalışmak amacıyla doku ve organ fonksiyonlarında değişimler başlamakta ve homeostasis sürecinden uzaklaşma ile sonuçlanmaktadır. Bu değişimler organizmadan organizmaya değişiklik gösteren ama benzer karakteristiğe sahip fizyolojik yanıtlardır (Dönmez vd., 2006; Özbey, 2014).

Stres çeşitli alanlarda kendi içinde Şekil 1.3'de sınıflandırılmaktadır.

Biyolojik Stresler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mikrobiyal metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora,</li></ul>
Fiziksel Stresler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Isı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok,</li></ul>
Kimyasal Stresler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler.</li></ul>

**Şekil 1.3.** Stres sınıflandırılması (Özbey, 2014)

Baş döndürücü bir hızla gelişen endüstri ve teknolojik ilerlemenin bir sonucu olarak ağır metal kirliliği bugün gelişmekte olan birçok ülkenin en önemli çevresel sorunlarından biri haline gelmiştir. Başlıca kaynağını fosil yakıtların kullanımı, madencilik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, kurşun, batarya, ağır sanayi kuruluşları ve tarımda kullanılan gübreler ve kimyasal ilaçların oluşturduğu (Floreave Büsselberg, 2006) toksik metaller oluşturmaktadır. Bu ağır metallerin biyolojik olarak ortadan kaldırılamaması ve canlı organizmalarda birikebilmelerinden dolayı özellikle hayvan ve insanların da dâhil olduğu birçok canlı grubu için önemli bir risk oluşturmaktadır (Shukla vd., 2010; Ilijin vd., 2010). Endüstriyel ve evsel atık suların arıtım yapılmadan, tarımsal alanlarda sulama suyu olarak kullanılması, toprak verimliliğinden bitki kalitesine varıncaya kadar insanları ve hayvanları gıda zinciri yolu ile etkilemektedir (Leisinger ve Margraff, 1979; Gerene vd., 2003; Yurdakul vd., 2017). Metaloitlerle kirlenmiş bölgelerde toksik maddeler süt çocuklarının çevresel tehditlerle karşılaştıkları tek nokta olan anne sütünde dahi bulunmaktadır (Töreci, 1981; Özbey, 2014; Yurdakul vd., 2017; Kılıç ve Bozkaya; 2017).

Ekosistem üzerinde özellikle ağır metallerin ve organik kirleticilerin neden olduğu stres koşullarından ilk olarak etkilenen canlı grubu bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalardır. Bu organizmalar çevresel strese karşı koyabilmek için savunma cevabında önemli olan genlerin sentezini düzenleme gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Mikroorganizmalar karşılaşmış olduğu strese farklı şekilde karşı koyabilmişlerdir. Bakterilerin zayıf stres olarak adlandırılan sublethal bir stres koşulunda, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Ancak üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır (Dikici, 2009; Özbey, 2014).

### **1.3. Metallerin Mikroorganizma Üzerine Etkisi**

Çevredeki metallerin varlığı erozyon ve volkanik aktiviteler gibi doğal süreçler ve çoğunlukla da endüstriyel atıklar yoluyla oluşmaktadır. Bu metaloitlerin zehir etkileri her canlıya göre farklıdır. Aynı zamanda etki seviyeleri de tür bazında değişkenlik göstermektedir. Ağır metaller besin zincirinde aşağıdan yukarıya doğru her kademedede zehirli etki kalıntısı meydana getirmektedir ve bu kalıntı her kademedede giderek artmaktadır. İnsanlar bu etkiden direkt olarak olmasa da dolaylı şekilde etkilenmektedirler. Ağır metallerin miktarı organizmada birikerek belli dozun üzerine çıkması durumunda zehir etkisine yol açmaktadır. Ortam farklılığına göre birikim dozunun etki süresinin yükseldiği ifade edilmektedir (Kargın ve Erdem, 1991; Işık, 2017). Ağır metaller düşük konsantrasyonlarda (1-10 ppm) toksiklik gösterirler. Civa ve kadmiyum gibi bazı güçlü metal iyonları ise 0.001-0.1 ppm kadar çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik olabilmektedirler (San, 2007).

Esansiyel olsun ya da olmasın tüm metaller yüksek seviyede toksik etki gösterirler. Mikroorganizmalar da bu toksik etkiye karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Metaller, mikroorganizmaların hücre duvarından hücre zarını, sitoplazmasını, metabolizmasını ve hücrenin yapısal işlevlerini bozmak suretiyle olumsuz yönde etkilemektedirler. Alternatif olarak, ağır metaller ayrıca hücre duvarına adsorpsiyon yoluyla veya detoksifiye edici ligandlara, proteinlere veya polimerlere bağlanma yoluyla toksik etki gösterirler (Chakraborty ve Das, 2014). Metabolizma üzerindeki olumsuz etkileri ise; hücre membranının bozulması, DNA tahribi, transkripsiyon ve translasyonun inhibisyonu, hücre bölünmesinin inhibisyonu ve protein denatürasyonu şeklinde olmaktadır (Bruins vd., 2000b).

#### **1.3.1. Mikroorganizmaların metallere karşı direnç mekanizmaları**

Yapılan araştırmalarda bazı metallere dirençli mikroorganizmalar teşhis edilmiştir. Bu mikroorganizmalar genellikle metallere karşı direnç gösteren Gram negatif ve Gram pozitif aerobik bakterilerdir. Bakterilerin metallere karşı direnç mekanizmalarını geliştirmesine yol açan neden, mikroorganizmaların bulunduğu ortamda, toksisiteye sebep olan metalin bulunması ve bu metalin organizma üzerindeki stresidir (Guzzo vd.,1999; Gülcan, 2006). Mikroorganizmalarda metal direncinden sorumlu genler kromozomal DNA veya plazmid de bulunmaktadır. Metal direncinden sorumlu olan pek çok plazmid izole edilmiştir. Antibiyotik direnç

genlerine sahip bakterilerin bazı plazmidlerinin civa ve arsenik direnç genlerini de taşıdığı bildirilmiştir (San, 2007).

Metal direncinin genetik temelini anlaşılmaması, bu sistemleri çevresel uygulamalar için kullanma yeteneğini hızla arttırmaktadır (Bruins vd., 2000b).

Mikroorganizmalar bünyelerine çeşitli yollarla giren metallerin toksisitesinden korunmak amacıyla bir takım savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Özbey, 2014).

Bu savunma mekanizmaları arasında;

Geçirgen bariyer sayesinde, metaller hücre dışında bırakılarak; mikroorganizmanın hücre duvarında ve membranında bazı değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel yapılarını ve içeriğini koruma altına almaktadır. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada bakteri hücre zarı kanal proteini olan porinlerin sayısını azaltarak gümüş iyonlarının hücre içine girişini engellemektedir (Gülcan, 2006).

Bazı bakterilerin doğal olarak sahip oldukları hücre dışı polisakkarit tabaka (EPS), hücre yüzeylerinde metalleri bağlayarak hücreye girmelerini engeller. Bazı bakterilerin metalli ortamda EPS üretimini arttırarak pek çok metal iyonunu bu tabaka sayesinde bağladığı bilinmektedir. Ayrıca siderofor şelat bileşikler de metalleri hücre dışında bağlayarak detoksifiye etmektedirler. Sideroforlar ağır metal toksisitesinde önemli bir role sahiptir (Braud vd., 2010). Siyanobakterilerde bakır toksitesinin hücreden salgılanan siderofor ile azaltıldığı gösterilmiştir (Madigan vd., 1997). Bu nedenle, *P. aeruginosa*'daki siderofor alım yolları çoğunlukla ferrik demir dışındaki metallere karşı geçirimsizdir (Braud vd., 2010).

Mikroorganizmalar metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin uzaklaştırılması şeklinde gerçekleştirmektedirler (Bruins vd., 2000b). Esansiyel olmayan metaller normal olarak besin taşıma sistemleri ile hücre içine girmektedirler ancak hızlı bir şekilde hücre dışına pompalanmaktadır. Bakteriler de toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif taşıma sistemini kullanırlar. ATPaz bağımlı olan veya bağımlı olmayan bu taşıma sistemleri katyon veya anyonlara karşı oldukça spesifiktir (Nies ve Silver, 1995; Silver, 1998; Gülcan, 2006).

İndirgeme olarak bilinen savunma mekanizmasında bazı metaller sıfır değerlikli hale indirgenerek detoksifiye edilmektedir. Örneğin iki değerlikli civa Gram negatif *P. aeruginosa* bakterisinin plazmidinde yer alan *mer* operonu olarak

bilinen genlerle sıfır değerlikli hale indirgenir. Periplazmik  $Hg^{+2}$  bağlayıcı MerP proteini civayı membranda transport proteini olan MerT'ye verir. Sitoplazmada yer alan civa redüktaz enzimi (MerA) civayı indirger. Bu indirgeme sonucunda oluşan sıfır değerlikli civa buharlaşarak hücreyi terk etmektedir. İndirgeme krom detoksifikasyonunda da görülmektedir. Enzim hücre içinde ise krom hücre içinde, enzim hücre membranında ise krom hücreye girmeden hücre dışında indirgenmektedir (Evgen, 2012). Kromat redüktaz olarak adlandırılan enzim altı değerlikli çözünebilir formdaki toksik kromu, çözünemez üç değerlikli forma indirger. İndirgeme sonucu oluşan üç değerlikli krom çözünemediği için hücrelere girip toksik etki gösteremez ve çökerek ortamdaki uzaklaştırılır (Madigan ve Parker, 1997; Özbey, 2014).

#### **1.4. Biyobirikim**

Biyobirikim sadece canlı hücrelerle gerçekleşen adsorpsiyon işlemi olarak adlandırılmaktadır. Canlı hücrelerin kullanılması, biyosorpsiyonda hücrelerin devamlı gelişmesini sağlamak koşuluyla bazı ek uygulamaları gerektirmediğinden diğerlerine göre daha pratik bir yöntemdir. Ancak hücrelerin devamlı gelişmesi sağlanmalıdır (Preetha ve Viruthagari, 2006; Özcan, 2011). Bazı mikroorganizmalar biyobirikim mekanizması ile metalleri membran içinde veya dışında çökelme, kompleksleşme gibi bir takım yüzey reaksiyonları ile bağlarlar (Yüce, 2007). Ökaryot mikroorganizmalar metalleri vakuollerinde biriktirirken, bazı hücreler sentezledikleri Metallothionein benzeri proteinlerle hücre içinde metalleri bağlarlar. Metallothioneinler metal bulunan ortamlarda bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen, küçük moleküler ağırlıklı sisteince zengin protein olarak bilinmektedir (Naik ve Dubey, 2013., Rajendran vd., 2003). Bazı hücreler metal tuzları şeklinde hücrede metalleri çöktürürler (Aksu ve Dönmez, 2000a; Özbey, 2014).

#### **1.5. Biyosorpsiyon**

Ağır metallerin endüstriyel atıksularından veya ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş su kaynaklarından gideriminde çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Ahalya vd., 2003).

Fiziksel yöntemler;

- ✓ Adsorpsiyon
- ✓ İyon değişimi
- ✓ Aktif karbon yöntemi
- ✓ Elektrokinetik koagülasyon

Kimyasal yöntemler;

- ✓ İndirgeme çökeltme
- ✓ Yükseltgeme çökeltme
- ✓ Nötralizasyon çökeltme
- ✓ İyon değişimi

Biyolojik yöntem fiziksel ve kimyasal yöntemlere nazaran çok daha etkili, ekonomik ve pratik bir yöntemdir. Bu nedenle bilimsel araştırmalar biyolojik yöntemin tercih edilmesi yönünde ağırlık kazanmaktadır.

- ✓ Fungal renk giderimi
- ✓ Mikrobiyal parçalanma
- ✓ Ölü ve canlı hücrelerle yapılan adsorpsiyon
- ✓ Biyoremediasyon gibi biyolojik parçalama yöntemleri atık suların ve ağır metallerin biyolojik arıtımında en çok kullanılan yöntemlerdir. Biyolojik arıtım aerobik veya anaerobik şartlarda gerçekleşmektedir (Garbisu ve Alkorta, 2003; Yüce, 2007; Ahalya vd., 2003)

Biyosorpsiyon biyolojik materyallerin sulu çözeltilerdeki atık maddeleri hücre yüzeyi veya içinde biriktirmesidir. Biyolojik yöntemlerde kullanılan ağır metal gideriminde özellikle mikrobiyal hücrelerle yapılan biyosorpsiyon işlemi; metabolizmadan bağımsız pasif birleşme (topaklaşma) proseslerinin ve fiziksel ve/veya kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleksleştirme, şelat oluşumu ve mikro çökeltme işlemlerinin bir araya getirilmesiyle gerçekleştirilen bir yöntemdir (Breierova vd., 2002; Göksungur vd., 2003; Özcan, 2011). Bu yöntemde çeşitli algler, bakteriler ve funguslar kullanılmaktadır (Fourest ve Roux,1992; Brady ve Duncan, 1994; Veglio ve Beolchini, 1997; Sağ vd., 1998; Aksu, 2001; Akar vd., 2006; Çabuk vd., 2006; Tunalı vd., 2006; Özbey, 2014). Metal arıtma yeteneğine sahip olan canlılara biyosorbent denilmektedir (Keloğlu, 2017). Bu mikroorganizmaların çok yüksek bir biyosorpsiyon kapasitesi sunmaları, sahip oldukları biyomoleküllerin yüksek bir metal ilgisinin varlığıdır. Biyosorpsiyon işlemi metabolizma bağımlı bir süreç olduğu için hem ölü (ısıtılarak/kimyasal işlemlerle)



hem de canlı hücrelerde gerçekleşmektedir. Ölü ve canlı hücreler metal giderim bakımından karşılaştırıldığında iyon adsorplama yeteneğinin ölü durumdaki mikroorganizmanın daha yüksek adsorplama kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Biyosorpsiyon çalışmaları enerji bakımından da tasarruf sağlamaktadır. Biyosorpsiyon için harcanan enerji 21 kJ/mol iken, biyobirikim de 63 kJ/mol enerji harcanmaktadır (Keloğlu, 2017; Le Berre vd., 2008).

Biyosorpsiyonun bazı avantajları (Kratochil vd., 1998; Ahalya vd., 2003)

- ✓ Düşük maliyet
- ✓ Yüksek verim
- ✓ Kısa sürede sonuç alınabilmesi
- ✓ Biyokütlenin tekrar kullanılması
- ✓ Toksikiteden etkilenmeksizin ağır metal giderimi
- ✓ Belki toksik olabilecek ikincil atıkların oluşmasının engellenmesi
- ✓ Metal geri kazanımı

Metallerle biyosorpsiyon sürecinin temelde iki hedefi vardır. Birinci hedef; ticari öneme sahip altın, gümüş ve platin gibi paslanmaz metallerin geri kazanımını sağlamak; ikincisi ise canlı organizmalar ve çevresi için çok küçük derişimlerde bile son derece toksik etki gösteren kadmiyum, civa, nikel, bakır, demir, kurşun, krom ve çinko gibi ağır metallerin kirli sulardan arındırılmasıdır (Aytan, 2009; Sağlam ve Cihangir, 1995).

Biyosorpsiyon işlemlerinde etkin olarak kullanılacak biyolojik moleküller oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Özellikle mikroorganizma grubu içerisinde algler de dahil olmak üzere çeşitli bakteri, maya, mantar türleri yer almaktadır (Sağlam ve Cihangir, 1995). Bu mikroorganizmalardan: bakterilerden; *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Citrobacter* ve *Enterobacter*, mayalardan; *Candida*, *Saccharomyces* ve *Kluyveromyces*, mantarlardan; *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Pleurotus*, alglerden; *Ascophyllum*, *Anabeana*, *Chlorella*, *Microcystis*, *Scenedesmus* türleri kullanılmaktadır (Norris ve Kelly, 1979; Macaskie ve Dean, 1984; Tobin, 1984; Lewis ve Kiff, 1988; Mann, 1990; Favero vd., 1991; Zhou ve Kiff, 1991; Costa ve Leite, 1991; Wong ve Kwok, 1992; Artola ve Rigola, 1992; Scott ve Karonjkar, 1992; Han vd., 1992; Yazgan vd., 1993; Blais vd., 1993). Organizma ve metal biyosorpsiyon çeşitleri Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Mikroorganizmalar ve metal biyosorpsiyon çeşitleri (Sağlam ve Cihangir, 1995)

<b>Organizma</b>	<b>Metal Biyosorpsiyon Çeşidi</b>
<b>1) Bakteri Türleri</b> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Citrobacter sp. Arthrobacter sp.	kadmiyum/nikel kadmiyum/uranyum
<b>2) Maya Türleri</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> <i>Kluyveromyces maxianus</i> <i>Candida utilis</i>	çinko/bakır/uranyum/kadmiyum bakır/kobalt/gümüş
<b>3) Fungus Türleri</b> <i>Neurospora crassa</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Penicillium spinulosum</i> <i>Aspergillus niger</i>	nikel/kadmiyum/bakır/uranyum
<b>4) Alg Türleri</b> <i>Chlorella homosphaera</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Scenedesmus carinatus</i> <i>Sargassum natans</i>	çinko/kurşun/kobalt kadmiyum/altın
<b>5) Bitki Türleri</b> <i>Azolla pinnata</i> <i>Eichharnia crassipes</i> <i>Lycopersican esculentum</i> <i>Nicotiana tobaccum</i>	kurşun/çinko kadmiyum/kurşun/civa

### 1.5.1. Biyosorpsiyon mekanizmaları

Biyosorpsiyon mekanizmaları kullanılan mikroorganizma yapılarının kompleks oluşundan dolayı çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar iki ana başlık altında sıralanabilir. Şekil 1.4(a-b)' de bakteriyal biyomaslarda biyosorpsiyon mekanizmaları şematize edilmiştir (Veglio, 1997).

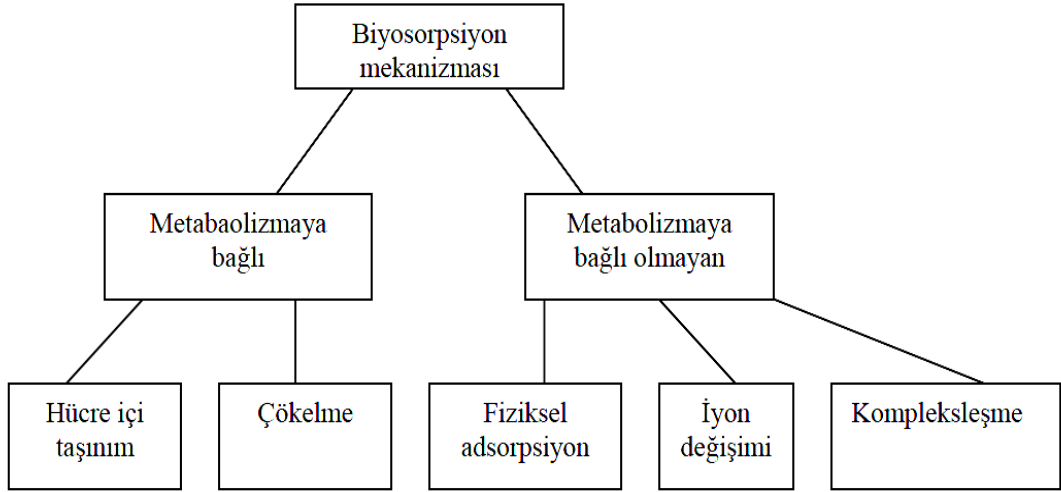
Hücre metabolizmasına dayalı biyosorpsiyon;

- \* metabolizmaya bağlı
- \* metabolizmaya bağlı olmayan

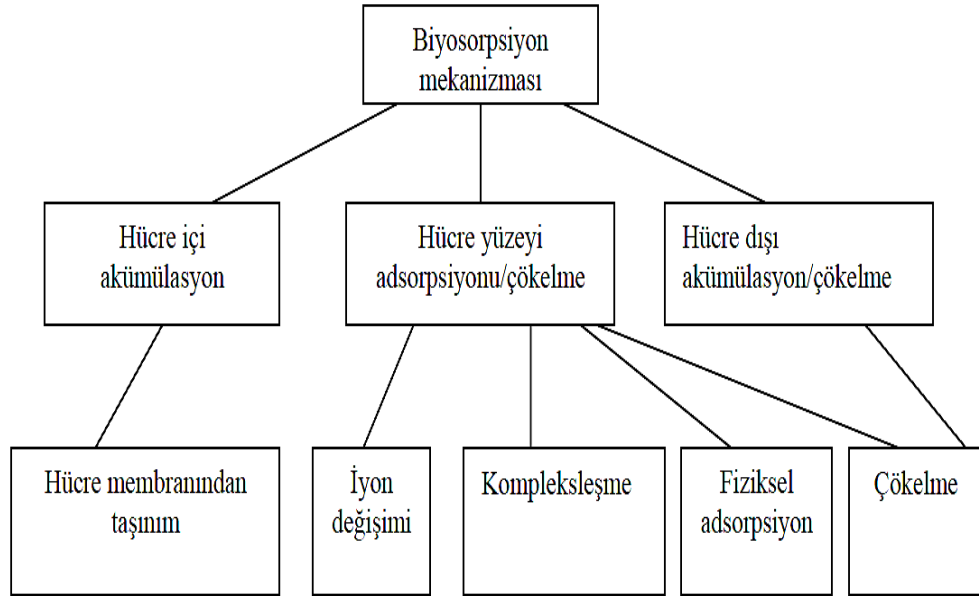
Metalin uzaklaştırıldığı bölgeye dayalı biyosorpsiyon;

- \* hücre içi (intraseküler) birikim
- \* hücre yüzeyi adsorpsiyonu/çökme
- \* hücre dışı (ekstraseküler) birikim / çökme olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Ahalya vd., 2003).

a)



b)



**Şekil 1.4(a-b).** Biyosorpsiyon mekanizması (a) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırılmış (b) Metal alımının gerçekleştiği bölgelere göre sınıflandırılmış (Veglio, 1997)

Mikroorganizmalarla metal adsorpsiyon kinetiği iki basamaktan oluşmaktadır:

1.basamak; Organizma yüzeyinde gerçekleşen fiziksel adsorpsiyon veya iyon değişimidir. Bu basamağa genellikle pasif giderim denilmektedir. Bu basamak çok

hızlıdır ve mikroorganizma metal ile etkileştikten sonra dengeye ulaşılır. Hızlı giderme genellikle yüzey adsorpsiyonu sonucudur. Metaller fiziksel adsorpsiyonda Vander Waals kuvvetleri ve diğer moleküller arası kuvvetlerin (dipol- dipol kuvvetleri) sayesinde yüzeye tutunmayı sağlamaktadır. İyon değişimi ise ağır metal iyonlarının elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzeye tutularak, ortamdaki farklı türdeki iyonlarla yer değiştirmesi şeklinde gerçekleşmektedir. (Brady ve Tobin, 1995; Yüce, 2007). Bu olayda mikroorganizmaların hücre duvarında bulunan polisakkarit yapılar önemlidir (Keloğlu, 2017). Bu polisakkarit tabakasında bulunan karşı iyonlar ile metaller yer değiştirir.

Mikroorganizmaların, sulu ortamlardan hücre yüzeyine metal adsorplanmasının nasıl olduğunu açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir:

- Birinci hipotez; metal iyonlarının hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks oluşturarak ve/veya pozitif yüklü reaksiyon alanları ile yer değiştirerek adsorplanabileceğini açıklamaktadır. Bu olaya iyonik adsorpsiyon adı da verilir. Hücre duvarındaki polisakkaritler; sülfat, amino ve karboksil grupları içermektedir. Bu metal iyonları hücrelerin sahip oldukları bu gruplar ile yer değiştirmektedir.
- İkinci hipotez ise, biyosorpsiyonda kullanılan bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözültiden metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip oldukları hipotezidir. Bu mikroorganizmaların hücre duvarındaki proteinleri metali bağlamak üzere aktif bölgeler oluştururlar. Ağır metallerin proteinlere karşı kuvvetli ilgisi vardır. Proteindeki peptid bağlarının azot ve oksijeni, hidroksil, amino, fosfat gibi gruplar, iyonların metal iyonlarıyla yer değiştirmesi için uygundur (Crist vd., 1981; Tsezos ve Volesky, 1995; Yüce, 2007).

2.basamak; metal iyonlarının hücre zarından içeri taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır. Bu basamağa aktif giderim denir. Bu aşamada kimyasal adsorpsiyon devreye girer. Kimyasal adsorpsiyonda yüzeye tutunan parçacıklar, adsorplayan yüzeydeki fonksiyonel gruplar ile kimyasal etkileşime girerler. Bu aşamada metal iyonlarının, hücre zarından sitoplazmaya geçişi sağlanır (Dursun vd., 2003; Yüce, 2007).

### 1.5.2. Biyosorpsiyonu etkileyen faktörler

Biyolojik olarak parçalanması zor olan kirleticilerin (metal ve boya) sudan uzaklaştırılması için kullanılan biyosorpsiyon işleminde kirleticiler bakteri, fungus ve algler gibi biyolojik kütlelere bağlanmaktadır. Bakterilerde EPS, teikoik asitveteikoik asitin karboksil gruplarının, küf ve mayalarda karboksil, fosforil ve polifosfat gruplarının, yeşil algler ve siyanobakterilerde üronik asit ve tiyol gruplarının yoğun olarak bulunması son yıllarda yapılan çalışmalarda bu mikroorganizmaların metal gideriminde kullanılmalarındaki ilgiyi arttırmaktadır (Keloğlu, 2017). Bu bağlanma çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Mikroorganizmalara ağır metal iyonlarının tek türlerinin biyosorpsiyonunu etkileyen faktörler arasında organizmanın özgül yüzey özellikleri, solüsyon pH'sı, sıcaklık, metal iyonu başlangıç derişimi, biyokütle derişimi, biyokütle tipi, biyokütle hazırlanışı, kirleticilerin kimyasal yapısı (tür, boyut, iyon yükü) ve çalkalama hızı sayılabilir.

Birden daha çok metal iyonunun mikroorganizmalara aynı anda bağlanmasını ise metal kombinasyonu, metal derişim düzeyleri, metal eklenme sırası gibi birçok faktör etkilemektedir (Ting vd, 1989). Belirli bir mikroorganizma türünün, belirli bir metal iyonunu adsorplama kapasitesi, ortamda başka bir metal varken, tek bileşenli duruma göre artabilir, azalabilir veya hiçbir değişim göstermeyebilir (Sağ vd., 1998).

### 1.6. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

*Pseudomonas* cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait düz veya hafif kıvrık çubuk şeklinde bakterilerdir (Ingram ve Blackwood, 1970). *Pseudomonas*'lar Gram negatif, zorunlu aerobik ve polar kamçıyla hareket edebilen mikroorganizmalardır. *P. mallei* hariç bütün türler kamçıya sahiptir. Hareket, bir veya birkaç polar kamçı ile yapılmaktadır. Kimi zaman nadiren hareketsiz kamçısız suşlar zaman zaman izole edilebilmektedir (Stover vd., 2000; Rashid ve Kornberg, 2000). Polar kamçıların sayısı önemli bir taksonomik karakterdir. Sahip olduğu kamçı ve pililer yardımıyla kayma, titreme, yüzme hareketini gerçekleştirirler. *P. aeruginosa* suşlarının besin ortamından yeterince yararlanmaları için hareketli olmaları gerekir. Ayrıca *Pseudomonas* cinsi üyeleri, karbon kaynağı olarak kullandıkları karbonhidrat gibi ilgi duyduğu moleküllere kamçısı aracılığıyla kemotaksis yaparlar. *Pseudomonas* sp. türlerinin çoğu glikoz, fruktoz, galaktoz ve L-arabinozu besin ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. (Guo vd., 2007). *Pseudomonas*'lar, kamçılarını kullanarak

insanlarda enfeksiyonun erken safhalarında konak canlıya tutunarak ve dokuda yayılarak hastalıklara neden olurlar.

*Pseudomonas* sp. üyeleri, katalaz testleri pozitif iken oksidaz testleri pozitif veya negatif olarak belirlenmiştir (Onbaşılı, 2006).

1970'lerin başında yapılan çalışmalarla RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre, bu iki nükleik asidin gösterdiği uyumlara bakılarak, bu bakteriler I, II, III, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır (Bruins vd., 2000a). *P. aeruginosa* rRNA homoloji grup I içinde yer almaktadır (Özan, 1996; Kayar, 2009). *Pseudomonas* cinsi çok büyük ve kompleks bir topluluk olduğu için çevresel ve klinik açıdan dikkate alınması gereken pek çok tür içermektedir. Bu nedenle grup üyelerinin görünümüne, metabolizmalarına ve pigment oluşturup oluşturmamalarına göre sınıflandırmaları yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar 7 tip teste dayanır. Bu testler:

- ✓ Koloni Yapısı,
- ✓ Koku,
- ✓ 42 °C'de Üreyebilme Yeteneği,
- ✓ Fenazin Pigmentlerinin Üretimi,
- ✓ Denitrifikasyon,
- ✓ Jelatini Sıvılaştırma,
- ✓ Özel Karbon bileşiklerini kullanarak farklılaşmış büyüme örneklerini gösterme şeklinde sıralanır (Ulusoy, 2007).

*Pseudomonas* cinsi bakteriler doğada özellikle havada, toprakta ve sularda yaygın bulunmaktadır. Bu sebeple çoğu bakteri direkt izolasyon edilmektedir (Kohler vd., 2000). *Pseudomonas* türleri birçok organik bileşiği mineralize edebilir. Bu bakterilerin biyolojik rejenerasyon ve biyolojik dejenerasyon yetenekleri oldukça gelişmiştir. Bakteriler bu bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar (Essar vd., 1990). Birçok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilmektedir. Ancak bu gruba dahil olan bakteriler fermentasyon ve fotosentez yapmazlar (Onbaşılı, 2006).

*Pseudomonas* grubu üyeleri, toprak bakterileridir. *Pseudomonas* cinsinin bazı türleri 4 °C'de üreyebilirken, oksijensiz şartlarda ve 42 °C'nin üzerinde üreyemezler. Kurumaya dirençlilikleri zayıftır (Pelczar,1958; Tortora vd., 1992; Ayhan, 2000; Akoğlu, 2006). Çoğu 30-37 °C arası optimal gelişim sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Birçok türü, asidik koşullarda (pH 4.5) gelişemezler (Gupta, 2010;

Collier vd., 1998). Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Kendi varlığını sürdürebilmesi için gerekli gelişme faktörleri ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler.

Psikrofil, mezofil veya psikrotrof türleri vardır. Aerobik özellik gösterdiği için gıdaların yüzeyinde hızla gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz madde meydana getirirler. Özellikle buzdolabı sıcaklığında saklanan süt, et, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulmasına sebep olurlar (Akoğlu, 2006).

Pigmentasyon, *Pseudomonas* cinsi üyelerinin genel bir özelliğidir ve türleri morfolojik olarak ayırt etmede kullanılır. Fakat bu grup üyelerinin pigment oluşturmeyen türleri de mevcuttur (Murray vd., 1995). Floresans veren piyoverdin (yeşil-sarı) uzun dalga boylu UV ışığı altında floresans verir ve renkli görünür. 'Aeruginosa' adı bakterinin sahip olduğu bu pigmentten gelmektedir.

*Pseudomonas* cinsi üyeleri sahip olduğu virülans faktörlerinden dolayı patojenik özellik göstererek insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde enfeksiyona sebep olurlar (Mavrodi vd., 2001). Bu virülans faktörlerden bazıları; ekzopolisakkaritler, ekzotoksin A, fosfolipaz C, proteaz, pili, pigmentler ve ramnolipidlerdir (Schwarzer vd., 2008; Yuuka vd., 2008). Ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidler *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen sekonder metabolit olarak adlandırılan virülans faktörlerdir (Demain, 1999; Norman vd., 2004; Özcan, 2011). Sekonder metabolitler bakterilerin çeşitli ortam koşullarında hayatta kalmasını ve diğer bakterilerle rekabet etmelerini sağlar. Örneğin, sekonder metabolit olan piyosiyenin, ökaryot hücrelerin de bulunduğu çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik gösterir (Gee vd., 2004; Özcan, 2011 ).

*Pseudomonas* suşları tarafından üretilen ve diğer suşlar üzerinde de letal etki gösteren enzimlere bakteriosinler denir (Keloğlu, 2017). Bakterilerdeki dış membran, bazı enterik bakterilerde olduğu gibi hücreyi konakçının hidrolitik enzimlerinden ve çeşitli metallerin olumsuz etkilerinden korumaktadır. Membran üzerindeki protein yapısındaki porlar küçük molekül ağırlığına sahip maddelere geçirgen iken, antibiyotik gibi büyük moleküller dış membrana yavaş penetre olmaktadır. *Pseudomonas* bu sayede antibiyotiklere karşı direnç kazanırlar ve klinik açıdan önem arz ederler (Özcan, 2011).

*Pseudomonas* cinsi bakterileri genetik çalışmalarda da yaygın olarak tercih edilmektedir. Hava, su ve toprakta yayılım göstermesi, klinik açıdan önemi, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğe sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında



minimum şartlarda çok kolay ve hızlı bir şekilde üreyebilmesi ve izolasyonun kolay olması nedeniyle çoğu araştırma deneylerinde kullanılmaktadır (Mandelbaum vd., 1995; Özcan, 2011).

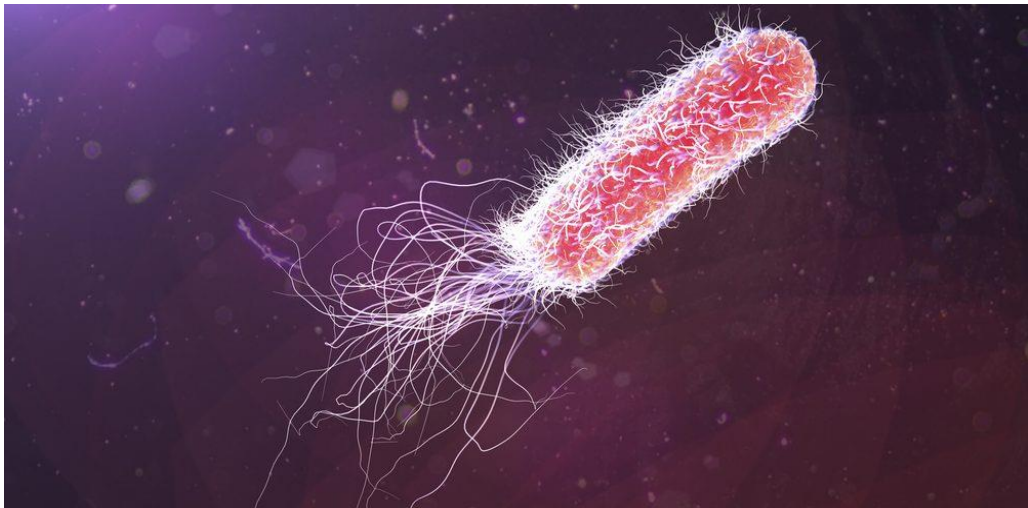
### 1.6.1. *P. aeruginosa*'nın genel özellikleri

Patojen bakterilerden biri olan *P. aeruginosa* doğada, toprakta ve sahil deniz habitatları gibi sulu ortamlarda yaşayabilen Gram negatif, aerobik hareketli bir bakteridir (Aouad vd., 2006; Dao vd., 1999). *P. aeruginosa* ilk kez 1882 yılında Fransız eczacı Carle Gessard tarafından mavi yara akıntılarında tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar ortalama 0,5-1 µm (en) ile 1,5-4 µm (boy) arasındadır. Optimum 37 °C üreyebilirler. *P. aeruginosa* ve bazı türleri 4 °C'de üreyebilirken, 42 °C'de üreyemezler. Asidik ortamda (pH 4-5) gelişemezler. Besiyerlerinde kolaylıkla ürediklerinden dolayı rahatlıkla izole edilebilirler. Kolay boyanırlar. Kültürlerde triptofan 2-aminoasetofenon üretiminden dolayı karakteristik bir meyve kokusu mevcuttur ve petri kutusunun kapağı açıldığında üzüm kokusu veya trimetilamin kokusu şeklinde yayılır (Akoğlu, 2006). *P. aeruginosa* fermentasyon yapmaz, tipik birçok floresens pigmentlerine sahiptirler. MacConkey Agar'da mavi-yeşil röfle vererek ürerler. Bu görünüm piyosiyanın pigmentinden dolayı meydana gelmektedir. (Collier vd., 1998; Özcan, 2011). *P. aeruginosa* tipik olarak; piyosiyanın, proteaz, elastaz, ekzotoksin A, ramnolipid, ekzoenzim S, aljinat, lipopolisakkarit, ekzopolisakkarit, lipaz adı verilen virülans faktörleri üretirler (Töreci, 1981; Özcan, 2011). Ayrıca piyosin adı verilen ve diğer bakterilere letal etki gösteren bakteriosinleri de üretirler. *P. aeruginosa*'nın fiziki görüntüsü Şekil 1.5 'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.5.** *P. aeruginosa* bakterisinin genel görüntüsü (Orbit Biotech, 2006)

Kamçı bakterinin katı besi yerine yerleşmelerine, sıvı besi yerindeki hareketleri olan yüzme hareketine yardımcı olmaktadır. *P. aeruginosa* tek bir kutupta birkaç tane kamçıya sahip olduğu Şekil 1.6’da görülmektedir. Piluslar ise epitel hücrelere ve mukozal yüzeylere tutunmasında önemli role üstlenir. Pilusların ucu konak hücre yüzeyine tutunmadan sorumludur. *Pseudomonas* pilusları, tip IV grubunda sınıflandırılırlar. Kamçı ve pili, yapısına, fonksiyonuna ve genetik organizasyonuna göre değişik çeşitlilik gösterirler.

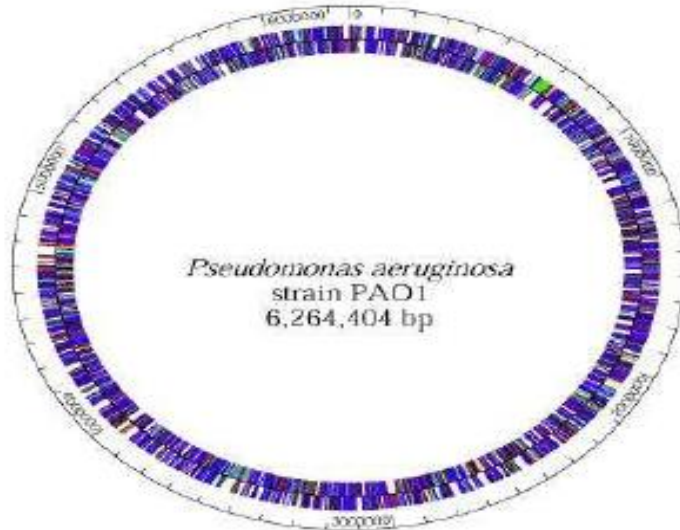


**Şekil 1.6.** *P.aeruginosa* ‘nın elektron mikroskop görüntüsü (bronchiectasisnewstoday.2017)

*P. aeruginosa* kültür ortamında birçok çeşit pigment üretebilme yeteneğine sahiptir. Pigment üretimi kültür şartlarına bağlıdır. Pigmentler oksijensiz ortamda

oluşmazken oda koşullarında yoğun bir şekilde meydana gelirler. Bu pigmentler sideroforlardır ve King A, King B kültür ortamı pigment oluşumunu destekler. Piyosiyenin, fluoresens vermeyen fenazin grubundan suda ve kloroformda eriyen, mavi-yeşil pigment özelliğinde olan kimyasal bir bileşiktir. Piyoverdin, fluoresens grupta yer alan ultraviyole ışığında fluoresens veren suda eriyen, ancak kloroformda erimeyen, sarı-yeşil renkte bir pigment grubudur. Piyosiyenin türeği olan piyoselin, *P.aeruginosa*' ların sideroforlarından biridir. Biyogenetik olarak, salisilik asit ve sisteinin iki molekülünün kondensasyon ürünüdür. Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen kırmızı renkte bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen varlığında geri dönüşümsüz olarak rengini kaybeder. İster asidik ister bazik olsun tüm pH derecelerinde kırmızı renktedir. Piyomelanin, *P. aeruginosa* kökenlilerin % 2-3' ü tarafından oluşturulan, suda eriyen kahverengimsi-siyah renkte olan diğer bakteriler tarafından sentezlenmeyen bir pigmenttir (Gupta, 2010; Töreci, 1981; Özcan, 2011).

Genetik araştırmalar yönünden çeşitli fonksiyona sahip *P. aeruginosa* PAO1 suşu oldukça detaylı çalışılmış ve bu suşun genom dizisi çıkarılmıştır. Bakterinin genom büyüklüğünün 6, 264, 404 bp olduğu Şekil 1.7'de yer almaktadır (Mandelbaum, 1995; Özcan, 2011).



**Şekil 1.7.** *P. aeruginosa* PAO1'in genom dizisi (Özcan, 2011)

*P. aeruginosa* suşları piyosin adı verilen aynı türün diğer suşlarında dahi letal etki gösteren bakteriyosinler üretirler. *P. aeruginosa*' nın bakteriyosinleri Brandy' nin (1967) yaptığı sınıflandırmaya göre R, S ve F tipindedir. S tipi; şekilsiz

görünümlü ve proteolitik enzimlere duyarlı, R tipi; faj komponentleri yapısında ve proteolize duyarlı olmayan piyosinlerdir (Akoğlu, 2006).

*Pseudomonas* cinsi bakterilerden insan patojeni olarak en sık izole edilen tür *P. aeruginosa'* dır. Çevre koşullarına ve dezenfektan maddelere dirençlidirler, iyotlu solüsyonlarda bile üreyebilirler (Şengöz vd., 2005). *P. aeruginosa* bakterisi, gerekli sterilizasyon ve dezenfeksiyonun yapılamadığı hastane koşullarında, ameliyathane ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılan araç ve gereçlerde koloni oluşturarak antibiyotiklere dirençli ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olurlar (Özsoy vd., 2001; Akoğlu, 2006). Örneğin, *P. aeruginosa* insanlarda hem akut hemde kronik akciğer hastalıklarına, özellikle immün sistemi baskılanmış bronşit ve kistik fibrozisli hastaların solunum yolu hücrelerinde kolonize olup doku hasarına sebep olmaktadır (Ran vd., 2003; Lau vd., 2004; Steinberger vd., 2005). *P. aeruginosa'* nın virulans faktörleri insanda çeşitli enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı patojenik özellik gösterir. Bu bakteri sayısız protein ve sekonder metabolite sahiptir. Bunların çoğu insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve çeşitli mikroorganizmalarda patolojik hastalıklara yol açarlar (Gerene vd., 2003). Göz, dış kulak, orta kulak, idrar yolu, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilirler. *P. aeruginosa'* nın yeni doğan çocukların ölümüyle sonuçlanan epidemik ishale neden olduğu da bildirilmiştir (Akoğlu, 2006).

*P. aeruginosa* türü sıcaklığa dirençsiz bir bakteridir. 55 °C' de 1 saat ve 60 °C' de 15 dakikada ölürlür. Çevre sıcaklığının, nemin uygun olduğu şartlarda üreyebilir ve aylarca canlı kalabilirler. Diğer patojenik bakterilere göre kimyasal dezenfektanlara karşı daha fazla direnç gösterirler. Dörtlü amonyum bileşiklerinde, hekza klorofenli sabunlarda, iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebildikleri gibi dörtlü amonyum bileşiklerini besin kaynağı olarak da kullanabilirler (Özcan, 2011).

*P. aeruginosa* yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal etkenlerin büyük çoğunluğuna direnç gösterirler. Antibiyotiklere, kimyasal ve fiziksel ajanlara direnç; plazmitler aracılığı ile gerçekleşir. Örneğin karbenisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, sülfonamid, aminoglikozit gibi antibiyotiklere borat, kromat, civa iyonları, tellürit ve UV ışınlarına direnç bu şekilde olmaktadır (Koçoğlu, 1994; Baştürk 2005; Akoğlu, 2006).

Bakteriyel biyofilmler, bakterinin doğal yaşam ortamında canlılıklarını sürdürmek için geliştirdiği bir yapıdır. Bakteriyel komünitenin gerçekleşmesi için de

biyofilm gereklidir. Çoğu ıslak yüzeyde yaygındır ve çeşitli çevresel sorunlara yol açabilirler. *P. aeruginosa*' da doğal koşullarda katı ve sıvı yüzeylerde biyofilm adı verilen yapılar içerisinde canlılıklarını korurlar. *P. aeruginosa*'nın da sahip olduğu bakteriyel enfeksiyonların % 65'den sorumlu olan biyofilmlerin genel özelliği antimikrobiyal direnç göstermeleridir. En iyi biyofilm örneğini kronik olarak bu bakteri ile enfekte olmuş kistik fibrozisli hastalar göstermektedir (Alexei vd., 2000; Özcan, 2011).

Her canlı arasında iletişim çok önemlidir. Hücreler arasında da iletişimin olması için bakterilerin çeşitli hareketleri yapmaları gerekir (Daly vd., 1984; Heydorn vd., 2002). *P. aeruginosa* da fizyolojisinde en etkili özelliklerden biri olan hareketi yüzme, titreme ve kayma olmak üzere üç şekilde gerçekleştirirler. Kayma, yüzme ve titreme hareketi tek bir azot kaynağı olmak şartıyla, düşük miktarda agar (% 0.5-0.7) ilavesiyle gerçekleşir (Özcan, 2011). Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığıyla haberleşmeleri ve iletişim kurmalarını sağlayan bir özelliği de yeterli yoğunluk algılaması (YYA) dır. YYA ile hücreler bireysel davranış yerine, organize bir topluluk halinde hareket ederler. YYA bakteri de hareket, kümeleşme, biyofilm oluşturma, virülans faktörler, antibiyotik sentezi gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde görev alır (Sakuragi ve Kolter, 2007). YYA sistemi iki gen tarafından kontrol edilir. Bunlar otoindükleyiciler tarafından düzenlenen las ve rhl gen sistemleridir. Bunlardan las sistemi; alkalın proteaz, ekzotoksin A, LasA proteaz, LasB proteaz (elastaz) ve LasI gibi virülans faktörlerinin ifadesini düzenlerken, rhl sistemi; piyosiyenin, RhlI, LasA proteaz ve LasB proteaz ifadesini kontrol etmektedir (Cabrol vd., 2003; Dietrich vd., 2006; Özcan, 2011).

*P. aeruginosa* toprak, rizosfer, tatlısu ve denizdeki çevresel kirliliği yüksek oranda giderebilme yeteneğine sahiptir. Bu kirliliği gidermek için pili, aljinat ve lipopolisakkarit gibi hücre ilişkili faktörler ile toksinler (ekzotoksin A ve ekzoenzim S), proteazlar (elastaz, LasA proteaz ve alkalın proteaz), hemolizinler (fosfolipaz ve ramnolipid) gibi virülans faktörler görev almaktadır (Glessner vd., 1999; Özcan, 2011).

## 1.7. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, çoğalma ve üreme için gerekli olmayan doğada yaygın olarak bulunan birçok mikroorganizma tarafından üretilen ticari olarak önemli

metabolitlerdir. Genel olarak sıradışı yapılara sahip olan sekonder metabolitler; sağlık, beslenme ve toplumun ekonomisi üzerinde büyük bir etkisi vardır (Supriya ve Nutan, 2010).

Primer metabolitler, bakteri gelişimine paralel olarak mikroorganizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurken, sekonder metabolitler ise gelişme fazının sonuna doğru ya da durağan fazda sadece bazı mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Aminoasit, aseton, etanol, proteinler, karbohidratlar, vitaminler, organik asitler v.s primer metabolit iken, mikrobiyal sekonder metabolitler de antibiyotikler, alkoloitler, toksinler, pigmentler, feromonlar, pestisitler, antitümör maddeler v.s.dir (Castric, 1974; Özcan, 2011).

Primer metabolizmadan farklı olarak sekonder metabolizma süreçleri hala tam anlamıyla açıklanmamış olsada sentezi genellikle kromozal DNA venadirende plasmid DNA'sındaki genler tarafından kodlanmaktadır (Demain, 1998). Sekonder metabolitler; enzim inaktivasyonu, enzim indüksiyonu, besinler, büyüme hızı ve geri beslemeli kontrol tarafından düzenlenmektedir.

Endüstriyel açıdan önemli olan çoğu tedavi edici gibi amaçlar için kullanılan sekonder metabolitler kolay ve ekonomik olarak elde edilebilir. Bu şekilde üretilen sekonder metabolitlerden en iyi bilinenlerden birisi antibiyotiklerdir (Essar vd., 1990; Barrios-Gonzalez vd., 2005). Antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitler mikroorganizmaların ticari önemini arttırmaktadır (Leisinger ve Margraff, 1979). 1995 yılında, tanımlanan 12,000 antibiyotiğin yaklaşık % 55 bakteriler üretmektedir. Sekonder metabolitlerin çoğu DNA ve protein sentezi, sinir sistemi, kalp aktivitesi ve mikrotübül yapısı modülasyonunun inhibisyonu gibi güçlü biyolojik etki gösterirler (Özcan, 2011).

### **1.7.1. *P. aeruginosa*'nın sekonder metabolitleri**

Floresans *Pseudomonas* sp.'lerin ürettiği metabolitlerin tedavi amaçlı kullanımına dayalı ilk araştırmalar 80 yıl öncesine dayanmaktadır. O zamandan günümüze kadar izole edilen önemli miktarlardaki antibiyotik bileşikler arasında piyosiyanın, piyrolnitritin nadirende pseudomonik asit çeşitli araştırma ve uygulamalarda kullanılmıştır. *Pseudomonas* sp.'ların genetiği ve biyokimyası ile ilgili yapılan araştırmalara sekonder metabolitlerin de katılması, sekonder metabolizmanın aydınlatılması açısından önem kazanmıştır (Leisinger ve Margraff,

1979). Antibiyotik üreten *Pseudomonas*' lar etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır.

*P. aeruginosa* son yıllarda artan insidansı, biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği, mortalite ve morbiditesi yüksek, sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, tedavisi zor enfeksiyonların etkeni olarak çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır. Bakterinin virülans faktörlerini hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak inceleyebiliriz (Karatuna ve Yağcı, 2008).

*P. aeruginosa* çeşitli virülans faktörleri üretmektedir. Endüstriyel alanda birçok kullanıma sahip olan bu faktörler (Lau vd., 2004);

- ✓ piyosiyenin,
- ✓ elastaz,
- ✓ proteaz,
- ✓ ramnolipid,
- ✓ ekzotoksin A,
- ✓ ekzoenzim S,
- ✓ aljinat,
- ✓ lipopolisakkarit,
- ✓ ekzopolisakkarit,
- ✓ lipazdır.

*Pseudomonas*' lar virülans faktörlerden olan ekzopolisakkaritler, pigmentler ve ramnolipid gibi sekonder metabolitleri üretebilmektedirler.

Ramnolipid biyosümfektanlar, çevrenin kendi kendisini yenilemesine yardımcı olan bileşiklerdir. *P. aeruginosa* suşunun ramnolipid bileşikleri ile biyolojik yıkım yeteneği oldukça etkilidir. Bakteri yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosümfektan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sümfektanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını etkili bir şekilde inhibe etmektedir (Karatuna ve Yağcı, 2008; Özcan, 2011).

Ekzotoksin A; ökaryotik hücrelerde protein sentezini engelleyen en önemli virülans faktörüdür. Bu toksin doku hasarına neden olur. Ekzoenzim S; protein sentezini engeller. Ekzoenzim A'dan farkı sıcaklığa stabil olmasıdır ve fagositik öldürmeye karşı direnç oluşturur. Elastaz; akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde yaklaşık % 30 oranında elastin

proteini bulunur. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur (Kayar, 2009).

#### 1.7.1.1. *P. aeruginosa*'nın pigment üretimi

Pigment; bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ya da inorganik bir kaynaktan elde edilen sentez, ekstraksiyon, izolasyon veya benzeri işlemlerle elde edilen boya, pigment veya diğer maddeler olarak tanımlanır (Anonymous, 1995). Pigmentler antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Das ve Ma, 2013). Mikroorganizmalardan bakteriler ve bazı mantarlar pigment üretebilme yeteneğindedirler. Bakteriler kendi hücreleri içerisinde kalan veya buldukları ortama saldıkları bazı renkli maddeler üretirler. Pigment yapan bakteriler ve özellikle hücre içi pigment yapanlar suda erimedikleri için kolonileri, yaptıkları pigmentin özel rengindedir kolonileri boyamazlar. Hücre dışı pigment yapanlar ise suda eridikleri için buldukları besiyerini pigment rengine boyarlar (Ata, 2013). Bakterilerin ürettikleri pigmentler özellikle sarı, turuncu, kırmızı bazen de yeşil renkte olabilir.

Birçok bakteri tarafından özellikle de *Brevibacterium*, *Microbispora*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* ve *Sorangium* cinsine ait üyelerin pigment ürettiği bildirilmiştir (Budzikiewicz, 1993). *Pseudomonas* türleri onlara seçici bir özellik kazandıran piyosiyenin, piyoverdin (fluoressein), piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler oluşturmaktadırlar (Kantarcı, 1992). Son yıllarda fluoresens *Pseudomonas*'ların temsilcilerinden özellikle de *P. aeruginosa* ile besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyenin pigmentini üreten birçok çalışma yapılmaktadır (Das ve Ma, 2013).

Fenazin pigmentleri 19.yy.'ın sonlarından itibaren tanımlanmaya başlanmıştır. Mikroorganizmalar doğada bulunan fenazin molekülleri için özel bir kaynak ihtiva ederler. Bu fenazin pigmentlerin çoğu aynı basit yapıya sahiptir. Bazıları suda bazıları ise kloroform da çözünürler (Özcan, 2011). Günümüze kadar birçok mikroorganizma tarafından 30 farklı fenazin bileşiği üretilmektedir. *Pseudomonas* ssp.'leri arasında fluoresens *Pseudomonas*'lara ait birçok suşla ve *P. cepacia* grubunun bazı üyeleri tarafından üretilen fenazin, organik çözücülerle kültür filtratlarının ekstraksiyonu ile izole edilmektedir. Fenazin, *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen antifungal, antibiyotik benzeri sekonder metabolitlerdir.

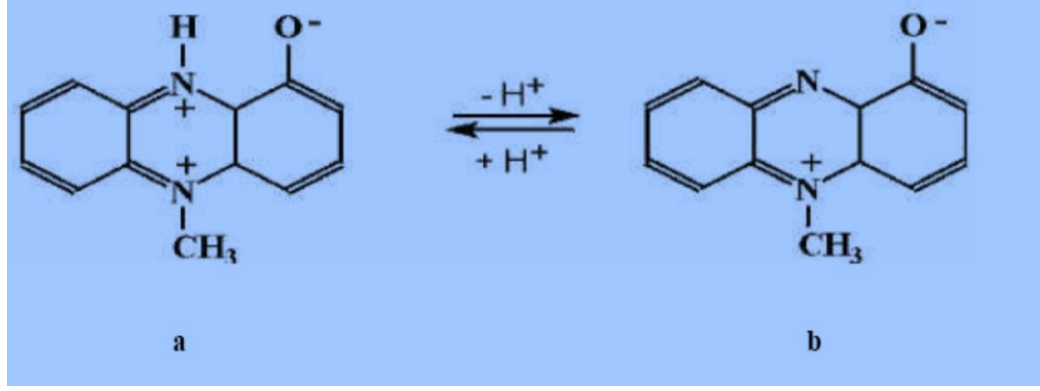


Çeşitli fenazin pigmentlerinin üretimi ve biyosentez yolları bilinmemektedir (Ingram ve Blackwood, 1970; Ata, 2013).

#### **1.7.1.1.1.Piyosiyanın**

Piyosiyanın üzerinde en çok çalışılmış *P. aeruginosa* için karakteristik olan bir fenazin pigmentidir (Rao vd., 2017; Kayar, 2009; Ata, 2013). Pigment ilk olarak Gessard (1890) tarafından kompleks bir ortamda *P. aeruginosa*'nın çoğalmasını takiben izole edilmiştir. Jordan (1899) ise piyosiyanın üretimine ilişkin kimyasal ortamları tanımlamıştır. Pigmentin orijinal yapısı Wrede ve Strack (1929) tarafından gösterilirken, en son şekli olan çift halkalı yapısı Hilleman (1938) tarafından yapılmıştır (Özcan, 2011). Karbon kaynağı olarak çoğu zaman gliserol kullanılır. Çeşitli besi ortamlarında piyosiyanın miktarı da farklı olmaktadır. Bu pigment bakterinin hem patojenlik hem de fizyolojisinin belirleyicisi olarak kullanılan önemli faktördür (Cox, 1986).

Piyosiyanın, suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen mavi-yeşil pigment özelliğinde olan öncü molekülü korizmik asitten son hali üç halkalı piyosiyanine sentezlenen Şekil 1.8'de gösterilen fenazin grubundan kimyasal bir metabolittir (Hassett vd., 1992; Ran vd., 2003). Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökelek halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak koyu mavi renkte görülebilir (Akoğlu, 2006; Kayar, 2009; Özcan, 2011; Ata, 2013). King A besiyeri kullanılarak piyosiyanın üretimi arttırılabilir (Caparanga vd., 2017). *P. aeruginosa* suşları 37 °C' de 5 gün inkübe edildiğinde, suşların % 80' i piyosiyanın üretir (Wilson ve Miles, 1964; Aydın, 2001; Kayar, 2009).



**Şekil 1.8.** *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanın molekülü a) nötr veya bazik pH'ta zwitteriyon olarak davranır ve mavi renklidir b) asidik ortamda ise kırmızı renklidir (Lau vd., 2004; Rao vd., 2017)

Besiyerinde özellikle piyosiyanın ve fluoresin pigmentlerinin oluşumu, *P. aeruginosa*'nın tanısı yönünden ve diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt etmede oldukça önemli bir özelliktir (İlgaz, 1999; Kayar, 2009). Bu pigment çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında üretilmektedir. Quorum sensing (QS) sisteminin kontrol geni olan rhl sistemi, piyosiyanın üretimi için kontrol basamağını oluşturmaktadır (Glessner vd., 1999). Piyosiyanın pigmentinin; inflamatuvar cevabı uyardığı, hücre solunumunu inhibe ettiği, oksijenin toksik şekilleri olan süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin üretimini katalizlediği, kalsiyum homeostazı ve siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı bilinmektedir (Özcan, 2011).

#### 1.7.1.1.2. Piyoverdin (Fluoressein)

Floresan grupta yer alan piyoverdin; *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida* tarafından sentezlenen, suda eriyen, kloroformda erimeyen, sarı yeşil renkte bir pigment grubu olarak tanımlanmaktadır (Leisinger ve Margraff, 1979). Piyoverdinler kararlı olmayan bileşiklerdir. Bu pigmentler sideroforlardır. Sideroforlar kimyasal anlamda, (Yunanca demir taşıyıcı) demirin yetersiz bulunduğu ortamda ökaryotik, prokaryotik ve yüksek organizmalar tarafından salınan düşük molekül ağırlıklı metal şelat bileşiklerdir ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilmektedirler (Saha vd., 2012; Erdem, 2013; Cornu vd., 2014). King B kültür ortamı fluoresens pigmentlerin üretimini uyarmakta

kullanılır. King B besiyerinde klinik izolatların % 70'i bu pigmenti üretir. Bu pigmentin floresan vermesi için UV ışığına ihtiyaç duyulur (Kayar, 2009). Yapılan çalışmalar bakteri ve mantarların demir dışındaki metallerin siderofor üretimini teşvik ettiğini göstermektedir. Piyoverdin, floresan Pseudomonadlar tarafından piyoselin ile birlikte demir alımı için salgılanan ana sideroforlardan biridir (Chiado vd., 2013). *P. aeruginosa* suşları, piyoverdin ve piyoselin üretemeyen bir suşa göre toksik metallere karşı daha az hassastır (Braud vd., 2010).

### **1.7.1.1.3. Piyorubin**

Piyorubin; bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen parlak kırmızı renkte, kloroformda çözünmeyen, suda çözünebilen bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini kaybetmektedir. İster asidik ister bazik olsun tüm pH derecelerinde kırmızı renktedir (Töreci, 1981; Akoğlu, 2006). Piyorubin klinik izolatların % 2'sinde üretilir (Kayar, 2009).

### **1.7.1.1.4. Piyomelanin**

Piyomelanin; *P. aeruginosa* kökenlilerin % 2-3'ü tarafından üretilen ve başka hiçbir bakteri tarafından sentezlenmeyen, kloroformda erimeyen suda eriyen, kahverengimsi siyah renkte bir pigmenttir (Özcan, 2011).

## **1.8. Serbest radikaller**

Atmosferin % 21'ini oluşturan oksijenin, aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmaz bir gerçektir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrielerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık % 5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüşmektedir (Torlak, 2014). İnsan yaşamı için oksijen çok elzem olmasına rağmen, metabolizma faaliyetleri sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir şekilde zarar verme potansiyelindedir (Diplock, 1998; Torlak, 2014). Birçoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin kimyasal reaktivitesi, normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, daha yüksek enerjili oksijen formları olduğu görülür (Nawar, 1996; Torlak, 2014).

Serbest radikaller, dış atomik yörüngelerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşik olarak adlandırılırlar (Aydemir ve Sarı, 2009).  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak adlandırılmazlar, ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol almaktadırlar (Özcan, 2011). Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötr olabilirler.

Normal atom veya molekülde elektronlar eşlenik bulunmaları nedeniyle reaktif değilken, bu çiftlenmemiş elektronlar SOR'lara büyük bir reaktivite kazandırır. Bu özellikleri DNA, nükleotid, protein, lipid ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermekte ve çeşitli biyolojik problemlere neden olmaktadır. Organizma sürekli olarak serbest radikal türevleri ile karşı karşıya kalmaktadır (Reiter, 1995). Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve organizmada meydana gelebilecek olası etkileri içsel mekanizmalarla önlenmektedir. Fizyolojik dozlardaki serbest oksijen radikalleri sinyal iletimi ve bağışıklık cevabı gibi olaylarda önemli roller üstlenirler (Özcan, 2011).

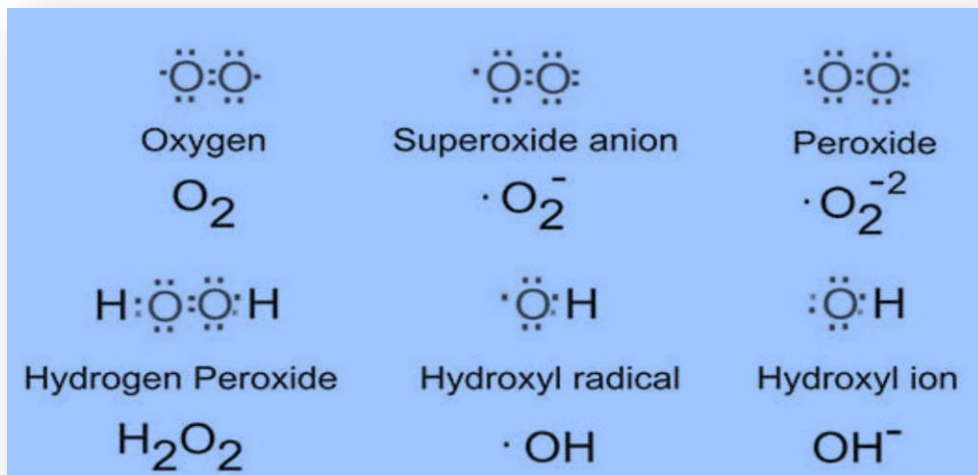
### **1.8.1. Reaktif oksijen türleri (ROT)**

Reaktif oksijen türleri (ROT), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, radyasyon, pestisitler, çevre kirlenmeleri, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kirlenmiş sular gibi birçok eksojen etmenin sebep olduğu oksijen türevleridir (Karadeniz ve Koca, 2003; Özcan, 2011). Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin endojen kaynakları ise oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, endoplazmik retikulum, peroksisom, mitokondriyal elektron transport sistemi ve plazma membranı sayılabilir. Çizelge 1.2'de bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ( $^1O_2$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH$ ), peroksil ( $ROO$ ) ve alkoksil ( $RO$ ) radikalleri gösterilmiştir (Kaur ve Kapoor, 2001; Karadeniz ve Koca, 2003).

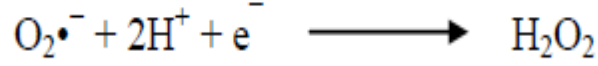
**Çizelge 1.2.** Oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türleri (Yalçın, 2007)

Tür Adı		Tür Adı	
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen	$\text{HO}_2^\cdot$	Hidroperoksil radikali
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit	$\text{NO}^\cdot$	Nitrik oksit
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit	$\text{NO}_2$	Nitrojen dioksit
$^\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali	$\text{NO}_2^+$	Nitril kasyonu
$\text{ROO}^\cdot$	Peroksil radikali	$\text{ONOO}^-$	Peroksinitrit
$\text{ROOOH}$	Hidroperoksit	$\text{ONOO}^\cdot$	Peroksinitrit radikali
$\text{RO}^\cdot$	Alkoksil radikali	$\text{N}_2\text{O}_3$	Dinitrojen trioksit

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile meydana gelir. Serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )'e indirgenir. Hidrojen peroksit Şekil 1.9'daki gibi eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal özellik göstermez (Davies vd., 1995).

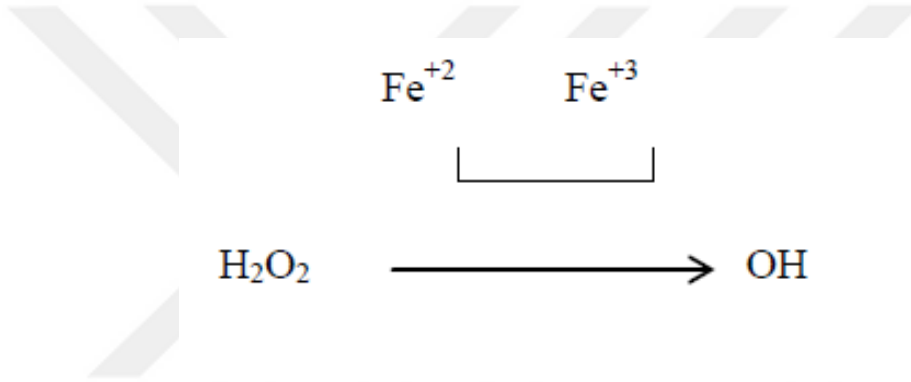


**Şekil 1.9.** Reaktif oksijen türleri



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallere (fenton reaksiyonu) varlığında toksik  $\cdot\text{OH}$  radikaline dönüşür:

Fenton reaksiyonu;



Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; ilk karşılaştığı molekül ile 14 Å mesafesinde ve 10-16 sn. içinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi sebebi ile protein, karbonhidrat, lipitler ve DNA gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olmaktadır. Makromoleküller hücrelerde hayati görevlerde bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. *In vivo* ortamda herhangi bir  $\cdot\text{OH}$  radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekmektedir. Bu sebeple  $\cdot\text{OH}$  radikalinin oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkili olmaktadır (Reiter vd., 2001; Torlak, 2014).

### 1.9. Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “*antioksidan*” adı verilir (Elliot, 1999; Özcan, 2011). SOR’ların oluşumunu, meydana getirdikleri

hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört farklı yolla etki göstermektedir.

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme gibi “süpürücü etki” de bulunurlar. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller, SOR'lara bu yolla etki gösterirler ( Reiter, 1995; Karihtala ve Soini, 2007).

2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen ilavesiyle aktivitelerini azaltma yönünde veya “inaktif şekle dönüştürücü etki” de bulunurlar. Vitaminler, flavanoidler inaktif şekle dönüştürücü etki gösterirler (Cherubini vd., 2008).

3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki “zincir kırıcı etki” dir. Mineraller, hemoglobinin ve seruloplazminin bu tarz bir etkiye sahiptirler (Mickle ve Weisel, 1993)

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” de bulunurlar.

Antioksidanlar endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılır.

### **1.9.1. Endojen antioksidanlar**

Endojen antioksidanlar; enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

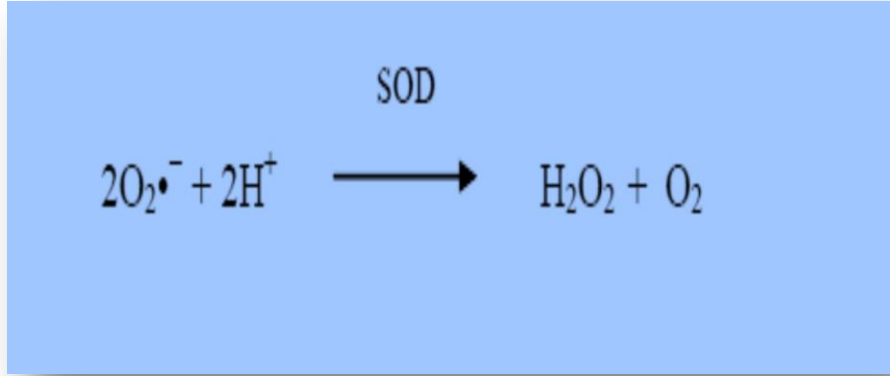
**1.9.1.1. Enzim olan endojen antioksidanlar:** Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferaz (GST), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz (Thrane vd., 2007).

#### **1.9.1.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)**

SOD, süperoksit serbest radikalının ( $O_2^{\cdot -}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan özellik gösteren, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan metalloenzimlerdir.

Normal metabolizma faaliyeti esnasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit radikali üretilmesine karşı hücre içi düzeyi SOD enzimi sayesinde Şekil 1.10'da görüldüğü gibi düşük tutulur. Süperoksit radikallerinin,  $H_2O_2$  ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Sheng vd., 2004). Fakat,  $H_2O_2$  geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber-

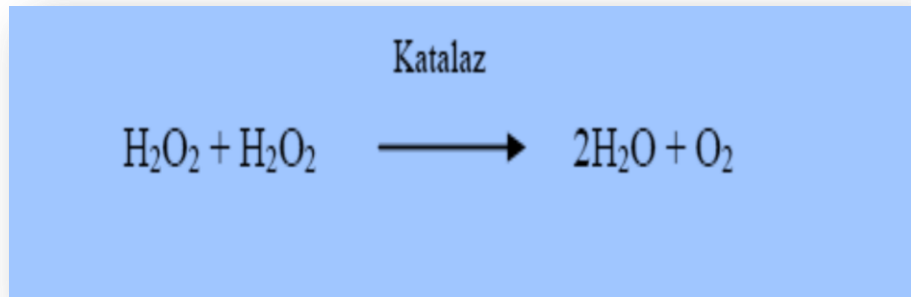
Weiss reaksiyonu ile son derece aktif  $\cdot\text{OH}$  radikaline dönüşmektedir. Bu durumda, hücredeki Katalaz ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktivitesi artırılarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  düzeyleri kontrol altına alınmaktadır (Torlak, 2014).



Şekil 1.10. SOD etkinliği

#### 1.9.1.1.2. Katalaz

Katalaz enzim ailesi içerisinde bulunan üç sınıfta (mono-fonksiyonel katalazlar, katalaz peroksidazlar ve mangan katalazlar) hücresel fonksiyonların devamı için yeterli derecede hidrojen peroksit parçalayabilme kabiliyetine sahip, genel olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda üretilen bir antioksidan enzimdir (Özkarlı, 2011). Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir (Larson, 1988; Torlak, 2014). SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Şekil 1.11'deki gibi "katalaz" enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüşmektedir (Duthie vd., 1989).



Şekil 1.11. Katalaz etkinliği



Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle beraber, ·OH radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir öncül madde olarak rol almaktadır (Özcan, 2011).

**1.9.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar:** Melatonin, metiyonin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, laktoferrin, albumin, bilirubin, glutatyon, sistein, serüloplazmin, urat, transferin (Reiter, 1995).

#### **1.9.1.2.1. Glutatyon (GSH)**

Glutatyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen tiyol grubu içeren bir tripeptittir. Karaciğerin de dahil olduğu pek çok dokuda glutatyon, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Sentezde  $\gamma$ -glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizör olarak görev yapmaktadır.

GSH hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu vb.) yanı sıra çok önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korurken, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol almaktadır (Cochrane, 1991; Diril, 2013). Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutup bu grupları oksidasyona karşı korumaktadır. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemektedir. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda ve aminoasitlerin membranlardan taşınmasında da görev almaktadır.

GSH; göz lensini, eritrositleri ve lökositleri oksidatif strese karşı korumada çok önemli bir yere sahiptir. Yapılan araştırmalar, GSH eksikliğinin oksidatif stresin yanında AIDS, Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi birçok hastalığın sebebi olabileceğini ortaya koymaktadır (Ross, 1988).

#### **1.9.2. Eksojen antioksidanlar**

Vitamin ve ilaç olarak kullanılan olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

**1.9.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar:** Askorbik asit (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, Folik asit (folat).

### **1.9.2.2 İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:**

Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), enzimatik olmayan serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar), rekombinant süperoksit dismutaz trolox-C (vitamin E analogu), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), ‘ozon’ şeklinde sıralayabiliriz (Diril, 2013; Torlak, 2014).



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Pseudomonas*, neredeyse tüm kirlenmiş bölgelerde bulunan en önemli bakterilerden biridir. Atıksularda *Pseudomonas* cinsi bakterilerin fazla bulunması, bakterilerin bu sulardaki ekstrem şartlara karşı dayanıklılığını sağlayan ürettikleri EPS, piyosiyenin ve ramnolipid gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle atıksularda *Pseudomonas* cinsi bakteri fazla miktarda bulunmaktadır. Yapılan çalışmada *Pseudomonas* izolatlarına  $Cd^{2+}$  için 10, 20, 30, 40 ppm konsantrasyonları uygulanırken,  $Mn^{2+}$  için 100-200-300-400 ppm konsantrasyonları uygulanmış ve ekzopolisakkarit miktarları tespit edilmiştir (Yalçın, 2016).

Hücre dışı besiyerinde sideroforlardan piyoverdin ve piyoselin varlığı *P. aeruginosa*'da toksik metal birikimini azaltıp ve bakteriyel metal toleransını arttırmıştır. Braud ve ark. (2010) yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa* suşu PAO1, piyoverdin ve piyoselin üretemeyen bir suşa göre toksik metallere karşı daha az hassas olduğu sonucuna varmışlardır. Metal olmayan ve 100  $\mu M$  konsantrasyonda metallerin büyüme inhibisyonları karşılaştırılmış:  $Co^{2+}$  ve  $Ga^{3+}$  sırasıyla % 76 ve % 46;  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Tl^{+}$ ,  $Zn^{2+}$  % 25 ve  $Cd^{2+}$  % 12 inhibe ettiğini raporlamışlardır. Her iki sideroforun toksik metallere ( $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Tb^{3+}$  ve  $Zn^{2+}$ ) karşı koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Piyoselin  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Tb^{3+}$  için piyoverdinden daha etkili iken, piyoverdin  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metalleri için daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca piyoselin sentezi 10  $\mu M$   $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  tarafından baskılanırken, piyoverdin sentezi 10  $\mu M$   $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$   $Ni^{2+}$  ve 100  $\mu M$   $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ile baskılandığını tespit etmişlerdir (Braud vd., 2010).

Braud ve ark. (2010) yaptığı metal dirençliliği çalışmasında ise, *P. aeruginosa* hücreleri; 50  $\mu M$  piyoverdin ve 100  $\mu M$  piyoselin pigmentleri ile birlikte yada ayrı olarak 5  $\mu M$  metal konsantrasyonu ile 29 °C 45 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre yüzeylerindeki metali elimine etmek için hücreler yıkanarak ve ICP-AES analizi yapılmıştır. Metaller değerlendirilmiş ve sonuçta;  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Tb^{3+}$  metalleri 2.8 den 4.2  $\mu mol g^{-1}$  konsantrasyon bakteri içine katılmıştır (Braud vd., 2010).

Biyoağmentasyon destekli fito-ekstraksiyon, mikrobiyal metabolitler tarafından daha büyük metal mobilizasyonu sayesinde fito-ekstraksiyon etkinliğini artırabilir. Braud ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada; *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* 'inyeşil fluoressan protein etiketli hücreleri siderofor üreterek Cr (488 mg

kg<sup>-1</sup>) ve Pb (382 mg kg<sup>-1</sup>) içeren bir tarımsal toprağa bu bakterileri aşılama ve mısır ekmişlerdir. Deneyde yağsız süt kullanılarak bakteri hücrelerinin hayatta kalması sağlanarak siderofor üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Yağsız sütle birlikte verilen immobilize *P. aeruginosa* hücreleri ile yapılan aşılama, mısır filizlerinde Cr ve Pb alımını sırasıyla 5.4 ve 3.8 oranında artırdığını bildirmişlerdir (Braud vd., 2009).

Chang ve ark. (1997) yaptığı çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* PU21 'nın ağır metal biyosorpsiyonu çalışmışlardır. Yapılan çalışmada; inaktif ve istirahat hücrelerinde Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ve Cd<sup>2+</sup> metallerinin farklı pH (3-6) değerlerinde biyosorpsiyonu araştırmışlardır. pH değeri 3.0'dan 6.0'a yükseltildiğinde, adsorpsiyon kapasitesi, inaktive edilmiş hücreler ve istirahat hücreleri için benzer eğilimler doğrultusunda önemli ölçüde arttığını rapor etmişlerdir. İstirahat hücrelerinde, Pb<sup>2+</sup> pH 5.5'da başlangıç miktarı 375 mg/litre iken adsorpsiyon sonrası yaklaşık 98 mg/litre, Cu<sup>2+</sup> pH 5 'te başlangıç miktarı 270 mg/litre iken adsorpsiyon sonrası yaklaşık 22 mg /litre ve Cd<sup>2+</sup> pH 6'da başlangıç miktarı 170 mg /litre iken adsorpsiyon sonrası yaklaşık 40 mg /litre metal biyosorbe ettiğini rapor etmişlerdir. *P. aeruginosa* PU21'in üç ağır metalin yüksek konsantrasyonlarına olan direnci, ağır metal tedavileri için uygun olduğunu bildirmişlerdir (Chang vd., 1997).

Alg, mantar ve bakterilerin biyokütlesinin metal iyonlarını kolayca adsorbe ettiği veya biriktirdiği bilinmektedir. Bu organizmalar tarafından metal alım kabiliyeti (biyosorpsiyon veya biyobirikim), ağır metal kirliliğinin düzeltilmesi için etkili ve ekonomik potansiyeli nedeniyle büyük dikkat çekmiştir.

Biyofilm-EPS zengin bir polisakkarit, protein ve nükleik asit içeriğine sahiptir. Bunun yanı sıra, EPS ve biyofilmler toksik metallerin biyosorpsiyonunda büyük bir etki göstermiştir. Chakraborty ve Das (2014), *P. aeruginosa* JP-11 aerobik koşullarda CdCl<sub>2</sub> metalinde Cd<sup>2+</sup>'nin MIC değerini 1.250 ppm ve Cd<sup>2+</sup> dirençliliğini 1.000 ppm olarak tespit etmişlerdir. 50-250-450-650 ve 850 ppm Cd<sup>2+</sup> uygulanmış ve maksimum biyofilm-EPS üretiminin 650 ppm konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Hücreler tarafından salgılanan biyofilm ve EPS, sırasıyla % 58.760 ± 10.62 ve % 29.544 ± 8.02 oranında Cd<sup>2+</sup>'yi etkili bir şekilde gidermektedir. CdCl<sub>2</sub> (500, 1,000 ve 2,500 ppm) çeşitli konsantrasyonlarda uygulamışlar ve Cd<sup>2+</sup>'un bakteri büyümesine etkisini araştırmışlardır. Sonuçta bakteri 1.000 ppm Cd<sup>2+</sup> direnç gösterirken ve büyüme varken, 2.500 ppm konsantrasyonda büyüme gözlenmediği bildirilmiştir (Chakraborty ve Das, 2014).

Deredjian ve ark. (2011), çevresel örneklerden izole edilen 130 *Pseudomonas putida* türünün ağır metal dirençliliğinin araştırıldığı bir çalışmada, çevresel örneklerden alınan örneklerdeki *P. aeruginosa* türlerinin  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  metaline çok dirençli olduğunu bildirmişlerdir.  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  yapısal olarak benzer olduğundan direnç bakımından her iki ağır metal ortak özellikler göstermektedir (Deredjian vd., 2011).

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), ağır metal içeren besiyerinde üretilen ağır metal dirençli bakteri suşlarının plaklarda üremesinin ardından ağır metal konsantrasyonunun yavaş yavaş artırılmasıyla toksik metalin büyüme üzerine etkisi belirlenmiştir.

Filali ve ark. (2000) atık sularda izole edilen bakterilerin ağır metal, antibiyotik dirençliliğini ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerlerini araştırmışlardır. Sonuçta; triptikaz soy agar (TSA) ortamında üretilen *P. aeruginosa*'ya  $CdCl_2$  metal uygulaması sonrası (500–1000–3000–4000–6000–8000–12000–16000  $\mu M$ )  $Cd^{2+}$  MIC değerinin 2000  $\mu M$  olduğunu tespit etmişlerdir ( Filali vd., 2000).

Gupta ve ark. (2001) *P. aeruginosa*'ya 6 ve 12  $\mu M$  konsantrasyon  $MnCl_2$  metalini uygulayarak siderofor ve protein miktarı tayin etmişlerdir. 12  $\mu M$   $MnCl_2$  uygulamasında siderofor konsantrasyonun yaklaşık 12. saatte 8  $\mu M/ml$ , 48. saatte 25  $\mu M/ml$  olduğunu tespit etmişlerdir. Protein içeriği ise 12  $\mu M$   $MnCl_2$  uygulamasında yaklaşık 12. saatte 15  $\mu M/ml$ , 48. saatte 34  $\mu M/ml$  kadar arttığını rapor etmişlerdir (Gupta vd., 2001).

Gupta ve ark. (2004) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *P. aeruginosa* NBRI 4014 mutantına King ortamında pH 9'da  $Ni^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  metalleri uygulayarak biyoakümülayonunu araştırmışlardır. Mutanta 420  $\mu M$   $Ni^{2+}$ , 370  $\mu M$   $Cr^{2+}$  ve 180  $\mu M$   $Cd^{2+}$  metal uygulamışlar ve mutant metal direnci göstermiştir.  $Cd^{2+}$  3.0 mA ışık akışında ABS 228.8 nm'de 0.009  $\mu g/ml$ ,  $Ni^{2+}$  4.0 mA ışık akışında ABS 232 nm'de 0.04  $\mu g/ml$  ve  $Cr^{2+}$  6.0 mA ışık akışında ABS 357.9 nm'de 0.05  $\mu g/ml$  hassasiyeti kaydedilmiştir. pH 9'da  $Ni^{2+}$  (2.0874 mM / g),  $Cd^{2+}$  (2.295 mM / g) ve  $Cr^{2+}$  (2.997 mM / g) biriktirebildiklerini göstermişlerdir (Gupta vd., 2004).

Gülcan (2006) yaptığı tez çalışmasında elde ettiği deney sonuçlarına göre, metallerin 300 mmol/L'lik konsantrasyonları baz alındığında, metallerin *P. aeruginosa* P16 üzerine etki dereceleri  $Mn < Zn < Al < Cu < Cr = Ni < Cd = Co < Pb$  şeklinde bulunmuştur. Kullanılan metallerin, 300 mmol/l'lik konsantrasyonları baz alındığında,

*P.aeruginosa* P22 üzerine etki dereceleri  $Al < Cu < Ni = Zn = Mn = Cd < Cr < Pb < Co$  şeklinde olduğunu vurgulamıştır (Gülcan, 2006).

Hassen ve ark. (1998a) *P. aeruginosa* suşlarına karşı krom, bakır, çinko kobalt ve civa metallere toksik etkilerini araştırmışlar ve bu metallere toksik etki yapan konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada suşların krom, bakır, çinko ve kobalt metallere 1 mmol l<sup>-1</sup> konsantrasyonunda inhibe oldukları, civa metalinin ise 0.1 mmol l<sup>-1</sup> konsantrasyonunun toksik etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bakır ve kromun bakteriler tarafından en iyi tolere edilebilen metaller olduğunu bildirmişlerdir. Bakır ve çinko bakteri gelişiminde temel metallerdir; ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterirler (Hassen vd., 1998a).

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin metal iyonlarını tolere etme kapasiteleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Hassen ve ark. (1998b) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* ve *B. thuringiensis* bakterilerine çeşitli ağır metaller uygulanmışlar; biyosorbisyon, pigment üretimi ve protein içeriklerini araştırmışlardır. Sonuçta *P. aeruginosa*'nın Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup> ve Cd<sup>2+</sup>'ye karşı *B. thuringiensis*'den daha dirençli olduğu bildirilmiştir. *P. aeruginosa*'ya 0.5 ve 1 mM Cd<sup>2+</sup> metali uygulandığında bakteri büyümesi 16. saatten sonra artmış 0.5 mM metalde OD<sub>600</sub> yaklaşık 1 iken, 1 mM metalde 0.8 ABS bulunmuştur. 1 mM Cd<sup>2+</sup> uygulamasında 70 ± 15 µg ml<sup>-1</sup> protein ve piyoverdin pigmenti tespit etmişlerdir (Hassen vd., 1998b).

Hassan ve ark. (2008) yaptığı çalışmada *Pseudomonas* spp.'nin altı izolatında çeşitli ağır metaller uygulanmışlar. *P. aeruginosa* ASU 6a izolatının düşük ağır metal konsantrasyonunda büyüme artar iken, giderek artan konsantrasyonda büyüme azalmaktadır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) sırasıyla Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> için 6.3, 5.9, 6.8, 9.2, 5.8, 4.4 ve 3.1 mM bulunmuştur. Yapılan çalışmalar ağır metallerin *Pseudomonas* spp. izolatlarına karşı toksisitesi, Pb<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Cr<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup>; bu yüzden kurşun, kadmiyum ve krom Ni<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup>'den daha toksiktir. *P. aeruginosa* ASU 6a LB ortamında 0,85-1,7-3,4-5,1 mM Ni<sup>2+</sup> ve 0,25-0,5-1,0-1,5-2,0 mM Pb<sup>2+</sup> uygulamışlar ve sonuçta artan konsantrasyonda OD<sub>600</sub> büyüme eğrisinde azalışın olduğunu tespit etmişlerdir. (Hassan vd., 2008).

Hasset ve ark. (1992) yaptığı çalışmada *P. aeruginosa* bakterisinin büyüme ortamına fosfataz (mM), FeNO<sub>3</sub> ve MnCl<sub>2</sub> (µM) ilave edip piyosiyenin, SOD ve katalaz aktivitelerini karşılaştırmışlardır. 0.1 (mM) KP<sub>i</sub>; 3 (µM) FeNO<sub>3</sub> ve MnCl<sub>2</sub>

ilavesinde 10.9 µg/ml piyosiyenin, 2.340 U/mg protein katalaz ve 98 U/mg protein SOD aktivitesi tespit etmişlerdir. 0.1 (mM)  $KP_i$ ; 300 (µM)  $MnCl_2$  ve 0.6 (µM)  $FeNO_3$  ilavesinde 1.6 µg/ml piyosiyenin, 1.732 U/mg protein katalaz ve 54 U/mg protein SOD aktivitesi tespit etmişlerdir (Hasset vd., 1992).

Haroun ve ark. (2017) çeşitli ağır metallerin MIC değerlerini araştırmışlardır. Çalışmada  $CdCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $PbCl_2$  metallerinin 1- 2- 5- 10- 20- 30- 50 mM konsantrasyon uygulama sonrası agar plakalarda MIC değerlerinde büyüme yüzdeleri 1 mM  $CdCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $PbCl_2$  uygulama sonrası % 100 iken, 5 mM  $CdCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $PbCl_2$  uygulama sonrası sırasıyla % 15, % 35 ve  $PbCl_2$  % 49 olarak rapor edilmiştir. 10 mM  $CdCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $PbCl_2$  uygulama sonrası ise sadece  $PbCl_2$  % 15 tespit edilmiştir (Haroun vd., 2017).

Harrison ve ark. (2005) yaptığı çalışmada, metallerin aerobik olarak LB ortamında üretilen toprak bakterisi fırsatçı patojen *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı biyofilmler ve planktonik kültürlerinin toksisitesi açısından incelemişlerdir. Biyofilmlerin metal katyonların öldürülmesine karşılık gelen planktonik kültürlerden yaklaşık 2 ila 25 kat daha toleranslı olduğu sonucuna varmışlardır. Minimum ve zengin ortamlarda farklı maruz kalma sürelerinde (2-27saat) *P. aeruginosa* ATCC 27853 planktonik ve biyofilm kültürlerini yok etmek için gereken metal iyonlarının bakterisit konsantrasyonları karşılaştırıldığında minimal ortamda MIC değerleri  $Ni^{2+}$   $0.60 \pm 0.21$  mM ,  $Pb^{2+}$   $1.2 \pm 0$  mM iken; zengin ortamda  $Ni^{2+}$   $17.0 \pm 0$  mM ,  $Pb^{2+}$   $12 \pm 5$  mM olduğunu tespit etmişlerdir (Harrison vd., 2005).

Hussein ve ark. (2003) *Pseudomonas* türlerinde  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Cr^{2+}$  ağır metallerin toksisitesine olan dirençliliğinde pH'nın etkisini araştırmışlardır. Optimum büyümenin  $Ni^{2+}$  ve  $Cr^{2+}$  için pH'ın 5.5  $Cd^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  için 6 olduğunu tespit etmişlerdir (Hussein vd., 2003).

Hussein ve ark. (2004), *Pseudomonas* bakterilerinin  $Cr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  metallerini biyosorbsiyon kapasitelerini araştırmışlar. 1, 2, 5 ve 10 mmol/l konsantrasyonda metal uygulayıp biyosorbsiyon kapasiteleri karşılaştırılmış ve sonuçta, maksimum adsorbsiyon kapasitesi  $Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Cr^{2+}$  olduğunu kaydetmişlerdir. Metal kombinasyonlarından  $Ni^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  kombinasyonunda, metallerin birbirlerinin toksik etkilerini kapattıkları sonucuna varmışlardır. Ayrıca; bu metallerin optimum pH'larının  $Ni^{2+}$  için 5.5,  $Cd^{2+}$  için 6 olduğu tespit edilmiştir (Hussein vd., 2004).

*Pseudomonas* türlerinde de sisteyince zengin bir protein sentezlenmekte ve hücre içine giren toksik metaller bu tür proteinlere bağlanarak bakteriyi toksik metallere karşı daha dirençli hale getirmektedir. Yapılan bir çalışmada *P. putida*'nın da metalloprotein ürettiği bildirilmiştir (Bruins vd., 2000b).

Kang ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada; çeşitli su ve atıksu arıtma uygulamalarında Cr (III-VI)'un geri kazanımı için *P. aeruginosa*'nın kullanılma potansiyelini çalışmışlar ve kirlenmiş sulu ortamların iyileştirilmesi için biyolojik ajanların kullanılmasının etkinliği sonucuna varmışlardır (Kang vd., 2007).

Lo'pez ve ark. (2000) *P. fluorescens* 4F39 ile pH'ın nikel ve diğer ağır metallerin biyosorpsiyonu üzerine etkisini çalışmışlar ve  $Ni^{2+} > Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Cr^{2+} > Pb^{2+}$  şeklinde metal birikimini göstermişlerdir. Nikelin pH 9'da en etkili biyosorpsiyon yaptığını tespit etmişlerdir.  $Pb^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  pH 5'de,  $Cd^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ise pH 7'de incelenmiştir, daha yüksek pH değerlerinde bu metallerin çöktüğünü tespit etmişlerdir (Lo'pez vd., 2000).

Matyar ve ark. (2009)' da yaptıkları bir çalışmada ağır metallere karşı toleranslı bakterilerin % 60.2'sini kadmiyuma, % 6.5'i kroma ve kurşuna, % 8.6'sı manganeye, % 50.5'i bakıra karşı toleransı tespit etmişlerdir (Matyar, 2009).

Matyar ve Akkan (2010) yaptığı bu çalışmada İskenderun Körfezi'ndeki üç farklı bölgeden izole ettiği bakterilere altı ağır metalin direnç analizini yapmışlardır. *Pseudomonas* izolatlarının metal dirençliliği  $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+} > Cr^{2+} > Pb^{2+}$  şeklinde iken;  $Cu^{2+}$  % 75.4,  $Cd^{2+}$  % 56.5,  $Mn^{2+}$  % 44.9,  $Zn^{2+}$  % 41.3,  $Cr^{2+}$  % 31.9,  $Pb$  % 7.2 metallerine bu yüzdelerde direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Matyar ve Akkan, 2010).

McEldowney (2000) tarafından yapılan bir çalışmada; *P. fluorescens* H<sub>2</sub>'nin gelişme ortamına eklenen  $Cd^{2+}$ 'nin % 65'ini hücre duvarına bağlayabildiği gösterilmiştir (McEldowney, 2000). Pardo ve ark. (2003) yaptığı çalışmada ise -40 °C'den -50 °C'ye kadar soğutulmuş inaktive hale getirilen *P. putida*'nın Cd(II), Cu(II), Pb(II) ve Zn(II) metallerini bağlayabildiği tespit etmişlerdir. Hücrelerin pH ile metal bağlanma özelliklerinin değiştiği göstermişlerdir (Pardo vd., 2003).

Naik ve Dubey (2013) ise *P. aeruginosa* 4EA suşunun 0.8 mM  $Pb^{2+}$  ve 0.4 mM  $Cd^{2+}$  karşı direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir (Naik ve Dubey, 2013).

*P. stutzeri*'nin liyofilize hücreleri tarafından çevreden gelen ağır metallerin biyosorpsiyonu üzerinde araştırma yapmışlardır. Pb(II), Cd(II) ve Cu(II) metalleri



kullanmışlar. Sonuçta; *P. stutzeri*'nin biyokütlesine karşı metal iyonları için seçicilik sırası, belirli bir başlangıç metal iyonları konsantrasyonu (50-100-150-200-300 mg/l) için Pb (II) >Cd (II) >Cu (II) olduğunu bildirmişlerdir (Sang, 2009).

Yapılan diğer bir çalışmada, Akkan ve ark. (2013)'de İskenderun Körfezi deniz suyundan 3 farklı bölgeden izole ettiği çok sayıda Gram negatif bakterilerin % 100 kadmiyum ve bakıra karşı direnç gösterdiğini belirtirken, manganeze % 90.7 mangana ise % 7.1 oranında dirençli olduğunu rapor etmişlerdir (Akkan, 2013).

Sonuçlar, ağır metal dirençli bakterilerin ağır metal kontaminasyonuna bağlı olarak birçok filogenetik gruptan bakteride bulunduğu ve bu bakterilerin doğada yaygın olduğunu bildirmektedir. Çeşitli ortamlarda izole edilen ve tanılanan türler ağır metal ile kirlenmiş çevrelerde metal konsantrasyonunu düşürmek ya da gidermek için yani bioremediasyon amaçlı veya ağır metal belirlenmesinde biyosensor yapımında kullanım için bir pozitif özellik göstermektedir.

Bir diğer çalışmada *Pseudomonas* cinsine ait *P. mendocina* PASS3-P18 ve *P. mendocina* DS0601-FX-P22 bakterilerinde Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> gibi ağır metaller ve Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Al<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> gibi metallerin Cr<sup>6+</sup> indirgemeye etkilerinin tespiti araştırılmıştır (Evgen, 2012).

Aouada ve ark. (2006) yaptığı deneyde, casamino asit ortamında (CAA), vitrifiye dip kül (VBash) ve bazaltik cam ortamında kısa süreli ve uzun süreli yapılan deneylerde, bakterili ortam pH'sı 7.5, bakterisiz ortam 7.2 olarak ayarlanmıştır. Çözelti analizi ile ilgili olarak, CAA ortamında bakteri olsun ya da olmasın demir seviyesi tespit edilmemiştir. VBash ve Basalt ortamında yüksek bulunmuştur. Buna karşılık bazalt ortamında VBash ortamından daha az nikel varken, CAA ortamında nikel konsantrasyonu değişmeden kaldığını gözlemlemişlerdir. *P. aeruginosa*'nın sarı yeşil fluoresan pigmenti olan piyoverdin üretiminde ve bakteriyel büyümede belirgin bir artış tespit etmişlerdir. Piyoverdin sentezi 73±12 mg/l iken, bakteri hücresi kuru ağırlığında 740±6 mg/l büyüme boyunca sabit bir değer kaydetmişlerdir. Uzun süreli 174 gün süren deneyde, VBash ortamında nikel konsantrasyonunun ICP-AES cihazında 174 gün sonra büyüme ortamında 18.5 µg, bakteri hücresinde 4.2 µg, biyofilm içerisinde 2 µg toplamda 24.7 µg nikel tespit edilmiştir. Steril ortamdaki çözünmüş nikel miktarı ise 58 µg rapor etmişlerdir (Aouada vd., 2006).

Son yıllarda, bitki kökünde bulunan özellikle pseudomonaslar tarafından oluşturulan sideroforlar ve patojenlerin üremesini inhibe eden antimikrobiyal metabolitler biyolojik kontrol de önem kazanmıştır (Erdem, 2013).

*P. aeruginosa*, geniş çapta biyosorbisyon kapasitesine sahip olduğundan çalışmalarda biyokataliz olarak kullanılır. *P. aeruginosa* çok düşük enerji üretiminde biyokatalizör olarak rol almaktadır. Caparanga ve ark. (2017) mikrobiyal bir yakıt hücresinde ağır metallerin ( $Fe^{3+} / Cr^{6+}$ ) düşük seviyeli enerji üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada *P. aeruginosa* bakterisi kullanılmışlardır. Enerji üretiminde substrat olarak 150, 300, 600 ppm glikoz ve 10, 50, 100 ppm ağır metal kullanarak düşük seviyede enerji elde etmişlerdir.  $Cr^{6+}$  varlığında enerji potansiyeli 565'ten 201 mV'a düşerken,  $Fe^{3+} / Cr^{6+}$  birlikteliğinde enerji potansiyeli 565'ten 703 mV'a yükselmiştir. Çalışma esnasında üretim boyunca *P. aeruginosa* etrafında piyosiyanın pigmentinin varlığı gözlenmiştir (Caparanga vd., 2017).

Diğer bir çalışmada, metallere veya oksidatif bir stres ajanına maruz kalan *P. aeruginosa*'nın piyoverdin üretimi araştırılmıştır. Kadmiyum, ortamda demir varlığında siderofor sentezini baskılayan Fur düzenleyici proteini ayırıp onunla etkileşime girebilir. Metil viologen bir oksijen radikal üreticisidir ve bakteri buna maruz kaldığında piyoverdin üretimini azalttığı keşfedilmiştir. Ganesan üç *Pseudomonas* MKRh1, MKRh3 ve MKRh4 suşlarında  $CdCl_2$  metalinde  $Cd^{2+}$  MIC değerini 7 mM olarak bulmuşlardır (Dao vd., 1999; Ganesan, 2008).

*Pseudomonas* sp.'ler tarafından üretilen ramnolipid aktif maddelerin, sentetik yüzey aktif maddeye göre tamamen biyolojik olarak parçalandığı ve daha az toksik olduğu bulunmuştur. Bushnell-Haas (BH) besi ortamı ve proteaz, pepton, glikozamonyum tuzları (PPGAS) ortamında  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  varlığında piyosiyanın miktarları araştırılmıştır. M15 kültüründen elde edilen hücrelerin iyi miktarda piyosiyanın oluşturdukları ve ağır metallerin etkisine daha toleranslı oldukları bulunmuştur. Bu kültürlerin 72 saat boyunca ağır metallerle işlemde sonra bile daha fazla sayıda hücrenin hayatta kaldığını rapor etmişlerdir. Ağır metallerden herhangi birinin varlığında PPGAS ortamda daha fazla hücrelerin hayatta kalma yüzdesi % 85-100 arasında bulunmuştur. *P. aeruginosa* PAO1 suşu M15 suşundan daha az pigment üretmiştir (Das ve Ma, 2013).

Sinha ve Mukherjee (2008) yaptığı çalışmada *P. aeruginosa* bakterisine % 99 benzerlik gösteren KUCd1 suşunun  $Cd^{2+}$  varlığında siderofor üretimini araştırmışlardır. Bakteriyel suş  $Cd^{2+}$ 'u 8 mM kadar tolere edebilir ve hücre içi  $Cd^{2+}$  biriktirebilir. Kültür ortamında 1.75 mM  $Cd^{2+}$  konsantrasyonunda maksimum siderofor ürettiğini tespit etmişlerdir.  $Cd^{2+}$  metalinin büyümeye etkisini gözlemlemek için; 0.25 mM artan konsantrasyonda 0.25-4 mM aralığında  $Cd^{2+}$  metali

uygulamışlar ve sonuçta OD<sub>600</sub>'de ilk konsantrasyonda yaklaşık 2.1 ABS değerini alırken, 4 mM konsantrasyonda giderek azalıp 1.3 ABS değerini rapor etmişlerdir (Sinha ve Mukherjee, 2008).

Minimal ve zengin besi ortamına 0.01- 0.1- 1-10-100 mM konsantrasyonda Ni<sup>2+</sup> metali ilave ederek *P. aeruginosa* bakterisinin protein miktarlarını Sar ve ark. (1998) tayin etmişlerdir. Hücre proteinlerini; zengin ortamda 7 saat, minimal ortamda 12 saat sonra ölçmüşler ve minimal ortamda ilk konsantrasyonda yaklaşık 30 µg ml<sup>-1</sup>\*10 protein ölçülürken, zengin ortamda 55 µg ml<sup>-1</sup>\*10 protein ölçülmüştür. Artan konsantrasyonlarda protein miktarı giderek azalmakta ve 1 mM Ni<sup>2+</sup> de minimal ortamda 0 protein olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Ni<sup>2+</sup> 'in (400 µM) pH 3-8 aralığında protein miktarları karşılaştırılmış, özellikle pH 7'de yaklaşık 180 nmol Ni<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup> pH 5'de 80 nmol Ni<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup> protein olduğunu rapor etmişlerdir (Sar vd., 1998).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda; farklı doz, süre ve pH değerlerinde ağır metal uygulaması sonucu pigment üretimi, antioksidan enzim aktivitesi ve metal dirençliliğinin tespiti amacıyla bakterilerdeki adaptasyon mekanizmalarıyla ilişkili birçok biyobelirteçlerin araştırılması aşağıda belirtildiği şekilde planlanmıştır;

#### 3.1. Araştırmalarda Kullanılan Bakteri ve Saklanma Koşulları

Çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu Adıyaman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hesna YİĞİT'ten temin edilmiştir. Türün pasajlamaları her 20 günde bir taze nütrient agar besiyerine yapılıp ve ertesi gün para film ile sarılarak deneysel çalışmalar başlayana kadar +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir. Deneyler boyunca bu stoklar kullanılarak araştırma yapılmıştır.

#### 3.2. Araştırmalarda Kullanılan Besiyerleri

Aşağıda deneysel çalışmalar esnasında kullanılan besiyeri ve çözeltiler Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

**Çizelge 3.1.** Besiyeri ve çözeltiler

Besiyeri ve Çözeltiler	Gram/Litre
<i>Pseudomonas</i> Broth P, Base (Modifiye)	20 g Pepton 1.4 g MgCl <sub>2</sub> 10 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 ml Gliserol
King B	20 g Pepton 1.5 g MgSO <sub>4</sub> 1.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Luria Broth	10 g Pepton 10 g NaCl 5 g Maya ekstraktı
Nutrient Agar	5 g Pepton 1 g Et ekstraktı 2 g Maya ekstraktı 5 g NaCl 15 g Agar
Nutrient Broth	10 g Pepton 6 g NaCl 2 g Maya ekstraktı 1 g D(+) Glikoz
Plate Count Agar	1 g Dekstroz 5 g Tripton 2.5 g Maya ekstraktı 9 g Agar

Besiyeri olarak kullanılan tüm kimyasallar ve ağır metaller otoklavda 120 °C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dk steril edildikten sonra kullanılmıştır.

### 3.3. Araştırmalarda Kullanılan Metaller

Bu çalışmada; Mangan (II) klorür, Nikel (II) klorür, Kadmiyum sülfat ve Kurşun (II) klorür olmak üzere 4 farklı metal kullanılmıştır. *P. aeruginosa* uygun besiyeri ortamında tuz formundaki metallere maruz bırakılmıştır. Kullanılan metallerin isimleri ve molekül ağırlıkları (MA), tuz formlarının kimyasal formülü ve molekül ağırlıkları (MA) Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Metal isimleri ve MA'sı, tuz formlarının kimyasal formülü ve MA'sı

Metal isimleri	Metal MA'sı (g/mol)	Tuz formunun kimyasal formülü	Tuz formunun MA'sı (g/mol)	Marka
Mangan (II) klorür	54,93	MgCl <sub>2</sub>	125,83	Sigma-Aldrich
Nikel (II) klorür	58,69	NiCl <sub>2</sub>	129,59	Sigma-Aldrich
Kadmiyum sülfat	112,41	CdSO <sub>4</sub>	208,47	Sigma-Aldrich
Kurşun (II) klorür	207,21	PbCl <sub>2</sub>	278,11	Sigma-Aldrich

Pigment ve enzim çalışmalarımızda, ağır metal stresi için kullanılacak Mangan (II) klorür (MnCl<sub>2</sub>), Nikel (II) klorür (NiCl<sub>2</sub>), Kadmiyum sülfat (CdSO<sub>4</sub>) ve Kurşun (II) klorür (PbCl<sub>2</sub>) metallerinin tuz formları 10000 ppm'lik stok olarak hazırlandı. Bu çözeltilerin hazırlanması sırasında tuz formlarının kimyasal formülleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmış, gerekli miktarlar hassas terazide tartılarak saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiler otoklavda 120 °C'de 20 dk steril edildikten sonra 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Araştırma amacına bağlı olarak *Pseudomonas* Broth P, King B ve Luria broth (LB) besi ortamı bulunan erlenlere 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 250 ppm ve 500 ppm olacak şekilde, belirlenen dozu sağlamak amacıyla (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 2000 µl, 2500 µl ve 5000 µl) steril koşullarda stoktan eklenmiştir.

Metal dirençliliği çalışmaları için kullanılacak Kadmiyum sülfat (CdSO<sub>4</sub>) ve Kurşun (II) klorür (PbCl<sub>2</sub>) metallerinin tuz formları kullanılmıştır. Her iki metal için de 5000 ppm derişimlerinde ana stoklar hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanması

sırasında tuz formlarının kimyasal formülleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmış, gerekli miktarlar hassas terazide tartılarak saf su içerisinde çözülmüştür. Çalışma süresince farklı derişimlerde kullanılan ara stoklar (50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm) bu ana stok çözeltilerden steril koşullarda stoktan eklenmiştir.

### **3.4. Kültür Koşulları**

Bir gece inkübe edilen kültürler öze yardımıyla 10/100 ml LB besiyerine eklenerek 37 °C’de 15-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün gece kültüründen 100 µl alınarak 20/100 ml *Pseudomonas* Broth P, King B ve LB besiyeri bulunan erlenlere eklenmiştir. Kültürlere dört ağır metal farklı pH (5, 7, 9) derecelerinde yukarıda belirtilen dozlarda ilave edilip araştırma yapılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kültürlerden 12, 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler alınmıştır. Kültür üretimi 180 rpm 37 °C’de çalkalamalı inkübasyonda sürdürülmüştür.

Metal dirençlilik çalışmalarımızda, ticari olarak temin edilen Nutrient broth’un steril olan sıvı besiyeri 30 ml olacak şekilde steril erlenlere dökülmüştür. Ticari olarak temin edilen Plate Count Agar (PCA)’ın 22,5 g’ı 1000 ml distile suda çözümlenerek otoklavlandıktan sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. Kültürlere, kadmiyum sülfat ve kurşun (II) klorür metalleri yukarıda belirtilen dozlarda ilave edilip araştırma yapılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kültür üretimi 180 rpm 37 °C’de çalkalamalı inkübasyonda sürdürülmüştür.

### **3.5. *P. aeruginosa*’nın Üreme Eğrisinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada üreme potansiyeli bilinmeyen *P. aeruginosa* bakterisinin üreme eğrisini saptamak amacıyla LB besiyerinin 20 g’ı 1000 ml distile suda çözümlenerek hazırlandı, otoklavlandı ve steril koşullar altında bakterilerin ekimi yapılarak stok kültürler oluşturuldu. Bu stok kültürlerden taze hazırlanan besi yerlerine 20/100 ml olacak şekilde üç tekrarlı olmak koşuluyla ekimler yapıldı ve 0. saatten itibaren başlayarak 2., 4., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde örnekler alınarak spektrofotometrede 600 nm’de absorbanslar okundu. Bu absorbans değerlerine bağlı olarak bakteri için elde edilen sonuçlara göre üreme eğrisi saptandı. Aynı işlemler belirlenen dozlarda metal varlığında üreme potansiyelinin tespiti için de tekrarlandı.

### 3.6. Pigment Analizi Tayini

*P. aeruginosa* bakterisinin pigmentlerini tespit etmek amacıyla piyoverdin için King B, piyosiyenin ve piyorubin için *Pseudomonas* Broth P sıvı besi ortamları 20/100 ml erlenlere hazırlandı.  $MnCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CdSO_4$  ve  $PbCl_2$  metalleri ana stoktan yukarıda belirtildiği şekilde ilave edilip pH dereceleri 5, 7 ve 9 ayarlanarak otoklavlandı. Gece kültüründen her erlene 100 µl kültür ilave edilip 12, 24, 48 ve 72 saatlerde aşağıda belirtilen şekilde pigment analizleri yapılmıştır. Yapılan her deney üç tekrarlı olacak şekilde ölçüldü.

#### 3.6.1. Piyosiyenin analizi

Pigment analizinde piyosiyenin miktarının ölçümü ağır metal uygulanmadan önce ve sonrası için ayrı ayrı bakılmıştır. Piyosiyenin miktarının tayini Essar (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile asidik solüsyonda  $OD_{520}$  nm'de piyosiyenin absorbansına dayanmaktadır. Piyosiyenin üretiminin maksimum olduğu *Pseudomonas* Broth P ortamında üretilen 5 ml kültür örneği santrifüj edilmiş süpernatanın üzerine 3 ml kloroform eklenerek ve daha sonra 1 ml 0.2 N HCl ilave edilmiştir. Oluşan mavi-yeşil rengin izlenmesi 520 nm de ölçülmüştür.  $OD_{520}$ 'de 17.072 ile çarpım sonucunda ml'deki konsantrasyonu hesaplanarak ve µg/ml olarak değerlendirilmiştir (Essar vd., 1990; Waad, 2010; Özcan, 2011).

#### 3.6.2. Piyoverdin analizi

Pigment analizinde piyoverdin miktarının ölçümü ağır metal uygulanmadan önce ve sonrası için ayrı ayrı bakılmıştır. Piyoverdin miktarının tayini Meyer ve Abdallah (1978) yöntemine göre yapılmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile nötr solüsyonda 400 nm'de piyoverdin absorbansına dayanmaktadır. Piyoverdin üretiminin maksimum olduğu King B ortamında üretilen 5 ml kültür örneği (10,000 rpm ve 30 dakika ) santrifüj edildikten sonra süpernatın 400absorbans değerinde ölçülmüştür (Meyer ve Abdallah, 1978; Ines vd., 1985).

### 3.6.3. Piyorubin analizi

Pigment analizinde piyorubin miktarının ölçümü ağır metal uygulanmadan önce ve sonrası için ayrı ayrı bakılmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile bazik solüsyonda OD<sub>520</sub> nm'de piyorubin absorbansına dayanmaktadır. Piyorubin üretiminin maksimum olduğu *Pseudomonas* Broth P ortamında üretilen 5 ml kültür örneği santrifüj edilmiş süpernatanın üzerine 1 ml 0.4 M NaOH tamponu ilave edilerek yapılmıştır. Oluşan parlak kırmızı rengin izlenmesi 520 nm de ölçülmüştür (Samanta vd., 2008).

### 3.6.4. Piyomelanin analizi

Piyomelanin pigmentini sadece *P. aeruginosa* bakterisi sentezlemektedir. Bu pigment çok nadir görülmektedir. Bu nedenle bu pigmentin gözlemlenmesi zenginleştirilmiş kanlı agar besi ortamında gerçekleşmektedir. Piyomelanin pigment analizi için, kanlı agar besi ortamına steril koşullarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra petriler bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kahverengimsi siyah renkte pigmentler gözlenmiştir.

### 3.7. Toplam Protein Miktarı Tayini

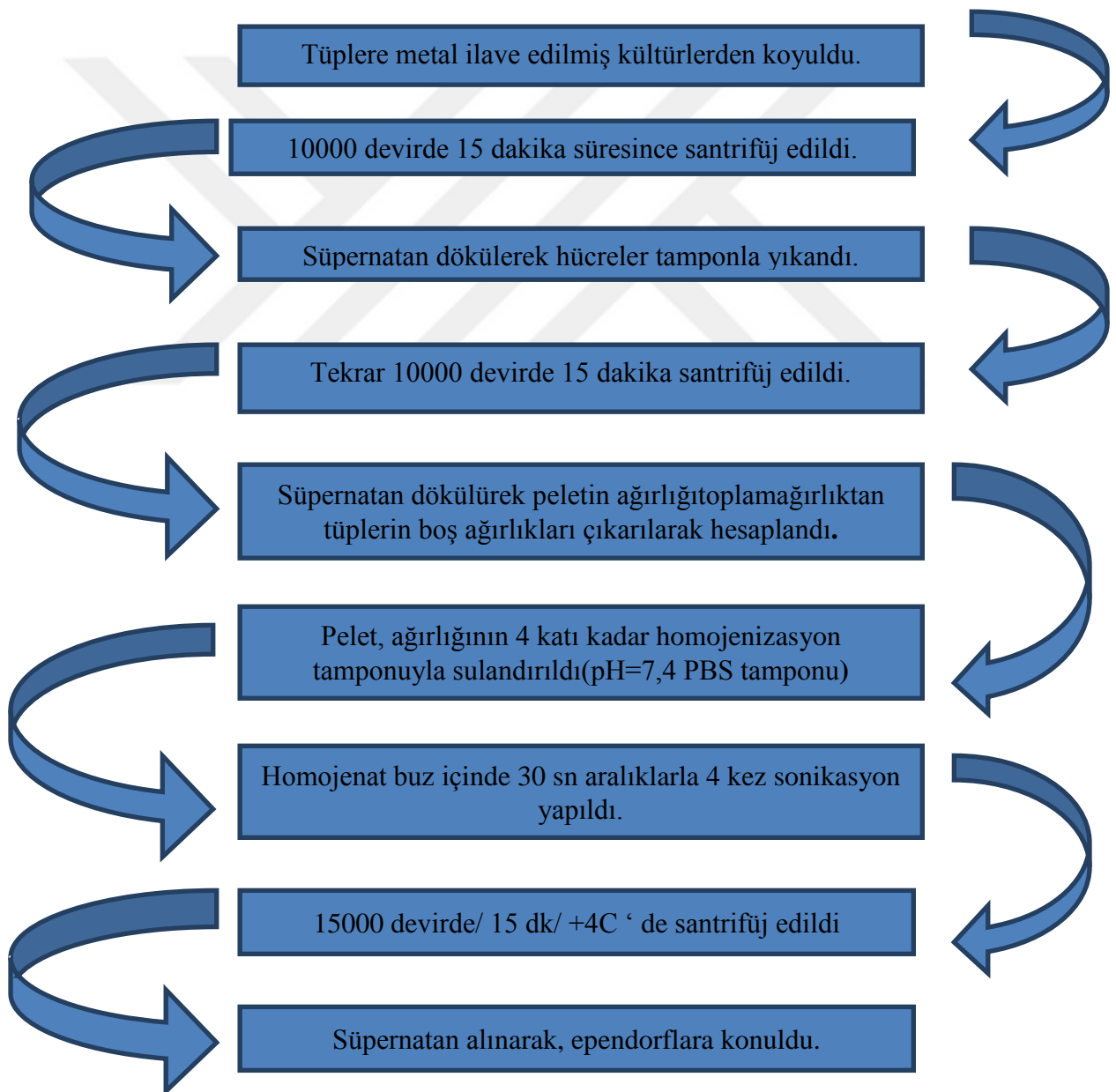
Bakteri homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre, mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/4 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikropilaka kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µL Bradford çözeltisi (Sigma B6916, USA) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Örneklerdeki toplam protein değerleri bir bilgisayar paket programı (Slide) kullanılarak, elde edilen değerler ile BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri karşılaştırılarak hesaplandı. Daha sonra sulandırma faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplandı. Elde edilen toplam protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan S16 fraksiyonları enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı (Bradford, 1976).



### 3.8. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivite tayin işlemlerinde yukarıda anlatıldığı şekilde Luria broth besiyerinin 20 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek hazırlandı, otoklavlandı ve steril koşullar altında bakterilerin ekimi yapılarak stok kültürler oluşturuldu. Bütün enzimlerin aktivitesi için nötr solüsyonda çalışıldı. Dört metal tek doz 1000 µl olacak şekilde stoktan ilave edildi. Altı tekrarlı olarak hazırlanan besi ortamları 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra ölçümler yapıldı.

Süresi biten örneklere Şekil 3.1'de görüldüğü gibi aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Enzim aktivite tayininde işlem sırası

### 3.8.1. Katalaz aktivitesinin ölçümü

Çalışma kapsamında katalaz enziminin aktivitesi H. (1984) yöntemine göre yapıldı. Öncelikle, katalaz ölçümünde kullanılmak üzere PBS (pH:7.0) tamponunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan substrat çözeltisinin 240 nm dalga boyunda ilk absorbansı belirlendi. Daha sonra, örneklerin katalaz miktarını belirlemek için substrat çözeltisinden 900 ml alınıp küvete kondu ve üzerine 20 µl örnek eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 1 dakika süreyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ( $\epsilon = 0,0396 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) absorbans değişimi okundu. Katalaz aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi (Aebi, 1984).

### 3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü

SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich I (1969) yöntemine göre yapılmış olup yöntem ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-c'yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır. SOD enzim aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerinin sitokrom c okside etmesi sonucu oluşan renk değişiminin inhibisyonu 550 nm'de takip edilerek belirlendi. Absorbanstaki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve U/mg protein olarak verildi. % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi (McCord ve Fridovich, 1969).

$$\% \text{ inhibisyon} = ((\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kör}}) \times 100$$

### 3.8.3. Toplam glutatyon (GSH) miktarı

Toplam glutatyon (tGSH), 412 nm'de 5.50-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu kolorimetrik analiz, glutatyon (GSH) ve DTNB arasındaki reaksiyona dayanmaktadır, burada TNB (5-tio-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Bilinen miktarlarda GSH ile standart bir eğri hazırlandı. Değerler nmol / mg proteininde ifade edildi (Theodorus vd., 1981).

### **3.9. Metal Dirençlilik Tayini**

#### **3.9.1. Metallerin sulu çözeltilerinin hazırlanması**

Kurşun (II) klorür ( $PbCl_2$ ) ve Kadmiyum sülfat ( $CdSO_4$ ) metallerinin tuzlarından her ikisi için de 5000 ppm derişimlerinde ana stoklar hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanması sırasında tuz formlarının kimyasal formülleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmış, gerekli miktarlar hassas terazide tartılarak saf su içerisinde çözülmüştür. Çalışma süresince farklı derişimlerde kullanılan ara stoklar (50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm) bu ana stok çözeltilerden steril koşullarda stoktan eklenmiştir.

#### **3.9.2. *P. aeruginosa* 'nın belirlenen metal derişimlerindeki direnç tespiti**

Kurşun metaline olan dirençlerini belirlemek için *P. aeruginosa* suşu 50-100-500-1000-2000 ppm kurşun içeren besiyerlerinde 37 °C'de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. Suşun kadmiyum metaline olan dirençlerini tespit etmek için ise 50-100-500-1000-2000 ppm kadmiyum içeren besiyeri ortamlarında 37 °C'de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 2., 4., 8., 12., 24., ve 48. saatlerinde suşa ait besiyerinden numuneler alınarak 600 nm'de mikroplate okuyucu ile (Thermo Flash 2000) örneklerin biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Aynı zamanda PCA kullanılarak iki tekrarlı olacak şekilde canlı hücre sayımı yapılmış ve biyokütle yoğunlukları desteklenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri hesaplanmıştır.

#### **3.9.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) tayin metodu**

MIC; bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon olarak tanımlanır. MIC tayin metodu ile *P. aeruginosa* suşu 50-100-500-1000-2000 ppm kurşun içeren besiyerlerinde 37 °C'de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. Suşun kadmiyum metaline olan dirençlerini tespit etmek için ise 50-100-500-1000-2000 ppm kadmiyum içeren besiyeri ortamlarında 37 °C'de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 2., 4., 8., 12., 24., ve 48. saatlerinde suşa ait besiyerinden numuneler alınarak 600 nm'de mikroplate okuyucu ile (Thermo Flash 2000) örneklerin biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarının excel tablosu yapılarak grafiği çıkarılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak

mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon tespit edilmiştir. Biyobirikim deneyleri için bu sonuçlardan yararlanılmıştır.

#### **3.9.4. Biyobirikim deneyleri**

*P. aeruginosa* suşu 50-100-500-1000-2000 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyeri ortamında; CdSO<sub>4</sub> metali için ise 50-100-500-1000-2000 ppm içeren besiyeri ortamında 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

10., 30. dakikalarda ve sırası ile 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerde besiyeri ortamından numuneler alınarak metal birikiminin yeri ve miktarı aşağıda açıklandığı şekilde belirlenmiştir.

#### **3.9.5. Besiyerinde kalan metal miktarı**

Besiyeri ortamında kalan metal miktarının tespiti için yukarıda belirtilen saat dilimlerinde, PbCl<sub>2</sub> ve CdSO<sub>4</sub> için ayrı hazırlanan inkübasyondaki kültür ortamlarından örnekler alınmıştır. Vortekslenerek homojenizasyonu sağlanan örneklerden steril pipet yardımıyla 1 ml alınmış; steril bir tüpe aktarılarak 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı biyokütleden arındırılmak amacı ile 0.45 mikrometre por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Pb ve Cd miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS (PerkinElmer NexION 350) cihazında tespit edilmiştir.

#### **3.9.6. Hücre yüzeyinde emilim-tutunma**

Hücre dışı birikimi belirlemek için; santrifüj işlemi sonrasında çökelen hücrelerin üzerine 1 ml 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi eklenerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; hücre yüzeyine tutunan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Numuneler 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı 0.45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Pb ve Cd miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS (PerkinElmer NexION 350) cihazında ölçülmüştür.

#### **3.9.7. Hücre içinde birikim**

Hücre içine alınan metal birikiminin belirlenmesinde bir önceki aşamada santrifüj sonrasında dibe çöken hücrelerin üzerine 1 ml 1M HNO<sub>3</sub> ilave edilerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı 0.45 µm por çapına sahip filtreden süzülerek filtrattaki Pb ve Cd

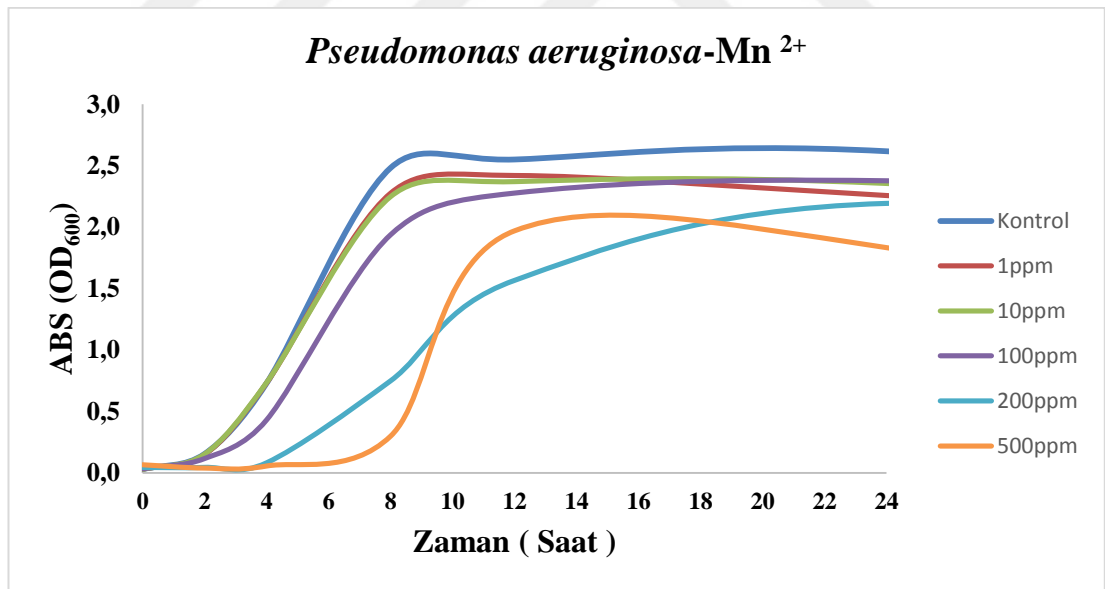
miktarı 1/100 oranında dilüsyon sonrasında ICP-MS (PerkinElmer NexION 350) cihazında ölçülmüştür.



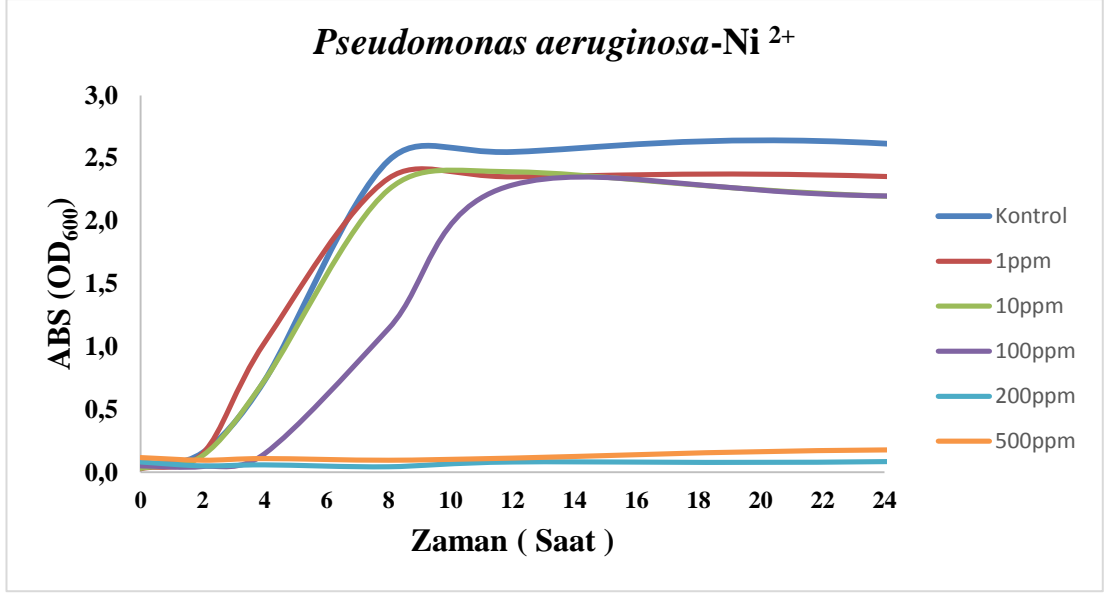
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. *P. aeruginosa*'nın Üreme Eğrisinin Belirlenmesi

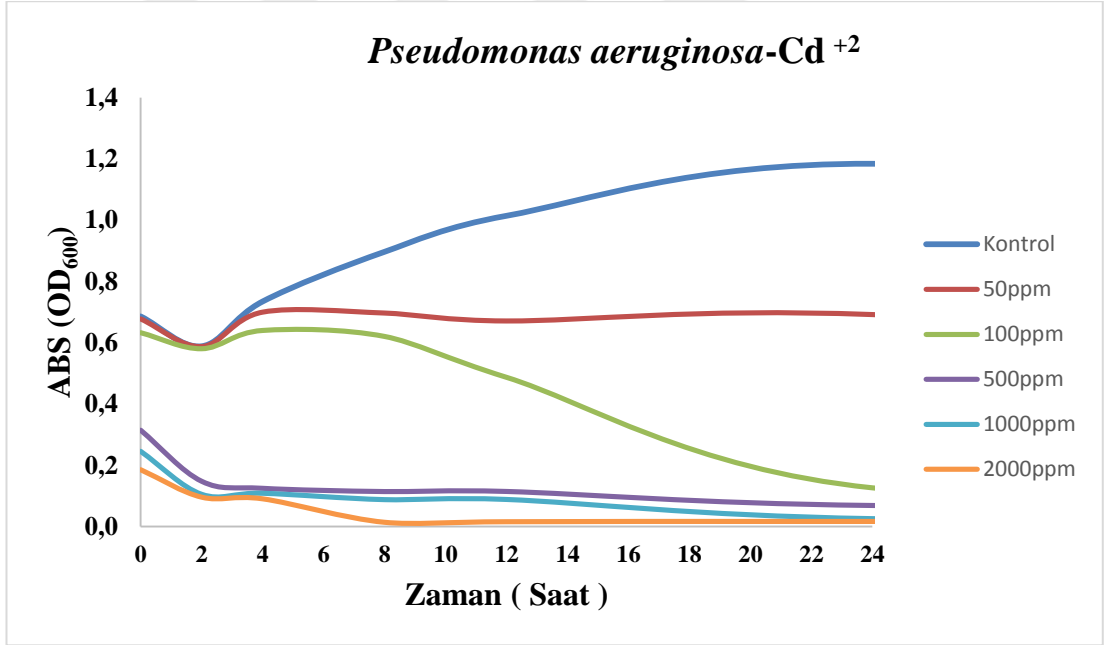
*P. aeruginosa* bakterisine dört metal belirli dozlarda uygulanıp metallerin üreme potansiyellerine etkisi belirlenmiştir.  $Mn^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  metalleri için 1-10-100-200 ve 500 ppm konsantrasyonlarda uygulanıp üreme potansiyelleri  $OD_{600}$ 'de ölçülmüştür.  $Mn^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  diğer metallere oranla esansiyel toksik metal olduğundan düşük dozlarda üreme potansiyellerini çok fazla etkilememiştir.  $Pb^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  metalleri için 50-100-500-1000 ve 2000 ppm konsantrasyonlarda uygulanıp üreme potansiyelleri 0., 2., 4., 8., 12., 24., ve 48. saatlerinde  $OD_{600}$ 'de ölçülmüştür. Cd Pb'ye oranla üreme yoğunluğunu olumsuz etkilemiştir. Tüm metaller için düşük dozlarda kontrol grubuna daha yakın bir üreme yoğunluğu tespit edilirken, yüksek dozlarda bakteri üremesi olumsuz etkilenmiştir. Bakterinin absorbans değerlerine bağlı olarak elde edilen üreme eğrileri Şekil 4.1(a-b-c-d)'de gösterilmiştir.



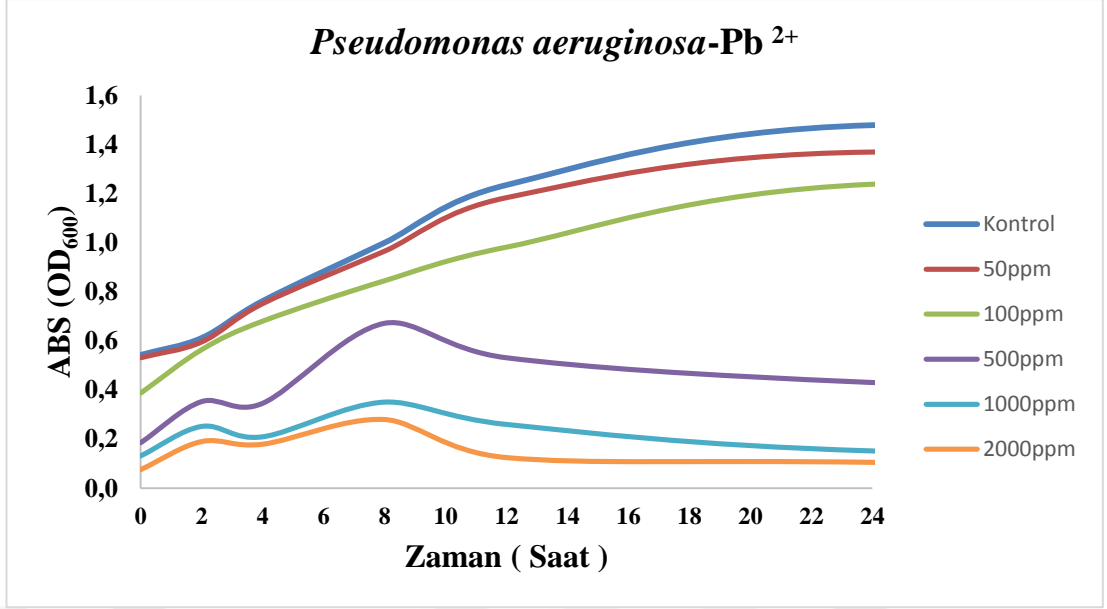
Şekil 4.1. a) *P. aeruginosa*'nın  $MnCl_2$  uygulama sonrası üreme potansiyeli



Şekil 4.1. b) *P. aeruginosa*'nın NiCl<sub>2</sub> uygulama sonrası üreme potansiyeli



Şekil 4.1. c) *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> uygulama sonrası üreme potansiyeli



Şekil 4.1. d) *P. aeruginosa*'nın PbCl<sub>2</sub> uygulama sonrası üreme potansiyeli

#### 4.2. Metal Uygulama Sonrası Pigment Analiz Tayini

*P. aeruginosa* bakterisine dört metalin farklı doz ve pH değerlerinde uygulanması sonucu bakterideki piyosiyanın, piyoverdin, piyorubin ve piyomelanin pigmentleri üzerindeki etkisini saptamak amacıyla 12, 24, 48 ve 72. saatlerdeki miktarları kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Çizelge 4.1'de dört metalin etkisi artış azalış şeklinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Metallerin pigmentler üzerine etkisi

	Piyosiyanın			Piyoverdin			Piyorubin		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9
pH									
MnCl <sub>2</sub>	-	+	+	-	+	+	+	+	+
NiCl <sub>2</sub>	-	-	+	-	+	+	+	+	-
CdSO <sub>4</sub>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PbCl <sub>2</sub>	-	+	+	-	+	+	-	-	+

+ : Artış    - : Azalış



#### 4.2.1. Piyosiyenin analizi

37 °C'de *Pseudomonas* Broth P besiyeri bulunan ortamda, *P. aeruginosa* bakterisinin 12, 24, 48, 72. saatlerdeki piyosiyenin miktarları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.2.1 'de kloroform içerisinde mavi piyosiyenin pigmenti görülmektedir

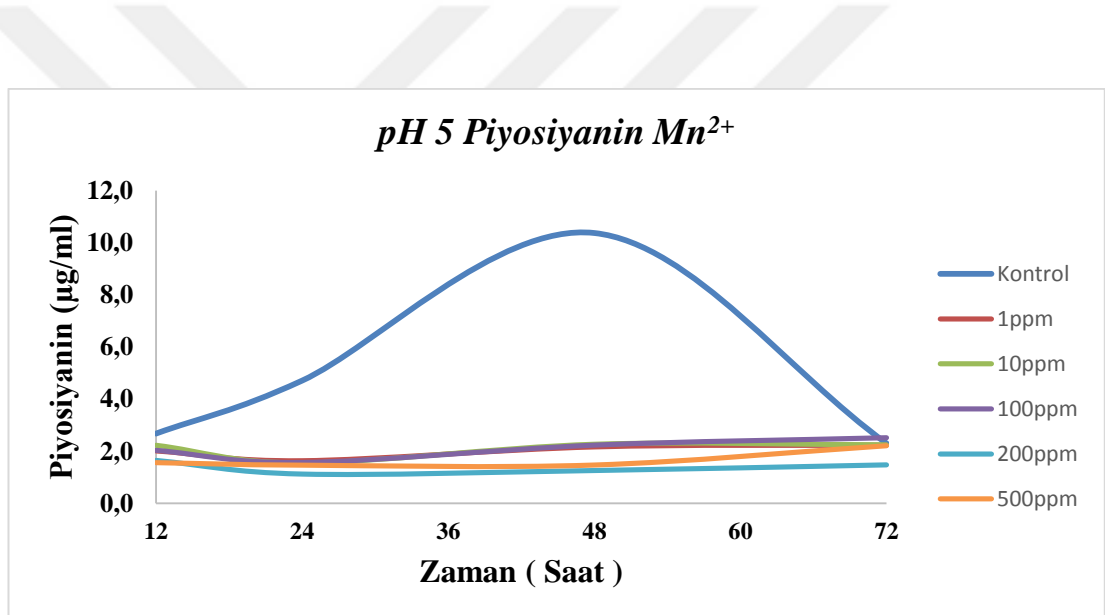


Şekil 4.2. Piyosiyenin pigmenti

#### 4.2.1.1. *P. aeruginosa*'nın $MnCl_2$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi

##### 4.2.1.1.1. pH 5'de $MnCl_2$ içeren ortamda piyosiyanın üretimi

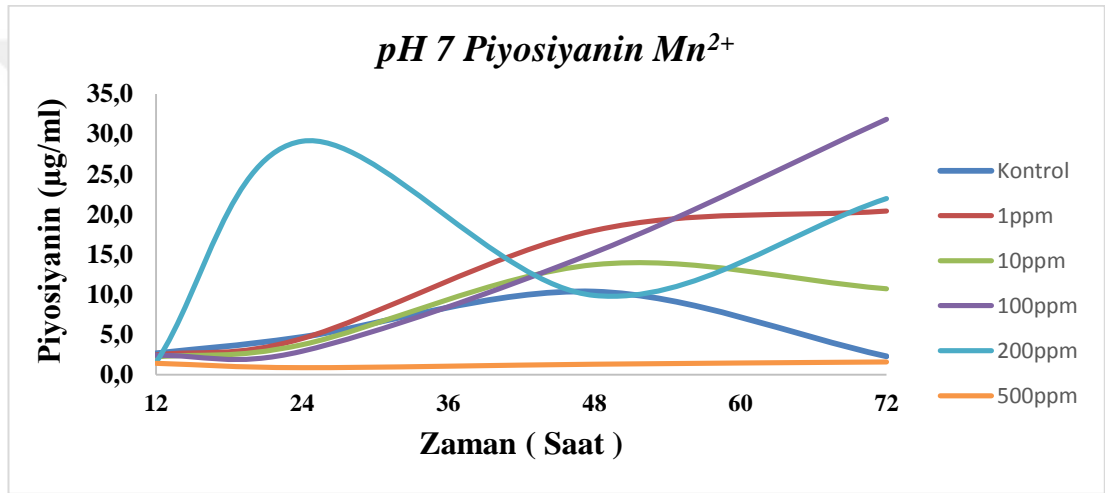
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm  $MnCl_2$  içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 24. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 10.36  $\mu\text{g/ml}$  ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2.51  $\mu\text{g/ml}$  en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin yaklaşık 4 kat azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** *P. aeruginosa*'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm  $MnCl_2$  içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.1.1.2. pH 7’de MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

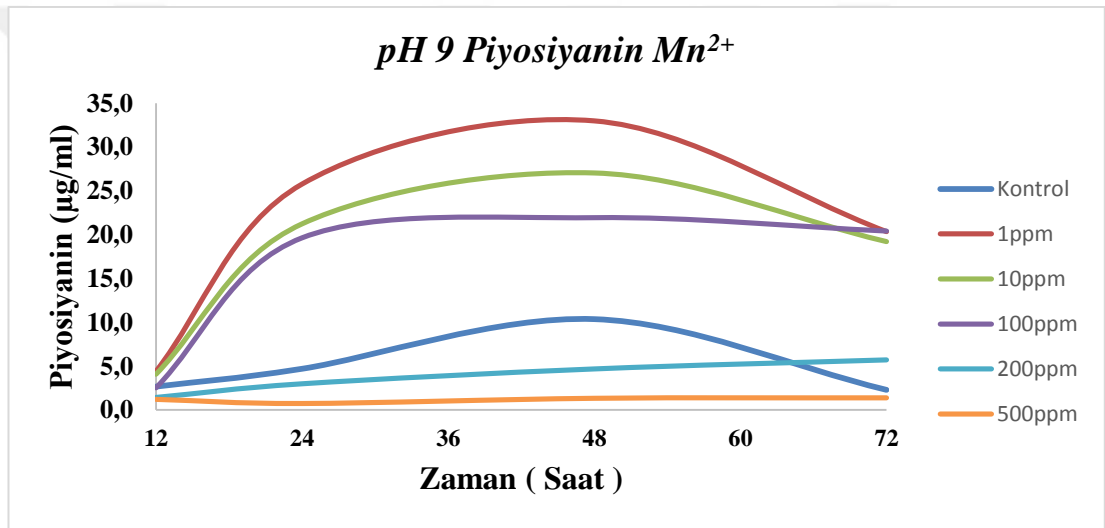
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 10.36 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 5 kat sulandırım yapılarak 31.84 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** *P. aeruginosa*'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.1.1.3. pH 9'da MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 10.36 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 48. saatte 6 kat sulandırım yapılarak 32.9 µg/ml en yüksek piyosiyenin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.5).



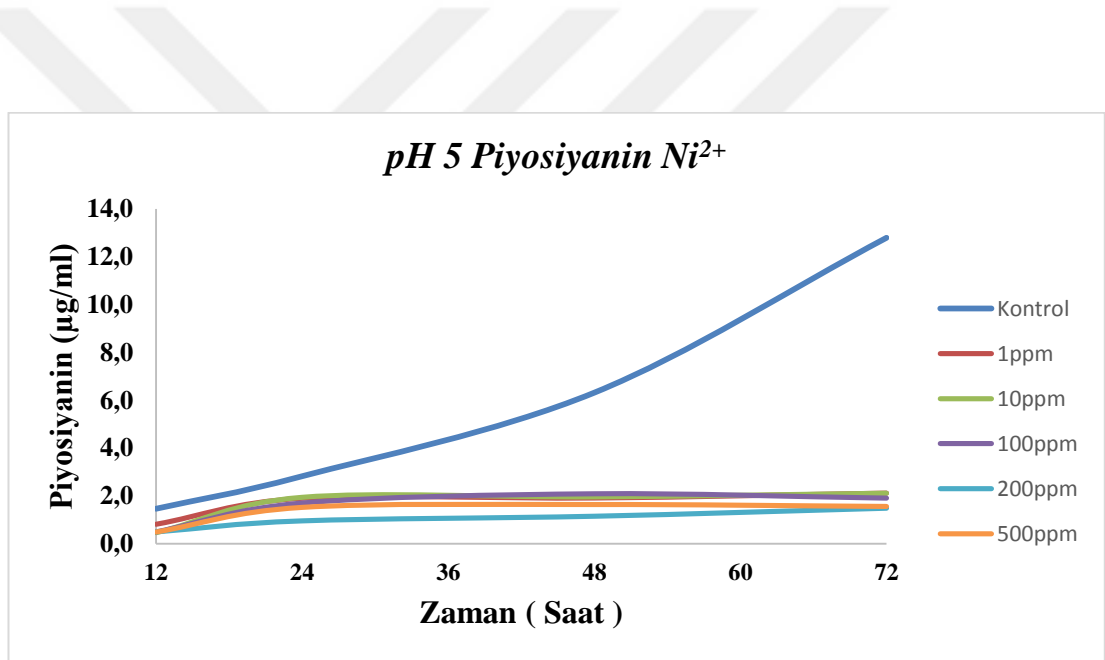
**Şekil 4.5.** *P. aeruginosa*'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyenin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak MnCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyosiyenin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır.

#### 4.2.1.2. *P. aeruginosa*'nın NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

##### 4.2.1.2.1. pH 5'de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

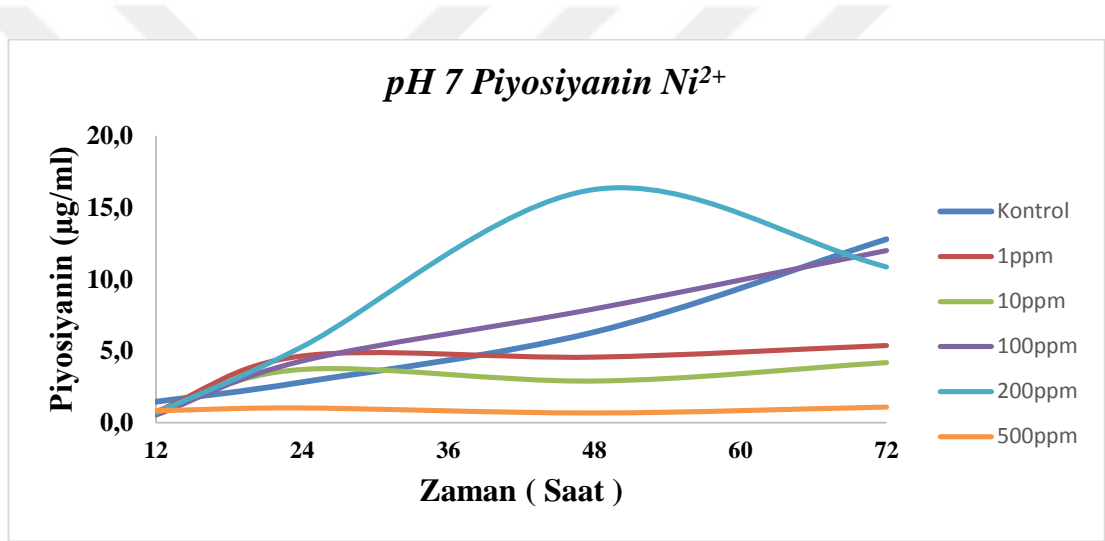
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 4 kat sulandırım yapılarak 12.79 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2.11 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** *P. aeruginosa*'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.1.2.2. pH 7’de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi

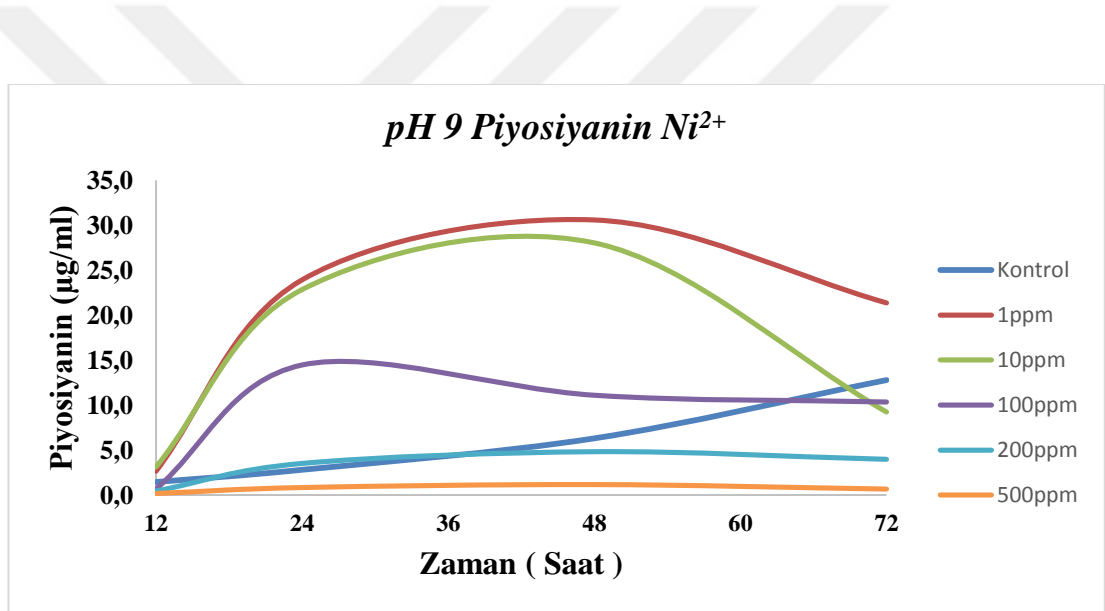
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 4 kat sulandırım yapılarak 12.79 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 200 ppm metal uygulamasında 48. saatte 16.25 µg/ml en yüksek piyosiyenin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** *P. aeruginosa*'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyenin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.1.2.3. pH 9’da NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9’da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 4 kat sulandırım yapılarak 12.79 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 48. saatte 6 kat sulandırım yapılarak 30.59 µg/ml en yüksek piyosiyenin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına neden olmuştur (Şekil 4.8).



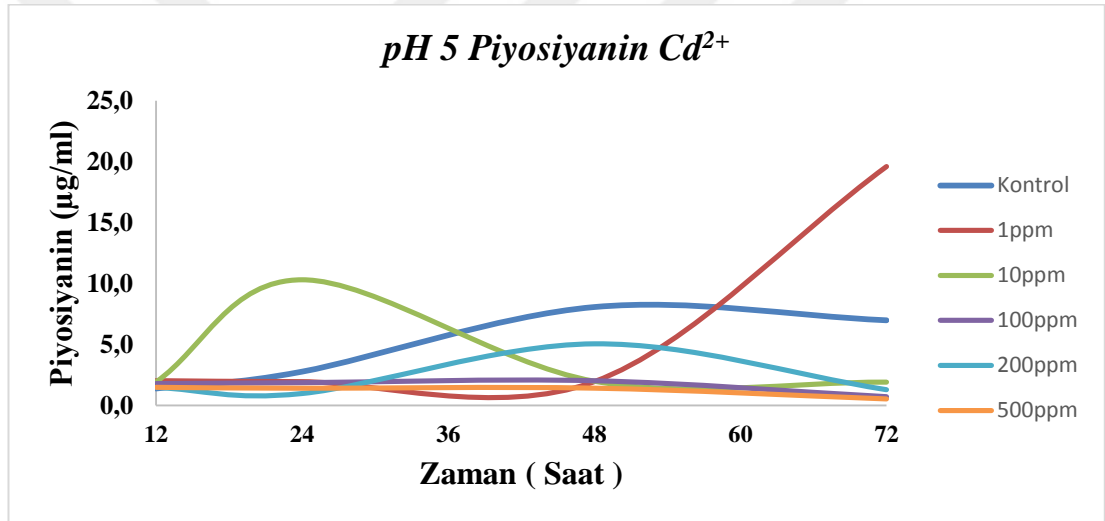
**Şekil 4.8.** *P. aeruginosa*'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyenin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak NiCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın bazik (9) olduğu ve piyosiyenin üretimi için pH 5 ve 7 'nin dezavantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.2.1.3. *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

##### 4.2.1.3.1. pH 5'de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise yine 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 48. saatte 8.07 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 19.59 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına neden olmuştur (Şekil 4.9).

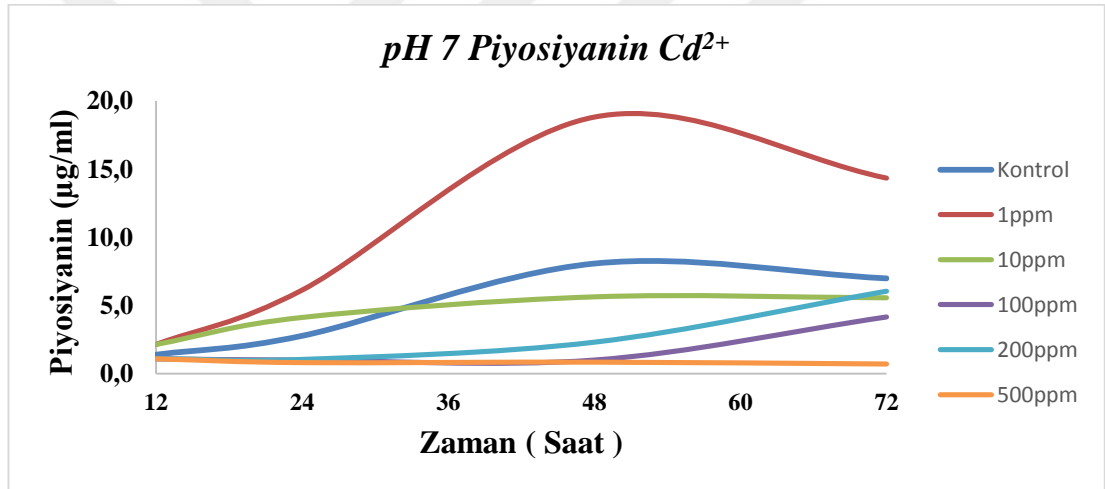


**Şekil 4.9.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.



#### 4.2.1.3.2. pH 7’de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

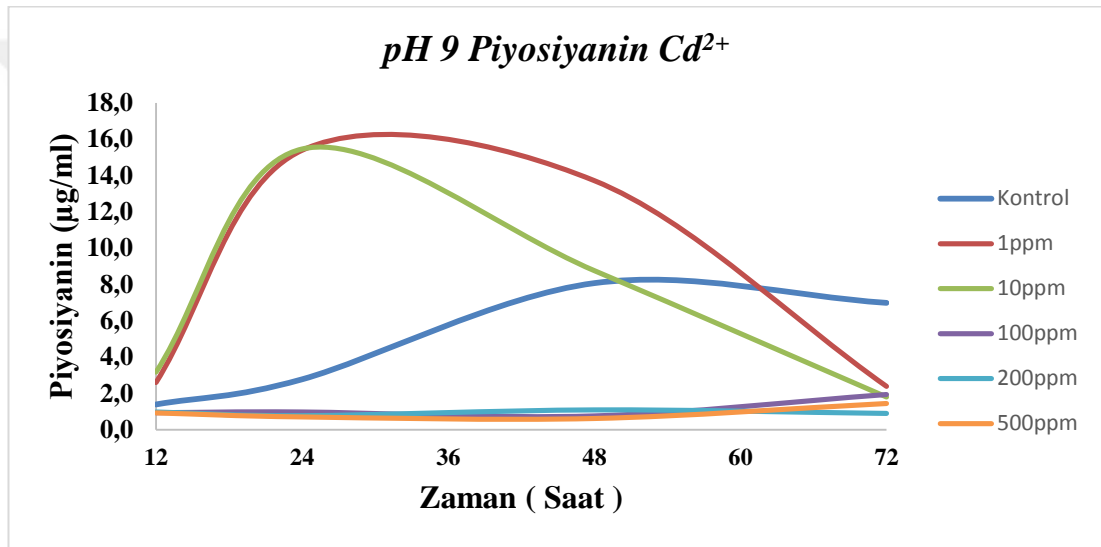
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 48. saatte 8.07 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 48. saatte 2 kat sulandırım yapılarak 18.81 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına neden olmuştur (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** *P. aeruginosa*'nın pH 7' de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.1.3.3. *P. aeruginosa*'nın pH 9'da CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 24. saatlerde en düşük üretimin ise 48. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 48. saatte 8.07 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 24. saatte 15.46 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına neden olmuştur (Şekil 4.11).



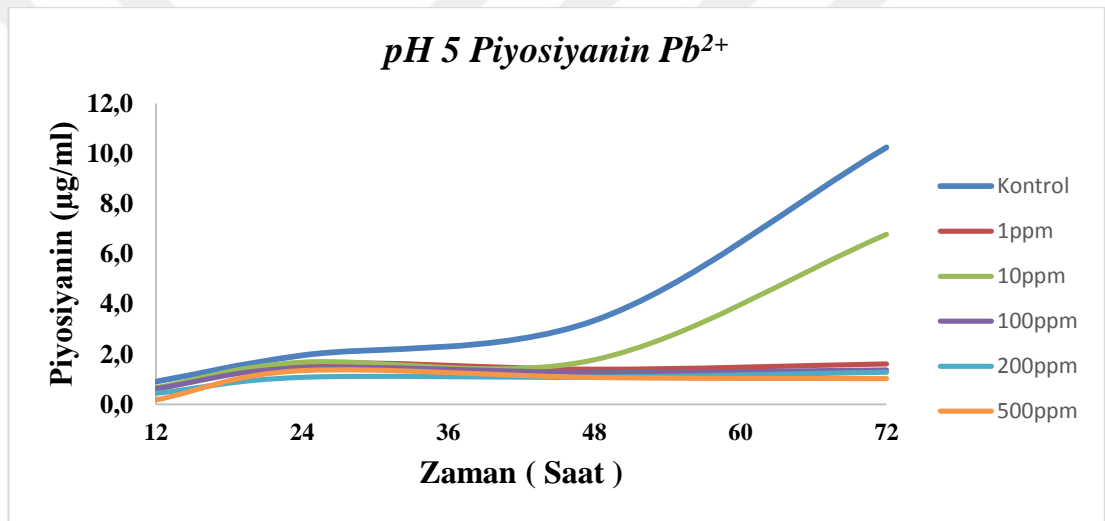
**Şekil 4.11.** *P. aeruginosa*'nın pH 9' da 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak CdSO<sub>4</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; her üç pH (5, 7 ve 9) değerinde de piyosiyanın üretimi için avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.2.1.4. *P. aeruginosa*'nın PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

##### 4.2.1.4.1. pH 5'de PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

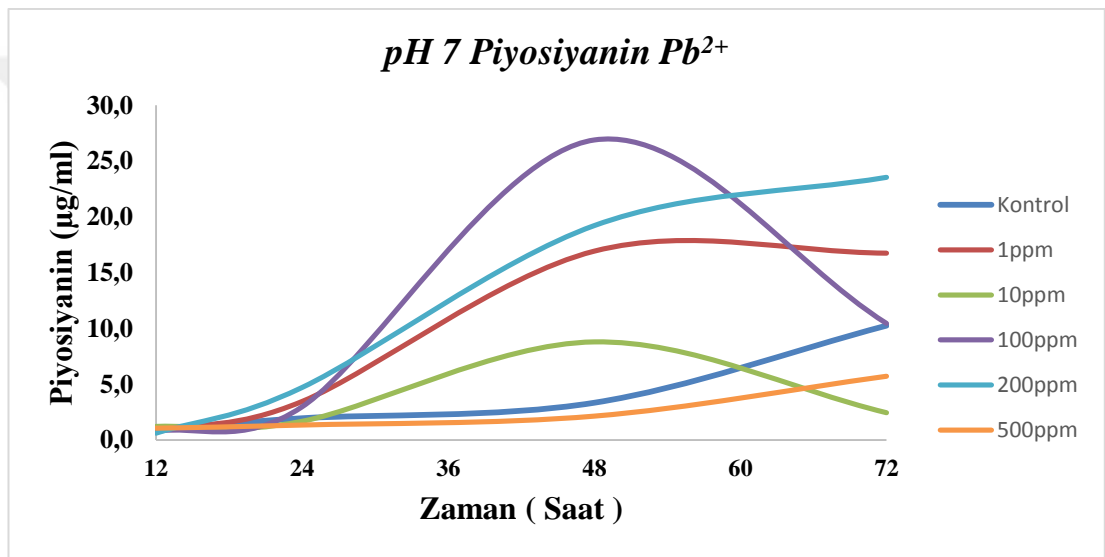
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. Saatte 10.24 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 72. saatte 6.77 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin azalışına sebep olmuştur (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** *P. aeruginosa*'nın pH 5' de 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.1.4.2. pH 7’de PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi

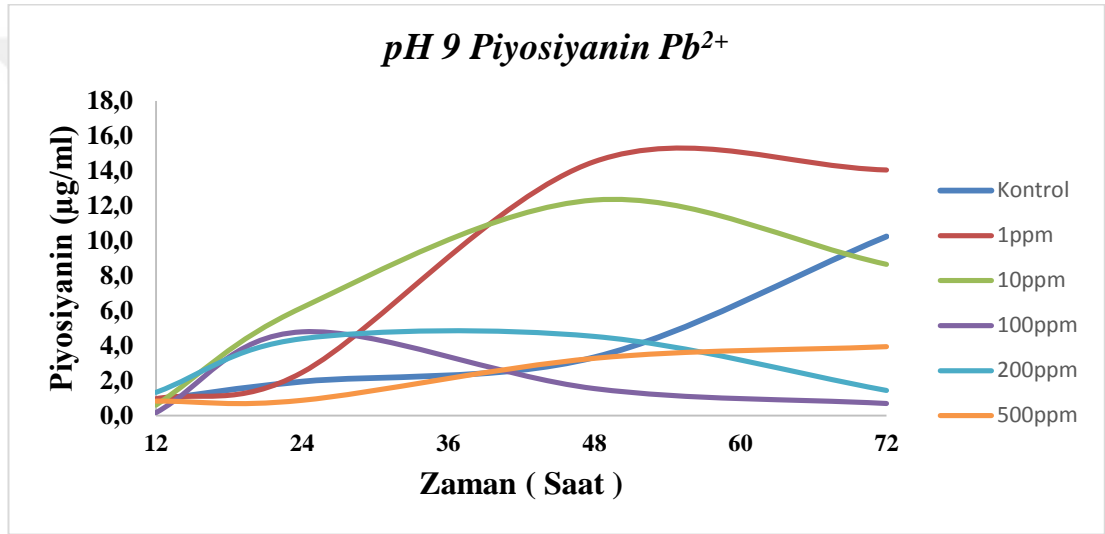
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyanın üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. Saatte 10.24 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 48. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 26.88 µg/ml en yüksek piyosiyanın üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyanın düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.1.4.3. pH 9'da PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 10.24 µg/ml ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 48. saatte 14.52 µg/ml en yüksek piyosiyenin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyosiyenin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak PbCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyosiyenin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı bu azalışın ve artışın olduğu tahmin edilmektedir.

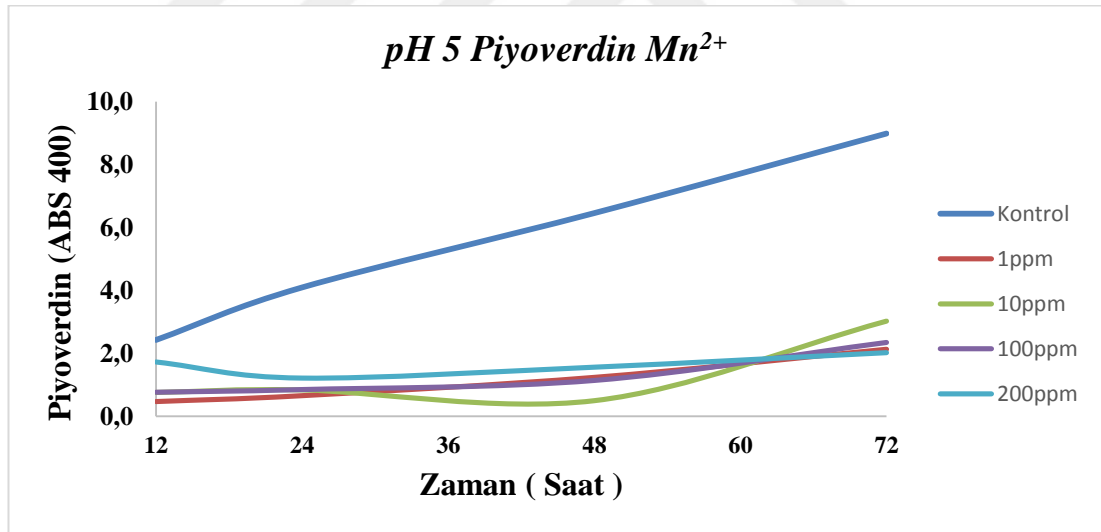
#### 4.2.2. Piyoverdin analizi

37 °C'de King B besiyeri bulunan ortamda, *P. aeruginosa* bakterisinin 12, 24, 48, 72. saatlerdeki piyoverdin miktarları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirme, Absorbans (ABS) 400 nm'de yapılmıştır.

##### 4.2.2.1. *P. aeruginosa*'nın MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

###### 4.2.2.1.1. pH 5'de MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

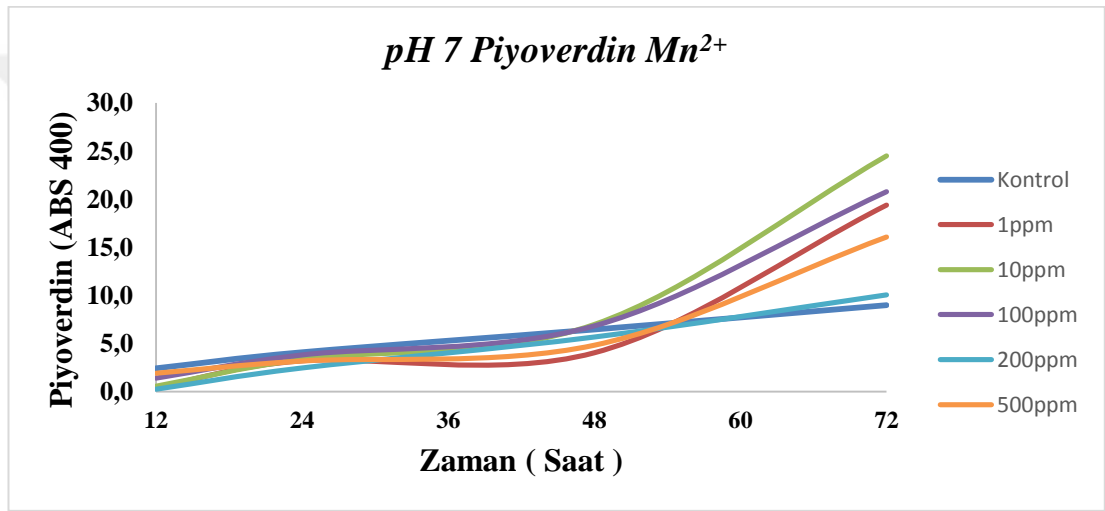
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.526 ABS ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.177 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması pigment üretiminin azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm'de üretilmiştir.

#### 4.2.2.1.2. pH 7'de MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

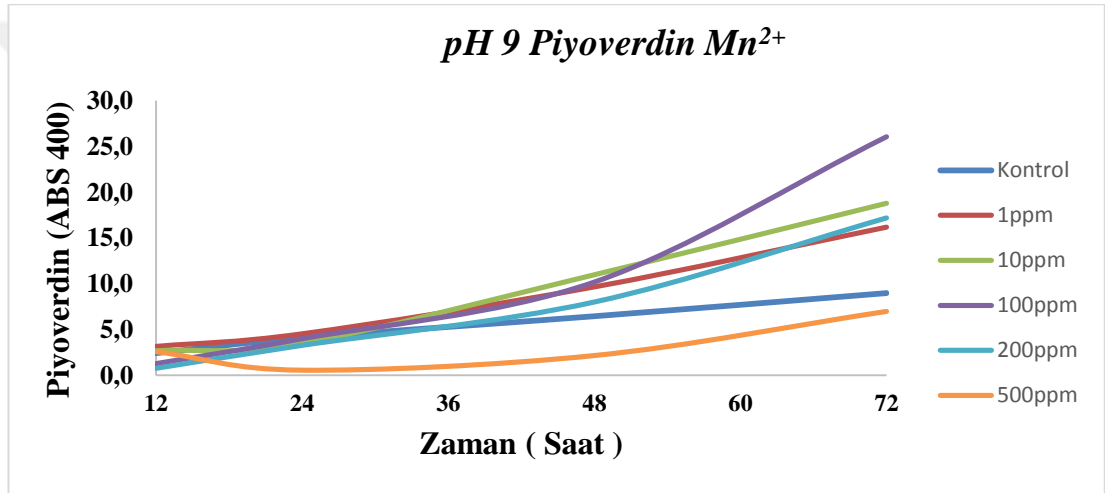
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 7'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.526 ABS ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2 kat sulandırım yapılarak 1.434 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** *P. aeruginosa*'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.2.1.3. pH 9'da MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.526 ABS ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2 kat sulandırım yapılarak 1.526 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

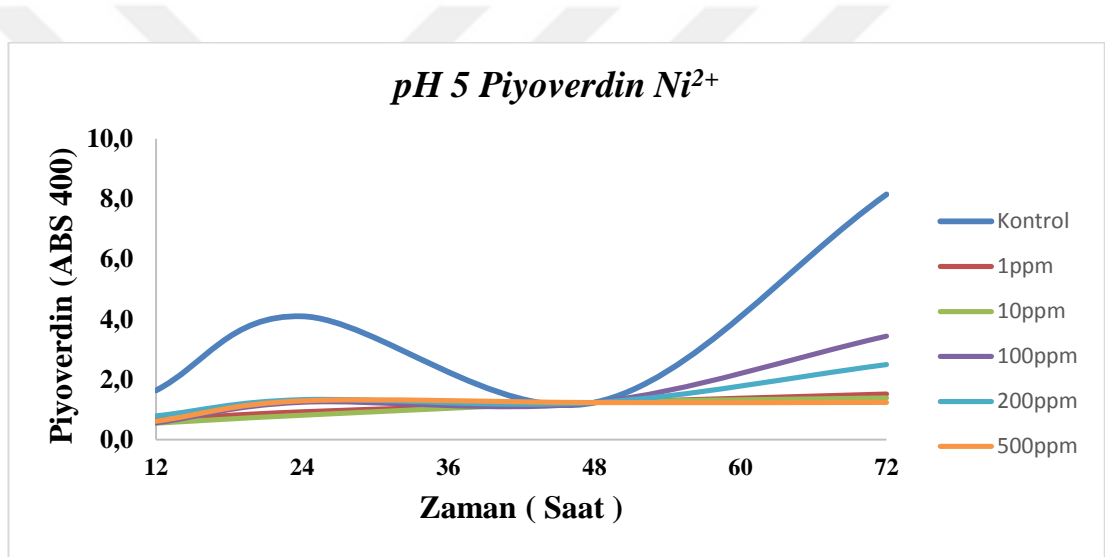
Genel olarak MnCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyoverdin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.



#### 4.2.2.2. *P. aeruginosa*'nın NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

##### 4.2.2.2.1. pH 5'de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

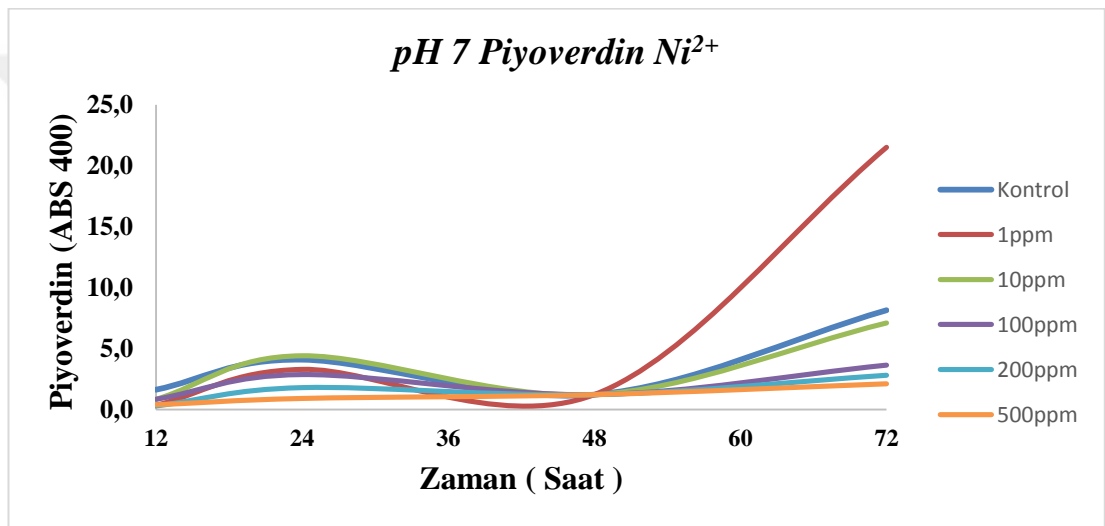
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.477 ABS ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.201 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir azalışın olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.2.2.2. pH 7’de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

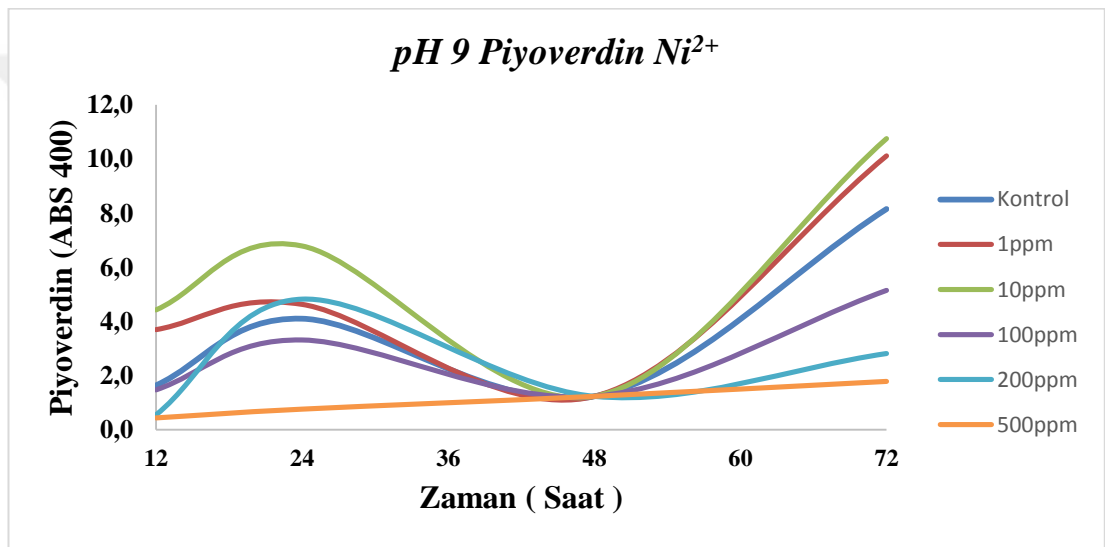
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0,477 ABS ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2 kat sulandırım yapılarak 1,260 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.2.2.3. pH 9'da NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0,477 ABS ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0,629 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artış olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.20).



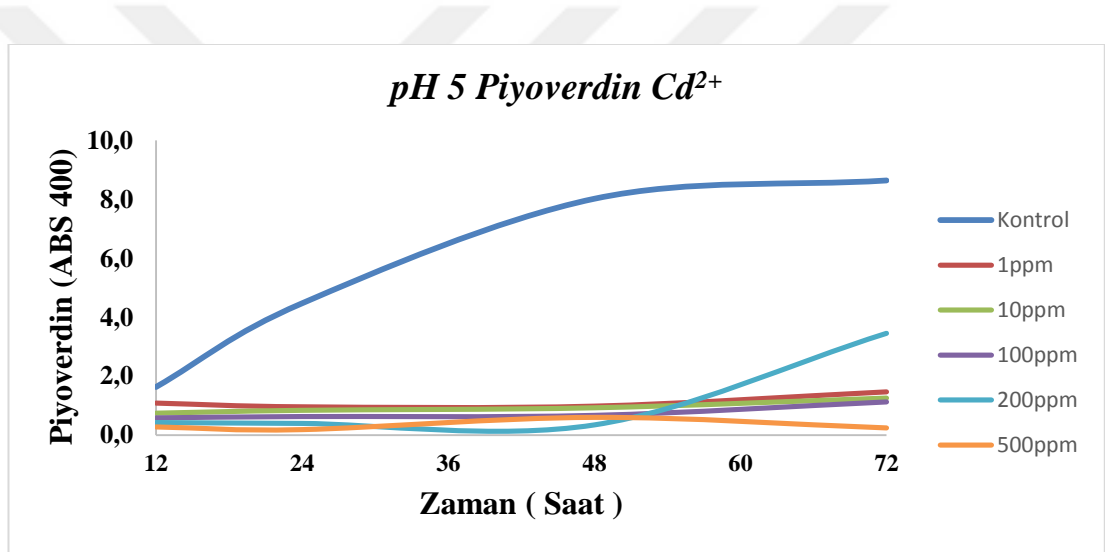
**Şekil 4.20.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak NiCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyoverdin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.2.3. *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

##### 4.2.2.3.1. pH 5'de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

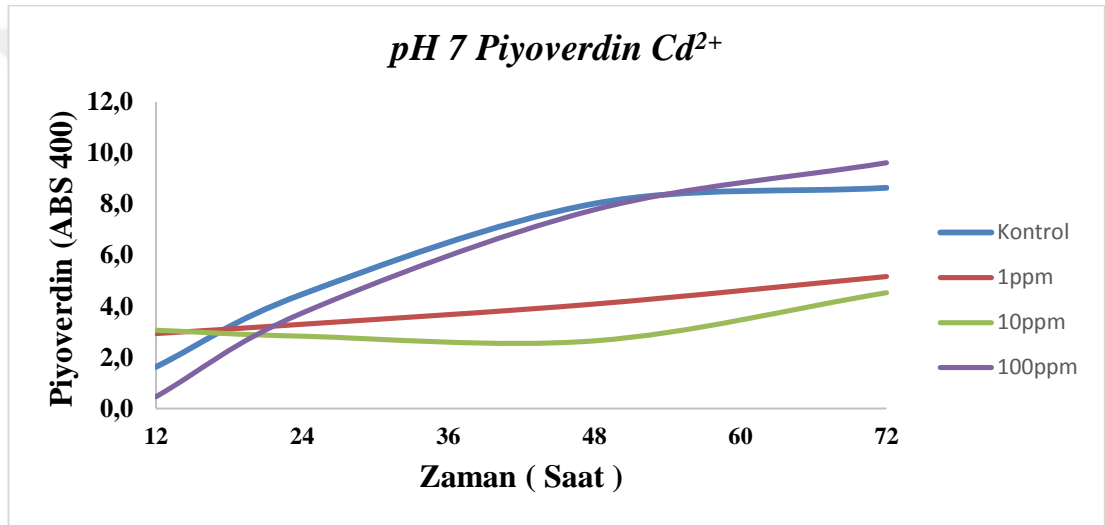
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0,506 ABS ile en yüksek değerini alırken; 200 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0,202 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir azalışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.2.3.2. pH 7’de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

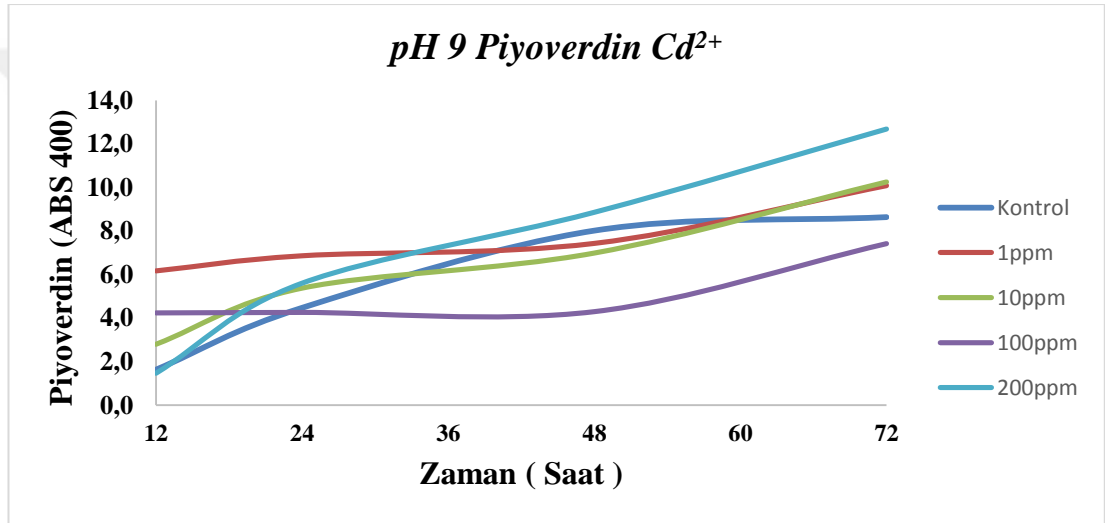
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 48. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.506 ABS ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.563 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. 200-500 ppm konsantrasyonda pigment gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.2.3.3. pH 9'da CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.506 ABS ile en yüksek değerini alırken; 200 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.743 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



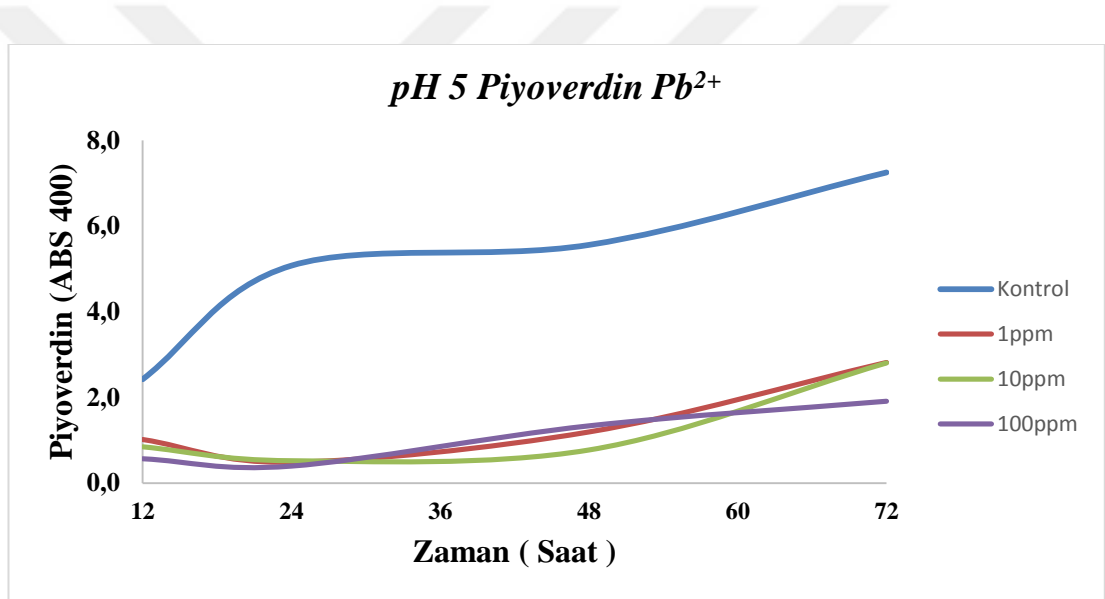
**Şekil 4.23.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. 500 ppm konsantrasyonda pigment gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak CdSO<sub>4</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyoverdin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.2.4. *P. aeruginosa*'nın $PbCl_2$ içeren ortamda piyoverdin üretimi

##### 4.2.2.4.1. pH 5'de $PbCl_2$ içeren ortamda piyoverdin üretimi

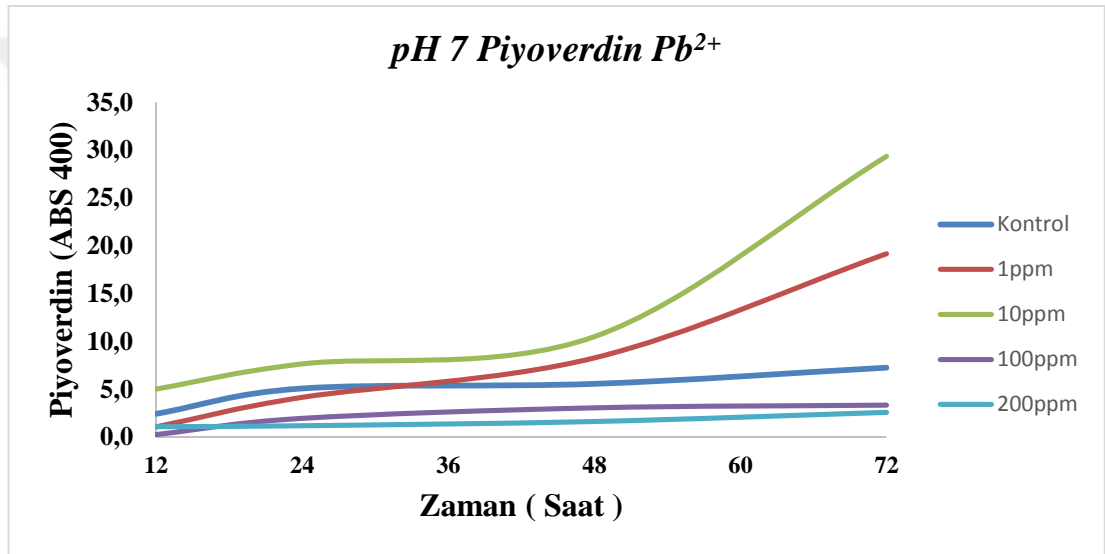
*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm  $PbCl_2$  içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 24. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.424 ABS ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.165 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir azalışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



**Şekil 4.24.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm  $PbCl_2$  içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. 200-500 ppm konsantrasyonda pigment gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.2.4.2. pH 7’de PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.424 ABS ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 2 kat sulandırım yapılarak 72. saatte 1.718 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

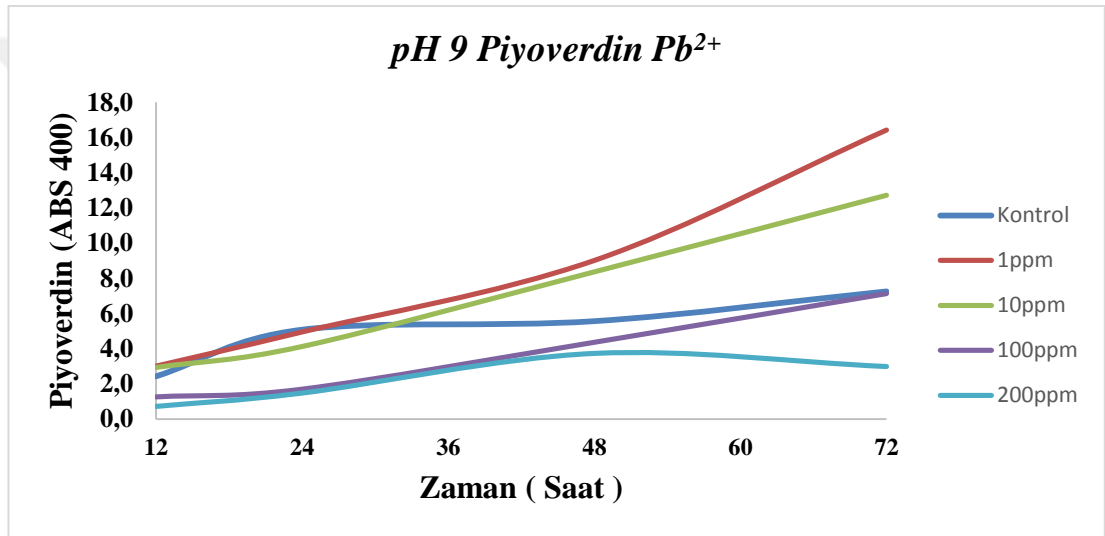


**Şekil 4.25.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. 500 ppm konsantrasyonda pigment gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.



#### 4.2.2.4.3. pH 9'da PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, King B besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyoverdin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.424 ABS ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.961 ABS ile en yüksek piyoverdin üretimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak metal uygulaması sonrası pigment üretiminde bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



**Şekil 4.26.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyoverdin düzeyi. 500 ppm konsantrasyonda pigment gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml King B besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak PbCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın nötr (7) ve bazik (9) olduğu ve piyoverdin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

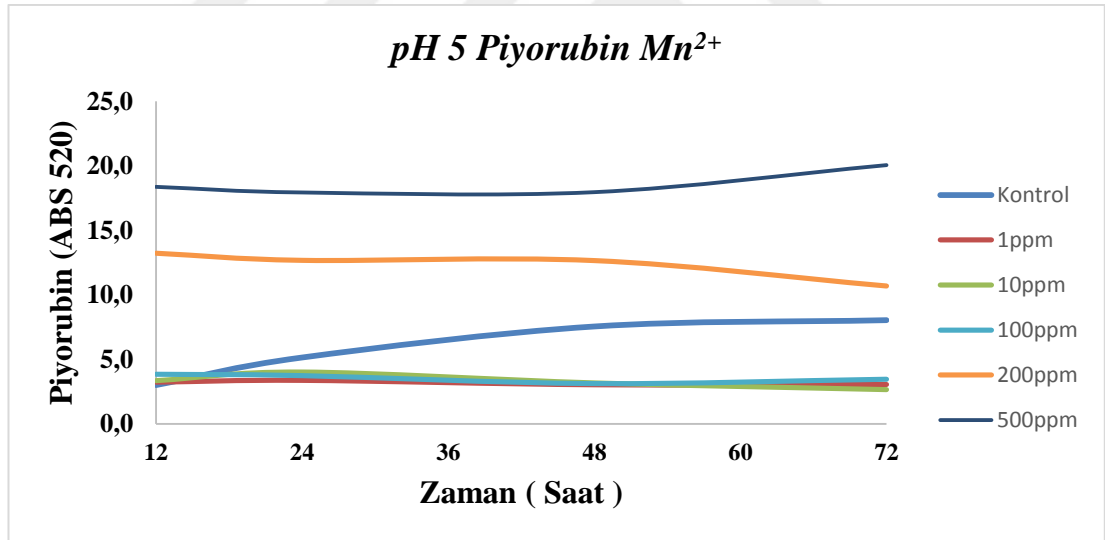
### 4.2.3. Piyorubin analizi

37 °C'de *Pseudomonas* Broth P besiyeri bulunan ortamda, *P. aeruginosa* bakterisinin 12, 24, 48, 72. saatlerdeki piyorubin miktarları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirme, Absorbans (ABS) 520 nm'de yapılmıştır.

#### 4.2.3.1. *P. aeruginosa*'nın MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

##### 4.2.3.1.1. pH 5'de MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

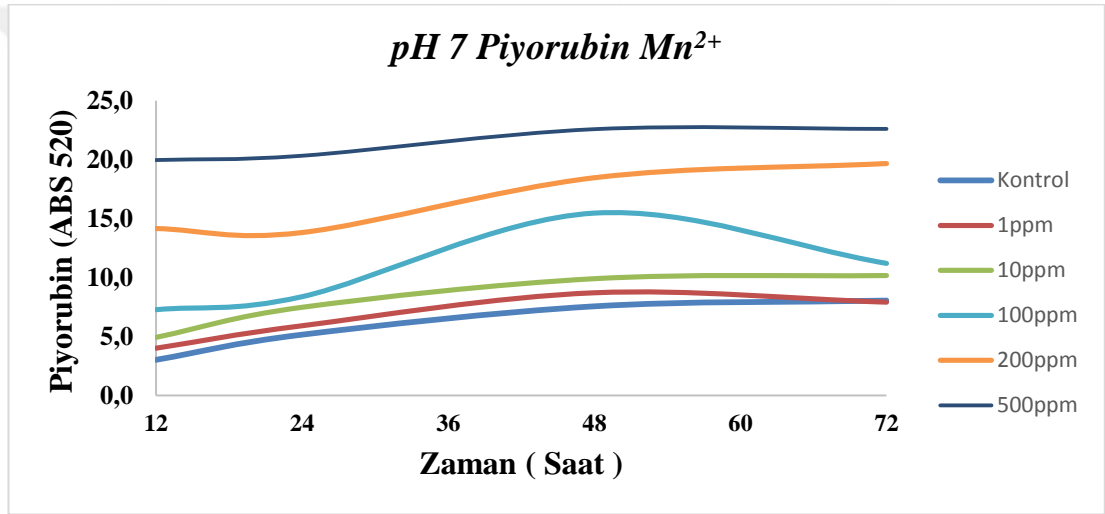
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise yine 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 1.174 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.27).



**Şekil 4.27.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.3.1.2. pH 7’de MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

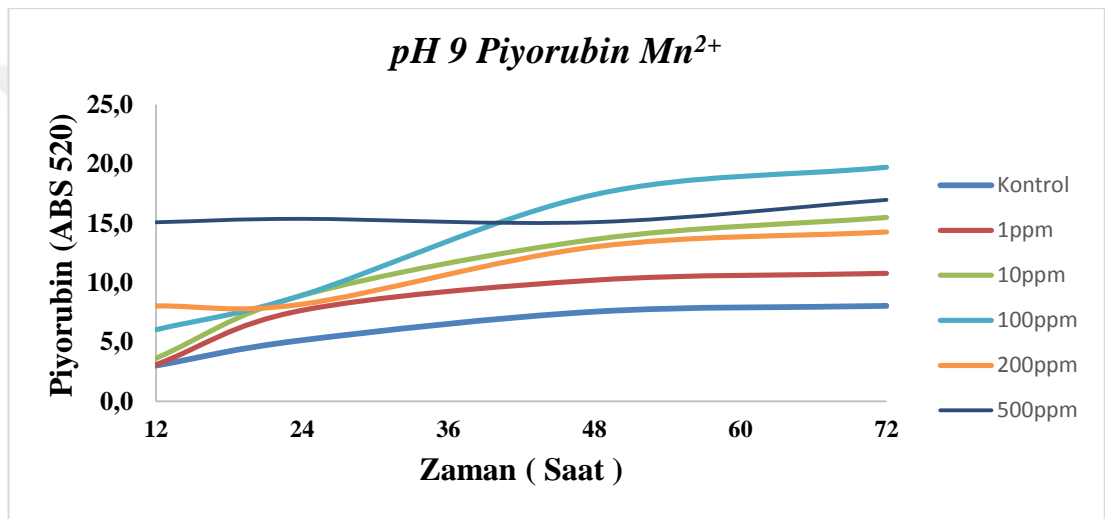
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 1.324 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulaması sonrası pigment üretiminde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.28).



**Şekil 4.28.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.3.1.3. pH 9'da MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 2 kat sulandırım yapılarak 1.155 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulaması pigment üretiminin artışına sebep olmuştur (Şekil 4.29).



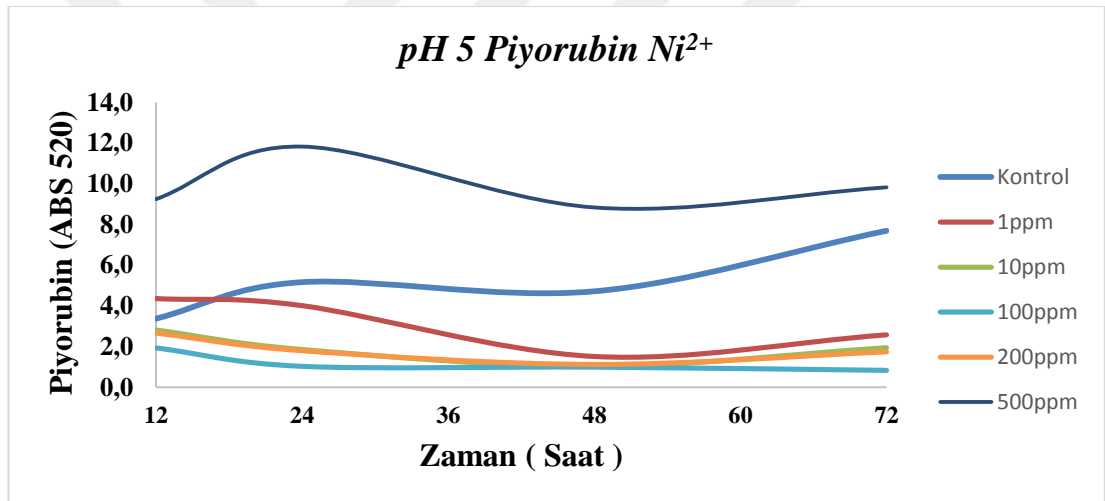
**Şekil 4.29.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak MnCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; her üç pH ortamının piyorubin üretimi için avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.3.2. *P. aeruginosa*'nın NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

##### 4.2.3.2.1. pH 5'de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

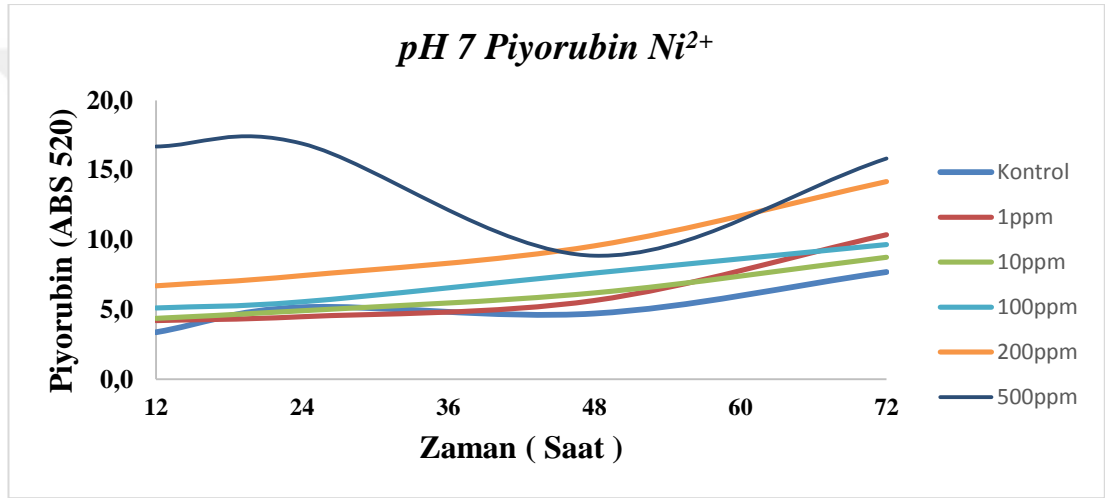
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 24. saatlerde en düşük üretimin ise 48. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.450 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 24. saatte 0.692 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.30).



**Şekil 4.30.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.3.2.2. pH 7’de NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

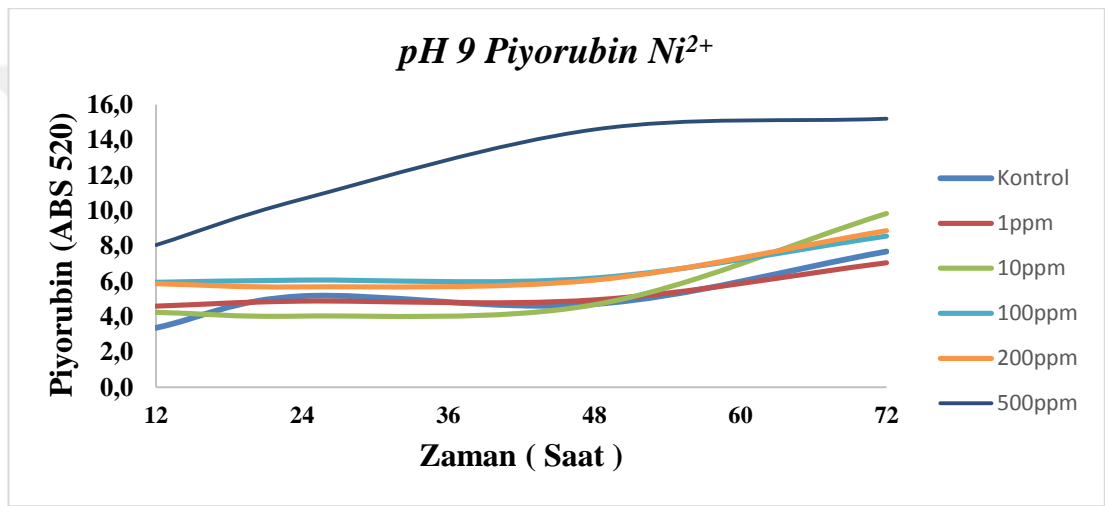
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.450 ABS ile en yüksek değerini alırken; 10 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.512 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.31).



**Şekil 4.31.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.3.2.3. pH 9'da NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.450 ABS ile en yüksek değerini alırken; 1 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.413 ABS en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.32).



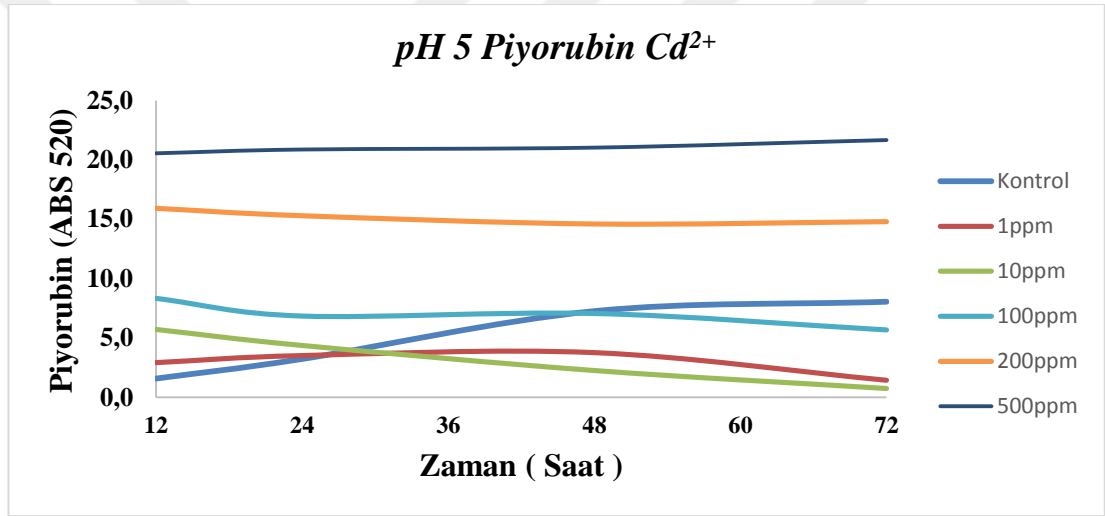
**Şekil 4.32.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak NiCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın asidik (5) ve bazik (7) olduğu ve piyorubin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.3.3. *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

##### 4.2.3.3.1. pH 5'de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise yine 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 1.269 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.33).

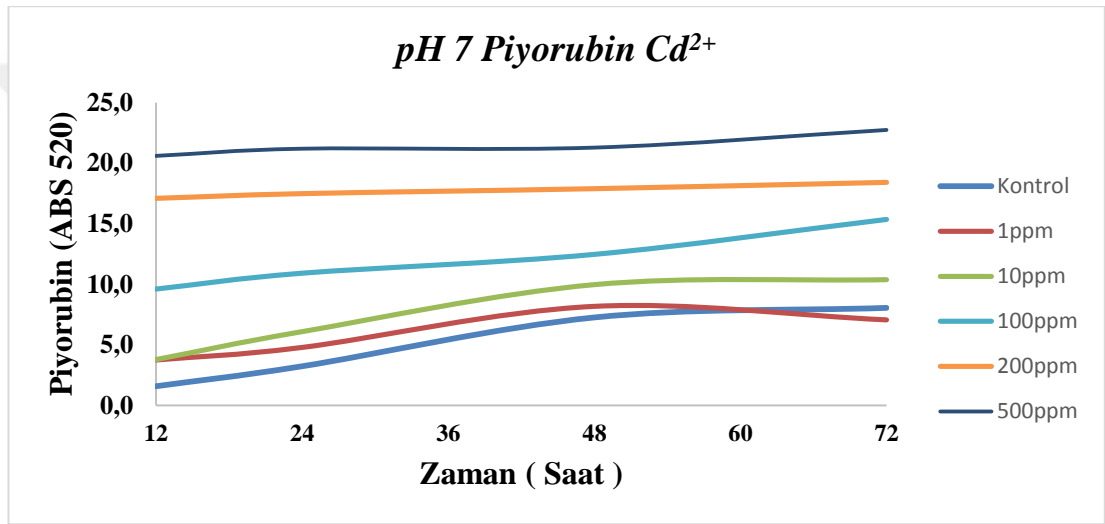


**Şekil 4.33.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.



#### 4.2.3.3.2. pH 7'de CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

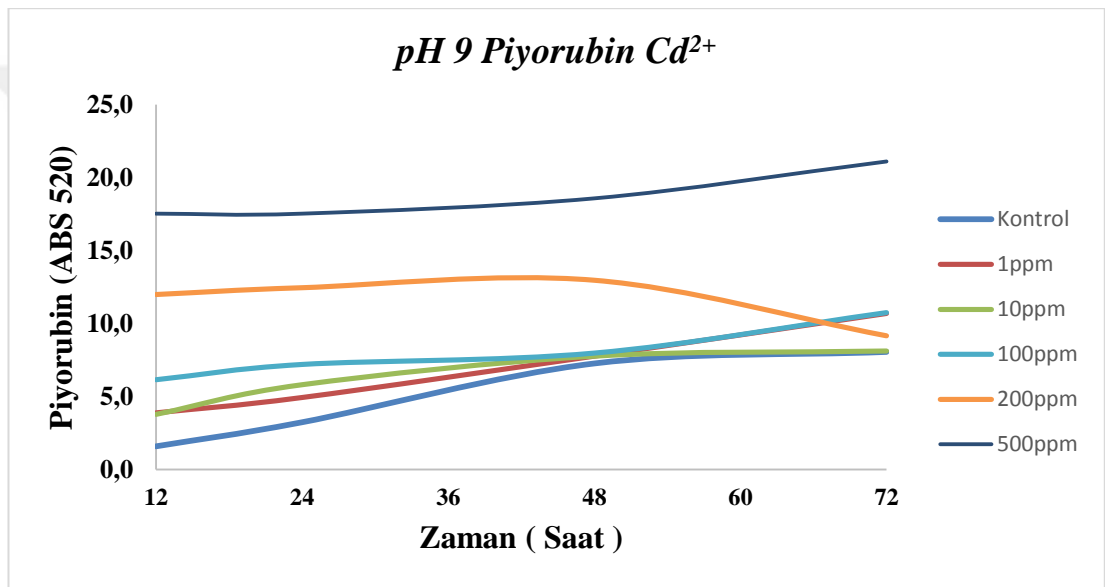
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 1.332 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34.** *P. aeruginosa*'nın pH 7'de 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.3.3.3. pH 9'da CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.471 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 72. saatte 4 kat sulandırım yapılarak 1.236 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.35).



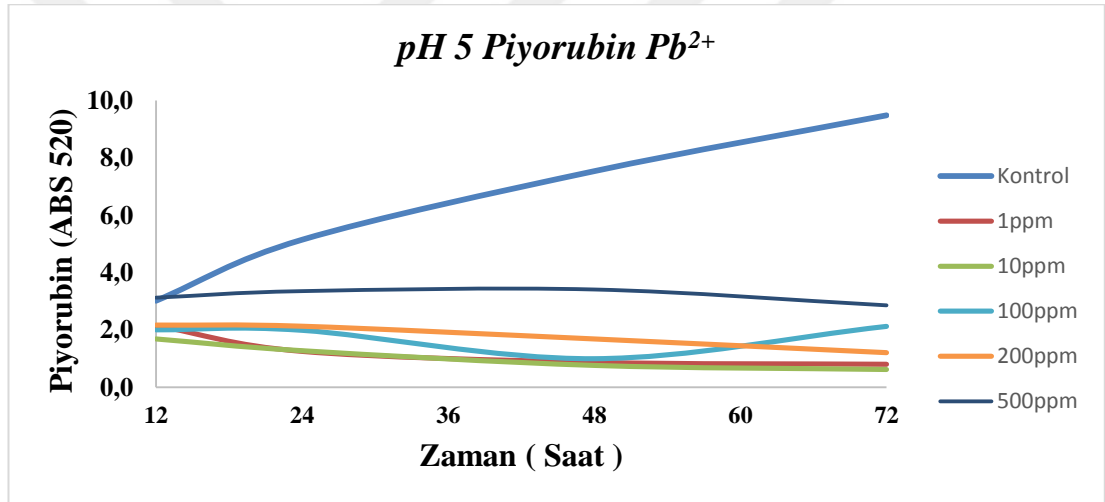
**Şekil 4.35.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak CdSO<sub>4</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; her üç pH ortamının piyorubin üretimi için avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.3.4. *P. aeruginosa*'nın $PbCl_2$ içeren ortamda piyorubin üretimi

##### 4.2.3.4.1. pH 5'de $PbCl_2$ içeren ortamda piyorubin üretimi

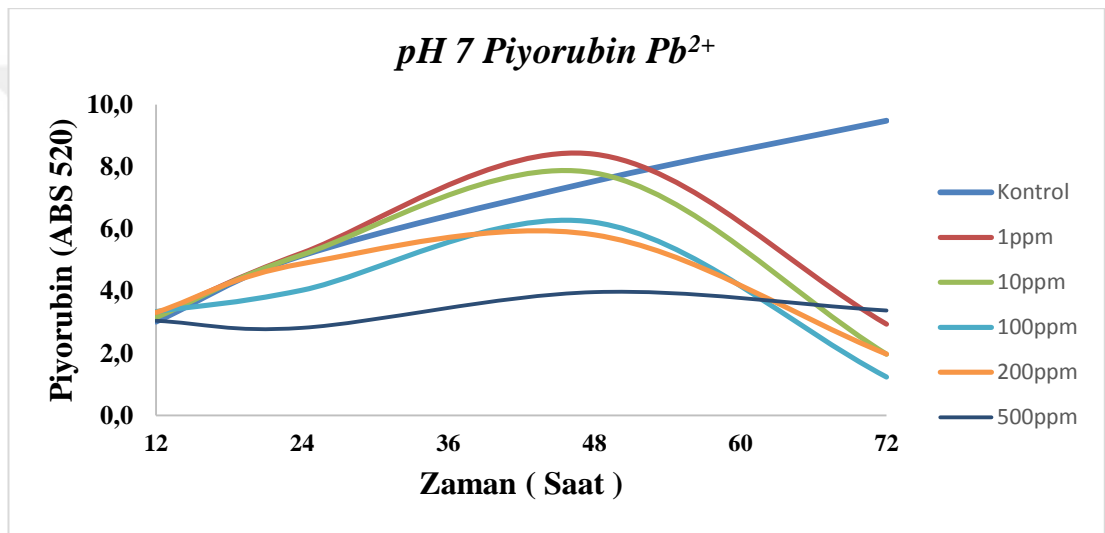
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 5'de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm  $PbCl_2$  içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.555 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 48. saatte 0.199 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.36).



**Şekil 4.36.** *P. aeruginosa*'nın pH 5'de 1-10-100-200-500 ppm  $PbCl_2$  içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.2.3.4.2. pH 7’de PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

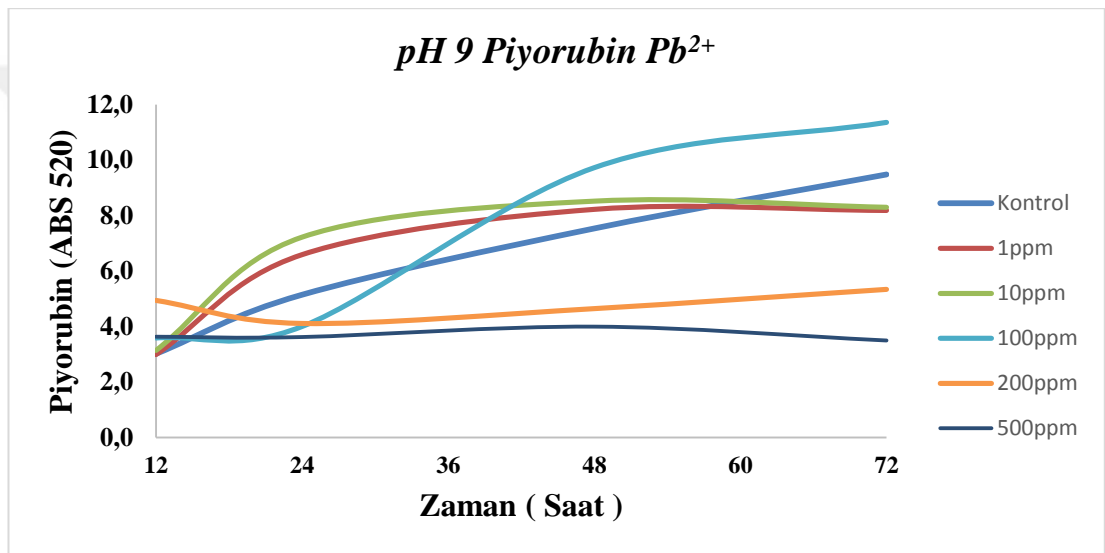
*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 7’de 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 48. saatlerde en düşük üretimin ise 72. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.555 ABS ile en yüksek değerini alırken; 500 ppm metal uygulamasında 48. saatte 0.232 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.37).



**Şekil 4.37.** *P. aeruginosa*'nın pH 7’de 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C’de ve 180 rpm’ de üretilmiştir.

#### 4.2.3.4.3. pH 9'da PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi

*P. aeruginosa* bakterisinin, *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki pH 9'da 1, 10, 100, 200 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren ortamda piyorubin üretimi açısından incelediğimizde; en yüksek pigment üretiminin genelde 72. saatlerde en düşük üretimin ise 12. saatlerde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu 72. saatte 0.555 ABS ile en yüksek değerini alırken; 100 ppm metal uygulamasında 72. saatte 0.665 ABS ile en yüksek piyorubin üretimine ulaşılmıştır. Sonuçta, metal uygulamasının pigment üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.38).



**Şekil 4.38.** *P. aeruginosa*'nın pH 9'da 1-10-100-200-500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren besiyerinde piyorubin düzeyi. Hücreler, 20 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

Genel olarak PbCl<sub>2</sub> metali için pH değerleri kıyaslandığında; en uygun ortamın asidik (5) ve bazik (7) olduğu ve piyorubin üretimi için bu pH'ların avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Sonuçta, ağır metallerin fizyolojik etkilerinden dolayı artışın olduğu tahmin edilmektedir.

#### 4.2.4. Piyomelanin analizi

Çalışmamızda piyomelanin pigmenti analizi için *P. aeruginosa* kanlı agar besi ortamında üretilmiştir ve bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kahverengimsi siyah renkte pigmentler gözlenmiştir.

##### 4.2.4.1. Piyomelanin kontrol grubu

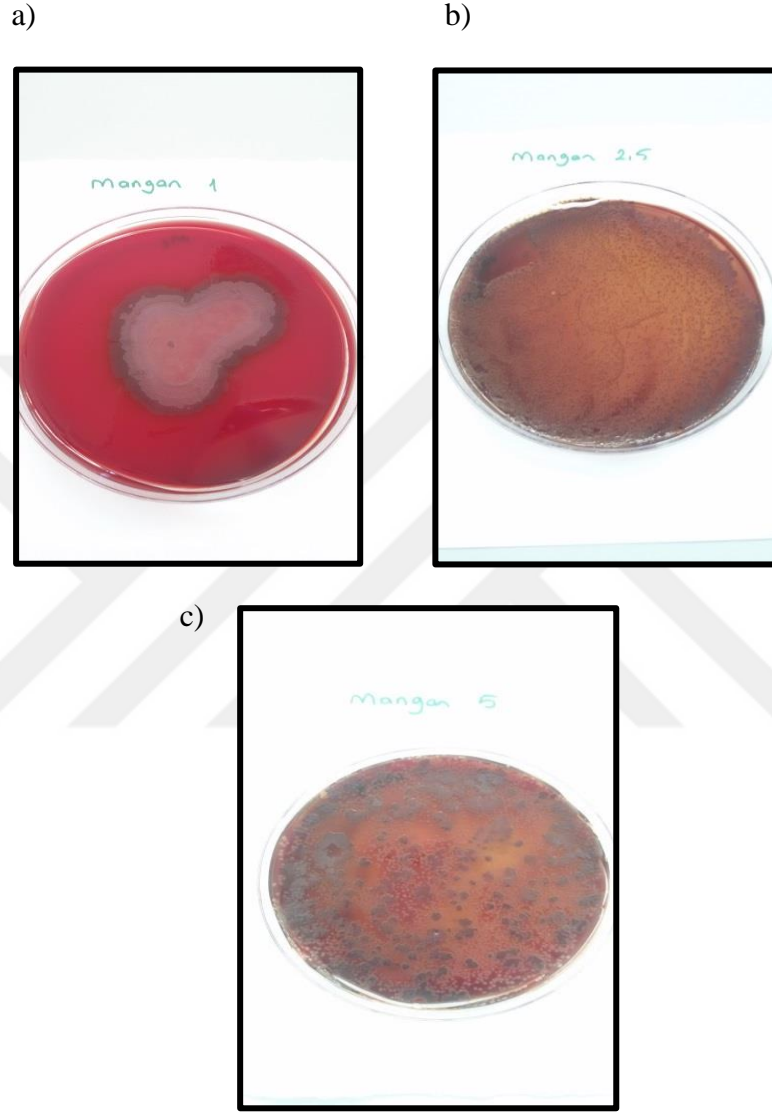
*P. aeruginosa* bakterisi steril koşullarda kanlı agar besiyerine ekildikten sonra ki kontrol grubunun görüntüsü Şekil 4.39’da gözlenmiştir.



Şekil 4.39. *P. aeruginosa*'nın piyomelanin pigmenti kontrol grubu görüntüsü

#### 4.2.4.2. MnCl<sub>2</sub> içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi

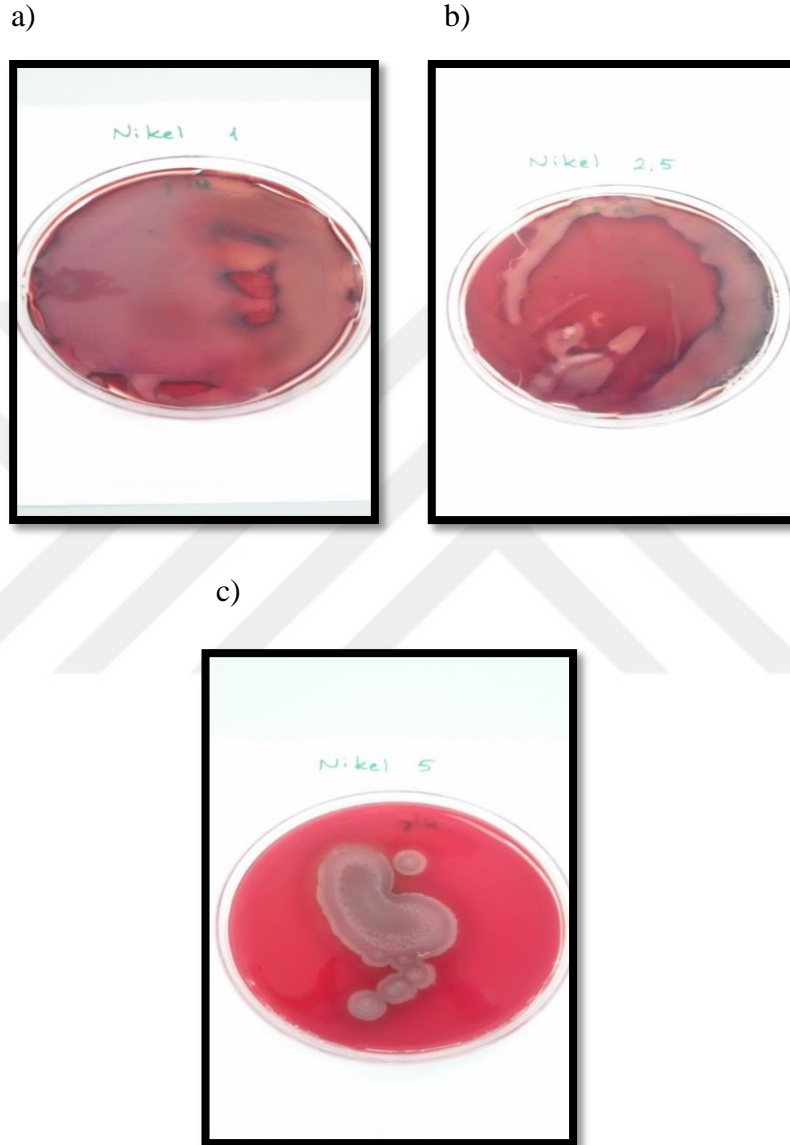
*P. aeruginosa*'nın gece kültürü ve 100, 250 ve 500 ppm MnCl<sub>2</sub> steril koşullarda kanlı agar besiyerine ekildikten sonra ki piyomelanin pigmenti görüntüleri Şekil 4.40'da verilmiştir.



**Şekil 4.40.** a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm MnCl<sub>2</sub> içeren *P. aeruginosa*'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.

#### 4.2.4.3. NiCl<sub>2</sub> içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi

*P. aeruginosa*'nın gece kültürü ve 100, 250 ve 500 ppm NiCl<sub>2</sub> steril koşullarda kanlı agar besiyerine ekildikten sonraki piyomelanin pigmenti görüntüleri Şekil 4.41'de verilmiştir.

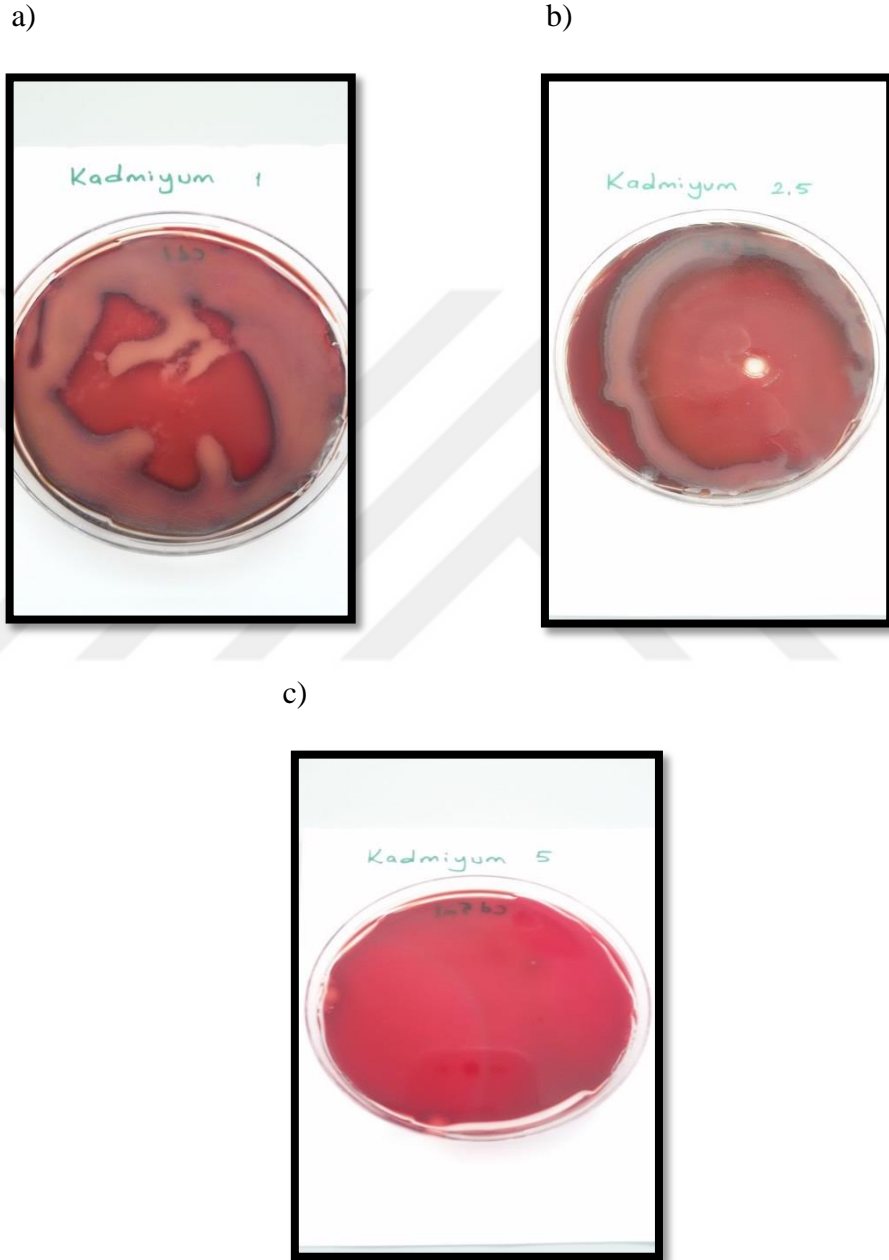


**Şekil 4.41.** a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm NiCl<sub>2</sub> içeren *P. aeruginosa*'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.



#### 4.2.4.4. CdSO<sub>4</sub> içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi

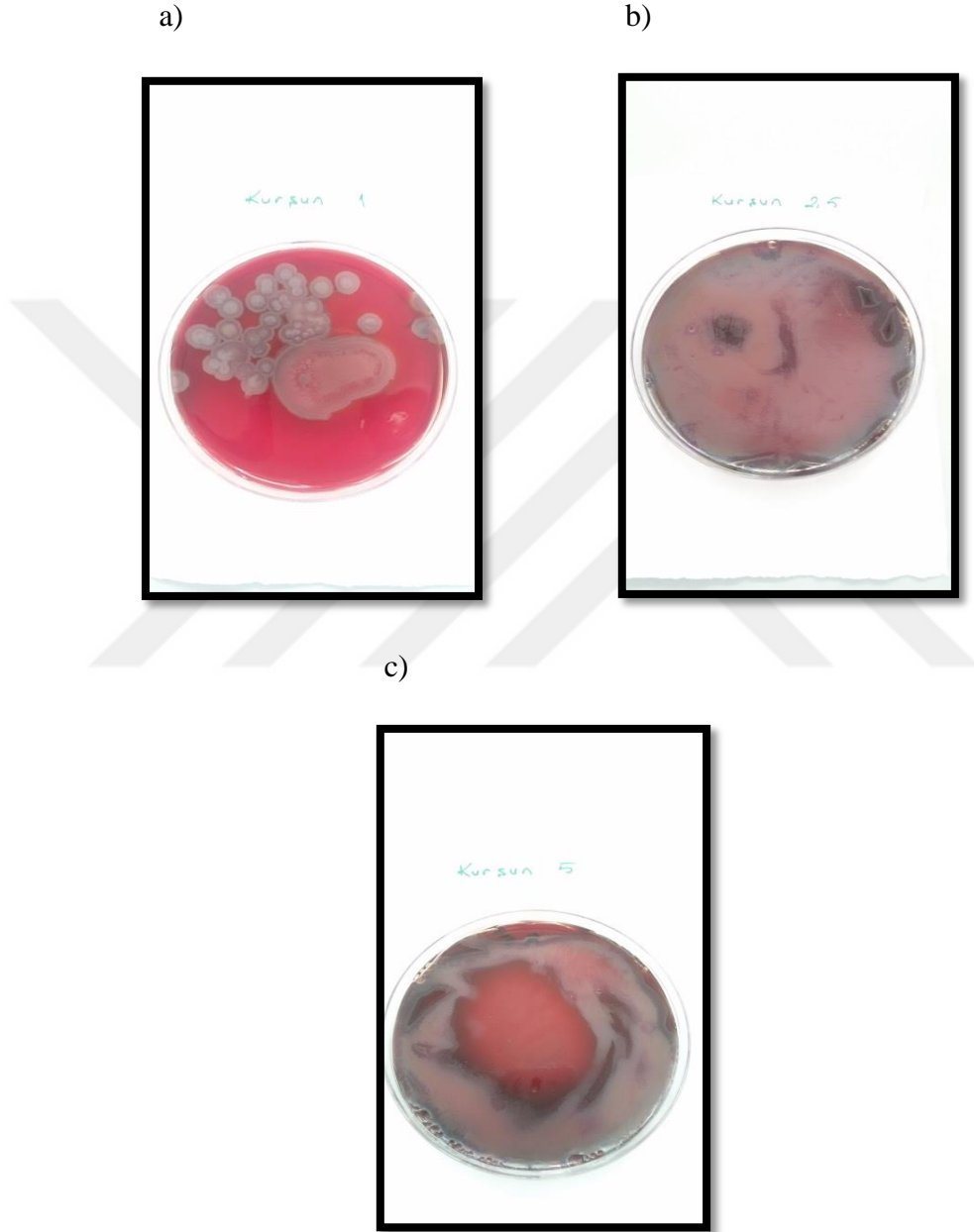
*P. aeruginosa*'nın gece kültürü ve 100, 250 ve 500 ppm CdSO<sub>4</sub> steril koşullarda kanlı agar besiyerine ekildikten sonraki piyomelanin pigmenti görüntüleri Şekil 4.42'de verilmiştir.



Şekil 4.42. a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm CdSO<sub>4</sub> içeren *P. aeruginosa*'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri.

#### 4.2.4.5. PbCl<sub>2</sub> içeren kanlı agarda piyomelanin üretimi

*P. aeruginosa*'nın gece kültürü ve 100, 250 ve 500 ppm PbCl<sub>2</sub> steril koşullarda kanlı agar besiyerine ekildikten sonraki piyomelanin pigmenti görüntüleri Şekil 4.43'de verilmiştir.



**Şekil 4.43.** a) 100 ppm b) 250 ppm c) 500 ppm PbCl<sub>2</sub> içeren *P. aeruginosa*'nın piyomelanin pigmenti görüntüleri

### 4.3. Metal Uygulama Sonrası Enzim Aktivite Tayini

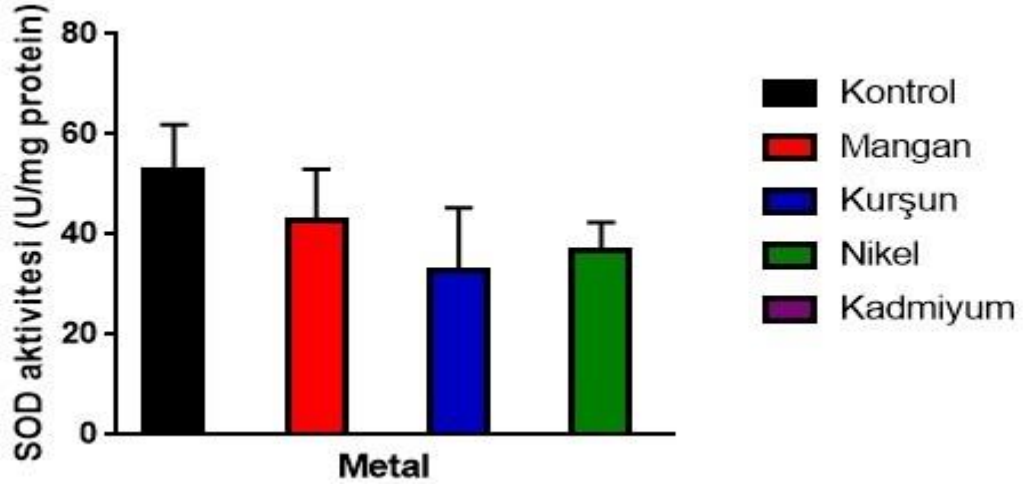
*P. aeruginosa* bakterisinin önemli antioksidan sistem elemanları olan SOD, KAT enzimleri ve TGSH miktarı üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla dört metal için tek doz 1000 µl (1 ml) olacak şekilde hazırlanan besi ortamları 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra ölçümler yapıldı. Deney altı (6) tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen sonuçlar metal uygulanmayan kontrol gruplarıyla kıyaslanmıştır.

**Çizelge 4.2.** *P. aeruginosa*'nın MnCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> ve CdSO<sub>4</sub> metal uygulama sonrası SOD, KAT enzim aktivitesi ve TGSH miktarı.

Uygulanan metaller	SOD Aktivitesi (U/mg protein)	KAT Aktivitesi (U/mg protein)	TGSH Miktarı (U/mg protein)
<b>Kontrol</b>	52.75 ± 9.15	279.08 ± 45.91	4.88 ± 1.04
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	42.78 ± 10.25	423.48 ± 48.18	2.43 ± 0.64
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	32.67 ± 12.60	408.49 ± 38.64	5.08 ± 1.95
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	36.67 ± 5.78	243.15 ± 16.31	14.75 ± 5.87
<b>CdSO<sub>4</sub></b>	Aktivite yok	Aktivite yok	Aktivite yok

#### 4.3.1. Metal uygulama sonrası SOD aktivitesi

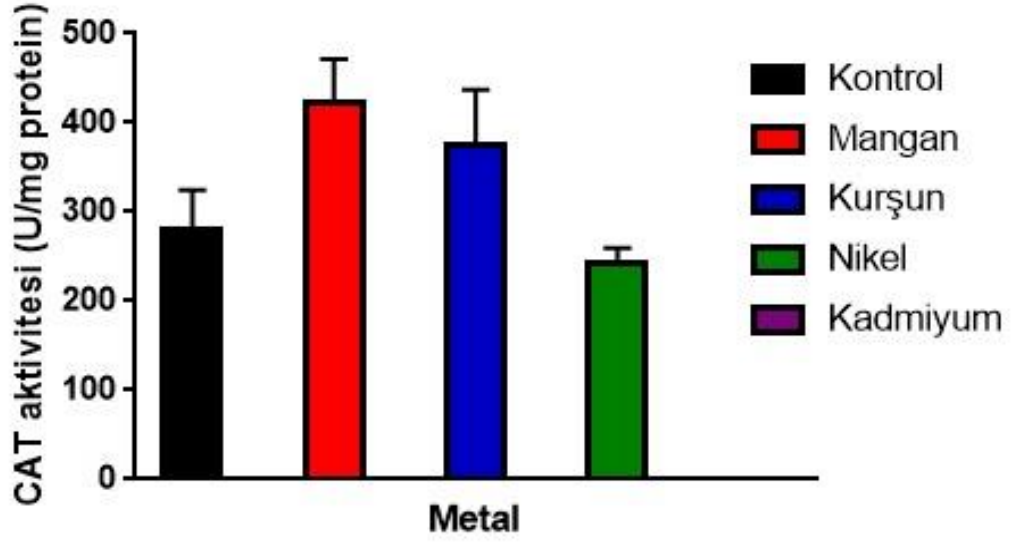
*P. aeruginosa* bakterisinde ağır metal stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan kontrol gruplarında SOD aktivitesi saptanmış ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında dört metalde de kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde bir azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde mangan (42.78 U/mg protein) kontrole (52.75 U/mg protein) yakın bir aktivite gösterirken, kurşunda (32.67 U/mg protein) ise daha düşük bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir. Dört metalin SOD enzim aktivitesi Şekil 4.44'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.44.** *P. aeruginosa*'nın  $MnCl_2$ ,  $PbCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $CdSO_4$  metal uygulama sonrası SOD enzim aktivitesi.  $CdSO_4$  metal uygulama sonrasında aktivite gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml LB besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve 180 rpm' de üretilmiştir.

#### 4.3.2. Metal uygulama sonrası KAT aktivitesi

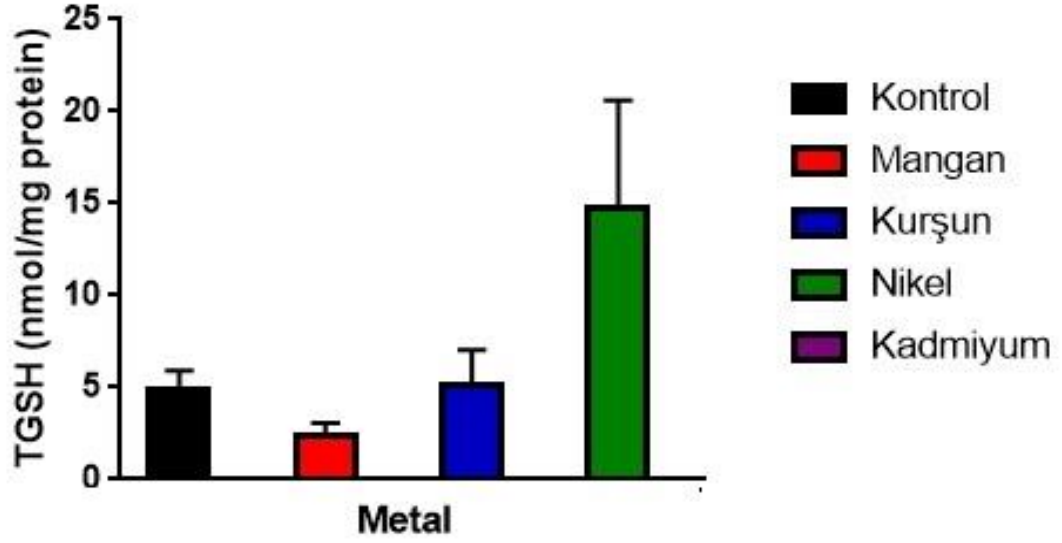
*P. aeruginosa* bakterisinde ağır metal stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan kontrol gruplarında KAT aktivitesi saptanmış ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında mangan ve kurşun metalinde kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde bir artışın, nikel metalinde ise bir azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde mangan (423.48 U/mg protein) en yüksek enzim aktivitesi gösterirken, nikel metalinde (243.15 U/mg protein) ise en düşük enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir. Dört metalin KAT enzim aktivitesi Şekil 4.45'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.45.** *P. aeruginosa*'nın  $MnCl_2$ ,  $PbCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $CdSO_4$  metal uygulama sonrası KAT enzim aktivitesi.  $CdSO_4$  metal uygulama sonrasında aktivite gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml LB besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve 180 rpm' de üretilmiştir

#### 4.3.3. Metal uygulama sonrası toplam glutatyon miktarı

*P. aeruginosa* bakterisinde ağır metal stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan kontrol gruplarında TGSH miktarı saptanmış ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında glutatyon miktarında, nikel ve kurşun metalinde kontrol grubuna göre artışın, mangan metalinde ise bir azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde en yüksek glutatyon miktarını nikel metali 14.75 U/mg protein ile gösterirken, mangan metali ise 2.43 U/mg protein ile en düşük değeri göstermiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir değer kaydedilmemiştir. Dört metalin TGSH miktarı Şekil 4.46'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.46.** *P. aeruginosa*'nın  $MnCl_2$ ,  $PbCl_2$ ,  $NiCl_2$  ve  $CdSO_4$  metal uygulama sonrası TGS miktarı.  $CdSO_4$  metal uygulama sonrasında herhangi bir değer gözlenmemiştir. Hücreler, 20 ml LB besiyeri / 100 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 180 rpm' de üretilmiştir

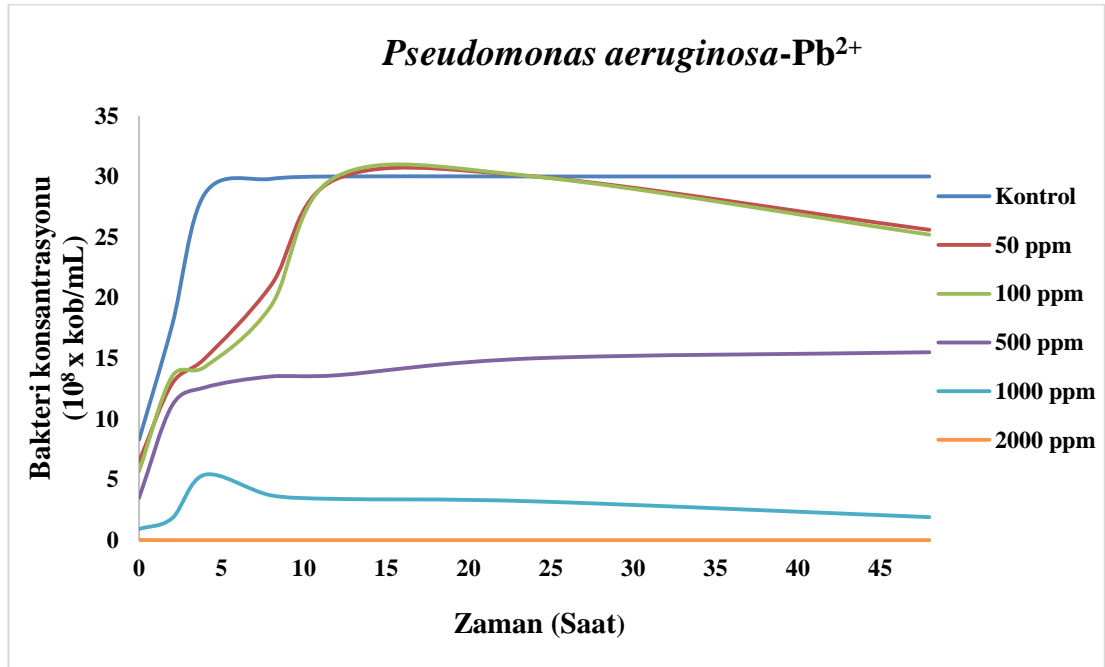
#### 4.4. Metal Dirençlilik Tayini

##### 4.4.1. *P. aeruginosa*'nın metal toleransının tespiti

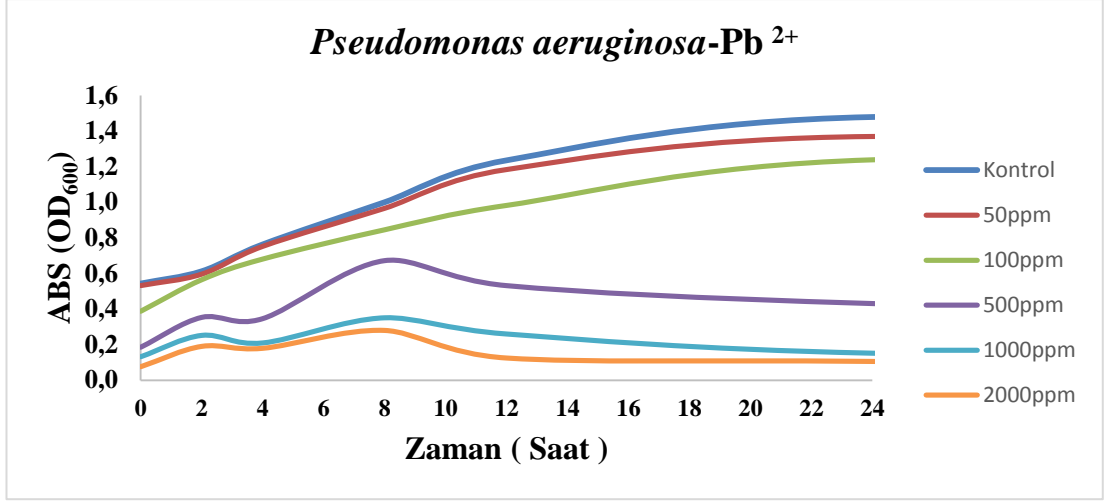
Petri kaplarında PCA besiyerinde +4°C'de bulunan suşların herbiri 30 ml nütrient broth besiyerine ekilmiş, çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Aktifleşen suşa ait her bir erlenden numune alınarak biyokütle yoğunlukları 600 nm'de mikropilaka okuyucuda tespit edilmiştir. Belirlenen değerler ve suşun metalsiz olarak aynı hacimlerdeki inkübasyonu sonrasındaki kontrol ekimlerinin kurşun metali için canlı hücre sayımı ve biyokütle yoğunluk değerleri Şekil 4.47 ve 4.48' de, kadmiyum için Şekil 4.49 ve 4.50'de gösterilmiştir.

Kurşun metali uygulaması sonrası üreme potansiyelleri incelendiğinde kontrol grubu ve tüm dozlarda üremenin olduğu gözlemlenmiştir. 50, 100 ve 500 ppm dozlarında üreme diğer dozlara oranla daha yoğun iken, 1000 ppm metal uygulamasından itibaren üreme potansiyeli azalmaktadır.

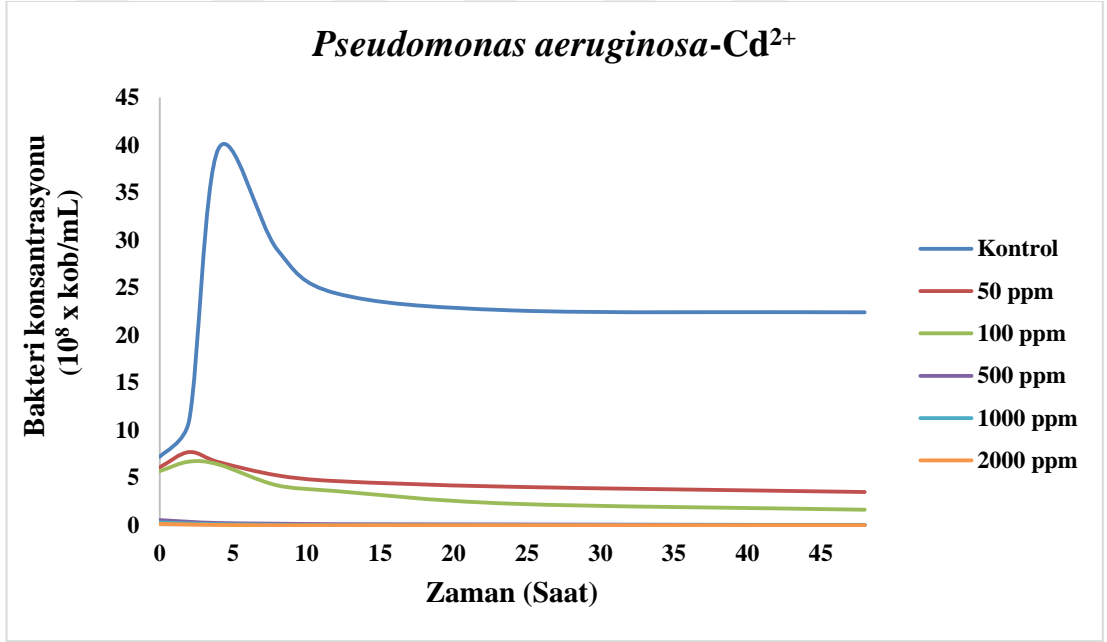
Kadmiyum metali uygulaması sonrası üreme potansiyelleri incelendiğinde kontrol grubu ve tüm dozlarda üremenin olduğu gözlemlenmiştir. 50 ve 100 ppm dozlarında üreme diğer dozlara oranla daha yoğun iken, 100 ppm metal uygulamasından itibaren üreme potansiyeli giderek azalmakta ve son iki dozda tamamen üreme durmaktadır.



Şekil 4.47. *P. aeruginosa*'nın PbCl<sub>2</sub> metal uygulama sonrası canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafiği

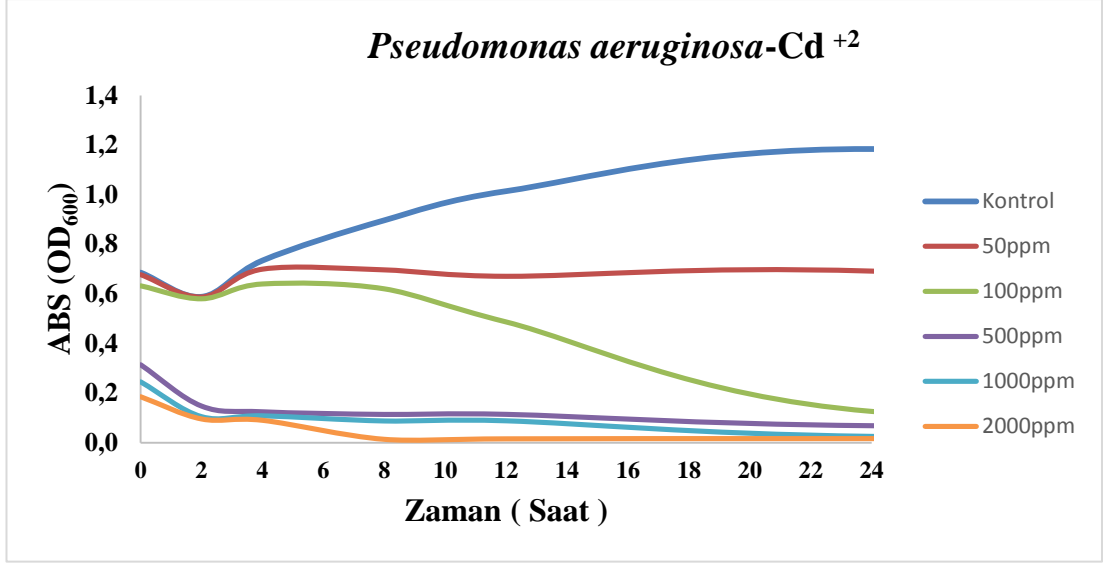


Şekil 4.48. *P. aeruginosa*'nın PbCl<sub>2</sub> metal uygulama sonrası üreme potansiyeli



Şekil 4.49. *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> metal uygulama sonrası canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafiği

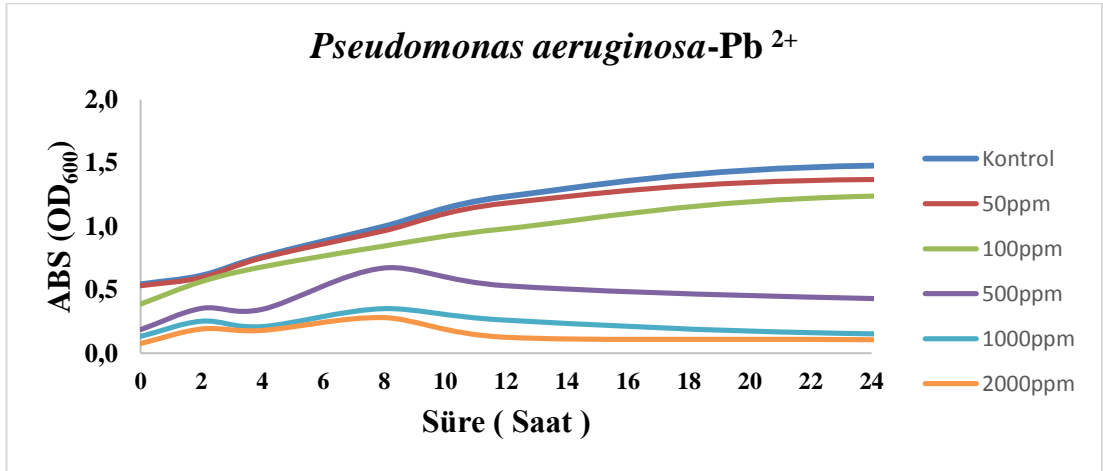




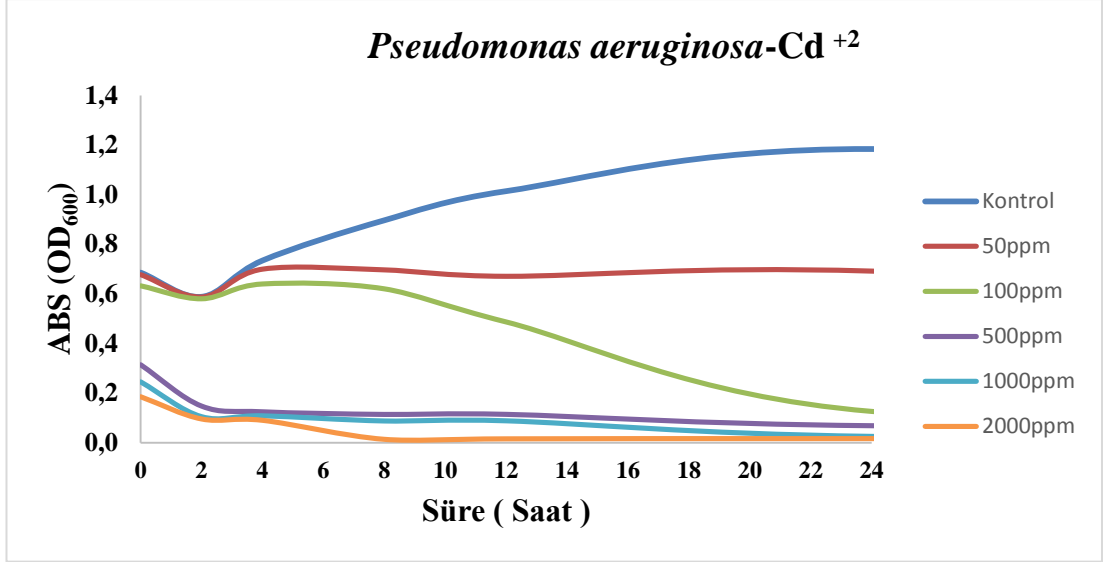
Şekil 4.50. *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> metal uygulama sonrası üreme potansiyeli

#### 4.4.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) tayini

MIC tayininde; *P. aeruginosa*'ya kurşun ve kadmiyum metalleri 50-100-500-1000-2000 ppm dozunda uyguladıktan sonra besiyeri ortamlarında 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 2., 4., 8., 12., 24., ve 48. saatlerinde suşa ait besiyerinden numuneler alınarak 600 nm'de mikroplate okuyucu ile (Thermo Flash 2000) örneklerin üreme potansiyelleri belirlenmiştir. Üreme potansiyeli grafiklerinin sonucundan yola çıkarak kurşun metali için MIC değerinin 1000 ppm Şekil 4.51'de gösterilmiştir. Kadmiyum metali için MIC değeri 100 ppm olarak Şekil 4.52 'de tespit edilmiştir.



Şekil 4.51. *P. aeruginosa*'nın PbCl<sub>2</sub> metal uygulama sonrası MIC değeri (mavi çizgi)



**Şekil 4.52.** *P. aeruginosa*'nın CdSO<sub>4</sub> metal uygulama sonrası MIC değeri (yeşil çizgi)

#### 4.4.3. Biyobirikim deneyleri

*P. aeruginosa*'da Pb'nin MIC değeri 1000 ppm olarak bulunmuştur. Bulunan bu MIC değerinin 3 alt dozu 125 – 250– 500 ppm Pb biyobirikim deneylerinde uygulanmıştır. Nutrient broth besiyerinde üretilen metal uygulanmayan kontrol grubu ve *P. aeruginosa*'ya uygulanan bu dozlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kültürler inkübatörden alınarak 3 ayrı ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

- 1.ekstraksiyon; besiyerinde kalan Pb miktarı
- 2.ekstraksiyon; bakteri hücre duvarında biriken Pb miktarı
- 3.ekstraksiyon; bakteri hücre içinde biriken Pb miktarı

*P. aeruginosa*'da Cd'nin MIC değeri 100 ppm olarak bulunmuştur. Bulunan bu MIC değerinin 3 alt dozu 12,5 – 25 – 50 ppm Cd biyobirikim deneylerinde uygulanmıştır. Nutrient broth besiyerinde üretilen metal uygulanmayan kontrol grubu ve *P. aeruginosa*'ya uygulanan bu dozlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kültürler inkübatörden alınarak 3 ayrı ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

- 1.ekstraksiyon; besiyerinde kalan Cd miktarı
- 2.ekstraksiyon; bakteri hücre duvarında biriken Cd miktarı

3.ekstraksiyon; bakteri hücre içinde biriken Cd miktarı

Bu üç ekstraksiyon metoduyla elde edilen ekstraktlar atomik adsorbsiyon cihazında (ICP-MS) üç tekrarlı olacak şekilde okutulmuştur.

ICP-MS cihazında örnekler üç tekrarlı olarak okunduktan sonra sonuçlar incelendiğinde; 125 ppm kurşun metali uygulandıktan sonra kurşun metali üç grubun ortalaması alınarak 72940 ortalama ile en fazla besiyeri içerisinde kalmıştır. 250 ppm kurşun uygulamasında 135900 ortalama ile en fazla besiyerinde kalırken, 500 ppm dozunda 355700 ortalama ile hücre duvarında tespit edilmiştir. Üç doz uygulama sonuçları Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Kurşun metali uygulama sonucunda atomik adsorbsiyon sonuçları

<b>KURŞUN</b>			
	<b>125 ppm</b>	<b>250 ppm</b>	<b>500 ppm</b>
<b>Kontrol</b>	63800 ± 1740.56	40290 ± 1091.03	3366 ± 111.64
<b>S</b>	72940 ± 497.62	135900 ± 3807.31	88140 ± 3510.83
<b>HI</b>	893.5 ± 2.99	3315 ± 53.48	6491 ± 13.93
<b>BY</b>	38550 ± 686.19	86740 ± 1164.73	355700 ± 8909.69

K: Kontrol grubunda Pb-Cd miktarı      S: Besiyerinde kalan Pb-Cd miktarı

HI: Bakteri hücre içindeki Pb-Cd miktarı    BY: Bakteri hücre duvarındaki Pb-Cd miktarı

ICP-MS cihazında örnekler üç tekrarlı olarak okunduktan sonra sonuçlar incelendiğinde; 12.5 ppm kadmiyum metali uygulandıktan sonra kadmiyum metali üç grubun ortalaması alınarak 6198 ortalama ile en fazla hücre duvarı içerisinde tespit edilmiştir. 25 ppm kadmiyum uygulamasında 9530 ortalama ile en fazla hücre duvarında bulunurken, 50 ppm dozunda 22330 ortalama ile besiyeri içerisinde tespit edilmiştir. Üç doz uygulama sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Kadmiyum metali uygulama sonucunda atomik adsorbsiyon sonuçları

<b>KADMIYUM</b>			
	<b>12.5 ppm</b>	<b>25 ppm</b>	<b>50 ppm</b>
<b>Kontrol</b>	6176 ± 333,27	14830 ± 918,90	27500 ± 1671.39
<b>S</b>	2610 ± 241.69	6738 ± 405.14	22330 ± 202.82
<b>HI</b>	1004 ± 41.88	1195 ± 30.53	791.6 ± 14.42
<b>BY</b>	6198 ± 69.51	9530 ± 640.15	10650 ± 359.19

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Ağır Metal Uygulamasının *P. aeruginosa*'nın Üreme Potansiyeli Üzerine Etkisi

Hızla gelişen endüstri ve teknolojik ilerlemenin bir sonucu olarak ağır metal kirliliği bugün gelişmekte olan birçok ülkenin en önemli çevresel sorunlarından biri haline gelmiştir. Çeşitli alanlarda kullanım sonucunda toksik metaller oluşmaktadır (Florea ve Büsselberg, 2006). Bu ağır metallerin biyolojik olarak ortadan kaldırılamaması ve canlı organizmalarda birikebilmelerinden dolayı özellikle hayvan ve insanların da dâhil olduğu birçok canlı grubu için önemli bir risk oluşturmaktadır (Linde vd., 1996; Shukla vd., 2010; Ilijin vd., 2010).

Ekosistem üzerinde özellikle ağır metallerin ve organik kirleticilerin neden olduğu stres ortamlarından ilk olarak etkilenen canlı grubu bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalardır. Bu organizmalar çevresel strese karşı koyabilmek için savunma cevabında önemli olan genlerin sentezini düzenleme gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Mikroorganizmalar karşılaşmış olduğu strese farklı şekilde karşı koyabilmişlerdir. Bakterilerin zayıf stres olarak adlandırılan sublethal bir stres koşulunda, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Ancak üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır (Dikici, 2009; Özbey, 2014).

Son yıllarda atıksulardaki kimyasal kirleticilerin biyolojik olarak arıtılması konusunda yapılan çalışmalarda, farklı türlerden mikroorganizmaların (bakteri, fungus, alg), toksik olduğu bilinen ağır metalleri gerek biyosorbsiyon gerekse biyobirikim yoluyla zararsız veya daha az toksik formlarına dönüştürebilmektedirler. Bu dönüşümü, hücre duvarlarındaki fonksiyonel gruplarla veya salgılarıyla tutabildikleri, hücre içi sistemleriyle yapabildikleri ortaya konulmuştur.

*P. aeruginosa* geniş bir habitat da gelişen biyolojik rejenerasyon ve biyolojik dejenerasyon yetenekleri oldukça gelişmiş bir bakteridir (Essar vd., 1990). Aynı zamanda bu bakteri metabolik yeteneği ve çevresel çok yönlülüğü nedeni ile geniş oranda çalışılmaktadır.

Bu çalışmada, birçok stres faktörüne karşı toleranslı olan *P. aeruginosa* bakterisine Mangan (II) klorür ( $MnCl_2$ ), Nikel (II) klorür ( $NiCl_2$ ), Kadmiyum sülfat ( $CdSO_4$ ) ve Kurşun (II) klorür ( $PbCl_2$ ) metallerinin tuz formları değişik dozlarda uygulanıp pigment üretimleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve metal direnç analizleri araştırılmak istenmiştir.

Bakteri hücresi çeşitli stres faktörüne maruz kaldığında bakterinin genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek bu stresten korunmaya çalışır. Stres koşulunda bakteri DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta, bu mRNA ribozomlarda translasyon sonucunda stres proteinini sentezlemiş olmaktadır. Sentezlenen proteinler bakterinin stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktöründe de etkili olabilmektedir. Kadmiyum stresi varlığında indüklenen yüksek ve düşük moleküler proteinler bakterileri korumak için metal taşıyıcılar, metal-detoksifiye edici enzimler ve metalotiyoninler gibi kadmiyum bağlayıcı proteinler olabilir (Muneer vd., 2016). *Pseudomonas sp.*'ler metal bulunan ortamlarda Metallothionein adı verilen, küçük moleküler ağırlıklı sisteince zengin protein üretebilmekte ve hücre içine giren toksik metaller bu tür proteinlere bağlanarak bakteriyi toksik metallerle karşı daha dirençli hale getirmektedir (Naik ve Dubey, 2013). Yapılan bir çalışmada *P. putida*'nın metalloprotein ürettiği bildirilmiştir (Bruins vd., 2000b).

*P. aeruginosa* bakterisinin üreme ortamına farklı dozlarda  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  gibi toksik metalleri ilave ettikten sonra üreme potansiyelini incelediğimizde  $Cd^{2+}$  Pa'nın üreme potansiyelini daha fazla etkilediğini gözlenmiştir. Çünkü yapılan çalışmalar sonucunda  $Cd^{2+}$ 'nin DNA' da indirekt oksidatif strese neden olarak apoptotik mekanizma indüklenmesi ve DNA onarım mekanizmasının bloklanması, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyon artışı gibi hücre içinde gerçekleşen olayları tetiklemesine sebep olmaktadır (Chakraborty ve Das, 2014). Hücre içi  $Cd^{2+}$ 'nin, membran bütünlüğünü bozması ve DNA'da tek zincir kırıklarına neden olmasının yanında DNA yanlış eşleşme tamir sisteminin, nükleik asit ve protein sentezinin inhibitörü olduğu da bilinmektedir. (Daly ve Boshard, 1984; Supriya ve Nutan, 2010 ). Deniz bakterisi *P. aeruginosa* JP-11'in kadmiyuma direncinin 16S ribozomal RNA (rRNA) gen dizilimi ile olduğu tespit edilmiştir (Chakraborty ve Das, 2014; Muneer vd., 2016) .

Kurşun metali uygulaması sonrası üreme potansiyelleri incelendiğinde kontrol grubu dahil tüm dozlarda üremenin olduğu gözlemlenmiştir. 50, 100 ve 500 ppm dozlarında üreme daha yoğun iken, 1000 ppm metal uygulamasından itibaren üreme potansiyeli azalmaktadır. Yaptığımız çalışma ile bakteriye uygulanan doz miktarı arttıkça etkin savunma mekanizması sayesinde metalin toksisitesinden daha

az etkilendiğini söyleyebiliriz. Mangan ve nikel metali esansiyel toksik metal özelliği gösterdiğinden düşük dozlarda üreme yoğunluğu kontrol grubuna yakın bir değer gösterirken, yüksek dozlarda üreme yoğunluğunda azalış tespit edilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda, *P. aeruginosa*'ya 0.02 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M konsantrasyonda MgSO<sub>4</sub>, MgCO<sub>3</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> metalleri uygulamışlardır. NiSO<sub>4</sub> kontrol ile kıyaslandığında absorbansı (OD<sub>600</sub>) 18. saatte 0.054' den 0.33'e, 24 ve 48. saatlerde 0.4 ve 0.45 µM artış olduğu tespit edilmiştir. (Hussein ve Abdul Saha, 2008).

Muneer ve ark, (2016) *P. aeruginosa* (EP-Cd1) 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 ve 650 µg/ml konsantrasyonlarda Cd<sup>2+</sup> uygulamışlar ve büyümenin en iyi pH 6 'da ve 35 °C'de olduğunu gözlemlemişlerdir. 300 µg/ml konsantrasyonda çeşitli proteinlerin varlığını tespit ederken; endüstriyel atık sularındaki Cd<sup>2+</sup>'nin % 95'nin, 72 saat inkübasyondan sonra ortamdaki Cd<sup>2+</sup>'nin % 80 'ini gidermede etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Muneer vd., 2016).

Wang ve ark. 1997 yılında yaptığı çalışmada, yapay deniz ortamında *P. aeruginosa* tarafından Cd<sup>2+</sup> metalinin giderimini araştırmışlardır. 0-1-3-5 mM Cd<sup>2+</sup> konsantrasyonunda 50 saat sonra OD<sub>600</sub> ve pH değerlerini sırasıyla OD<sub>600</sub> 1.37 – 1.31 – 1.54 – 0.45 ABS; pH 8.5 – 8.5 – 8.3 – 8.1 bulmuşlardır. 140 saat sonra ise OD<sub>600</sub> ve pH değerlerini sırasıyla OD<sub>600</sub> 0.43 – 0.94 – 1.22 – 1.30 ABS; pH 9.1 olarak bulmuşlardır (Wang vd., 1997).

*P. aeruginosa* ASU 6a LB ortamında 0.85-1.7-3.4-5.1 mM Ni<sup>2+</sup> ve 0.25-0.5-1.0-1.5-2.0 mM Pb<sup>2+</sup> uygulamışlar ve sonuçta artan konsantrasyonda OD<sub>600</sub> büyüme eğrisinde azalışın olduğunu tespit etmişlerdir (Hassan vd., 2008). Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, 50-100-500 ppm Pb<sup>2+</sup> konsantrasyonunda üreme potansiyalinin giderek azaldığı ve büyüme eğrisinin de aynı şekilde azaldığı gözlenmiştir. 1000 ppm konsantrasyonda artık üremenin yaklaşık yarı yarıya azaldığı, 2000 ppm konsantrasyonda ise tamamen durduğunu tespit edilmiştir.

*P. aeruginosa* 'ya 0.5 ve 1 mM Cd<sup>2+</sup> metali uygulandığında bakteri büyümesi 16. saatten sonra artmış 0.5 mM metalde OD<sub>600</sub> yaklaşık 1 iken, 1 mM metalde 0.8 ABS bulunmuştur (Hassen vd.,1998b).

Cd<sup>2+</sup> metalinin büyümeye etkisini gözlemek için; 0.25 mM artan konsantrasyonda 0.25-4 mM aralığında Cd<sup>2+</sup> metali uygulamışlar ve sonuçta OD<sub>600</sub>'de ilk konsantrasyonda yaklaşık 2.1 ABS değerini alırken, 4 mM konsantrasyonda giderek azalıp 1.3 ABS değerini almıştır (Sinha ve Mukherjee,

2008). Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda; 50-100 ppm  $Cd^{2+}$  metali konsantrasyonunda üremenin olduğunu ve büyüme eğrisinin ilk saatlerde giderek arttığını, 500-1000-2000 ppm konsantrasyonda ise üremenin tamamen durduğu tespit edilmiştir.

## 5.2. Ağır Metal Uygulamasının Pigment Üretimi ve Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Pigment; bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ya da inorganik bir kaynaktan elde edilen sentez, ekstraksiyon, izolasyon veya benzeri işlemlerle elde edilen boya olarak tanımlanır (Anonymous, 1995). Pigmentlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Das ve Ma, 2013). *Pseudomonas* türleri onlara seçici bir özellik kazandıran piyosiyanın, piyoverdin (fluoressein), piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler üretmektedir (Kantarıcı, 1992). Son yıllarda fluoresens *Pseudomonas*'ların temsilcilerinden özellikle *P. aeruginosa* ile besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyanın pigmentini üreten birçok çalışma yapılmaktadır (Das ve Ma, 2013).

Atıksularda *Pseudomonas* cinsi bakterilerin fazla bulunması, bakterilerin bu sulardaki ekstrem şartlara karşı dayanıklılığını sağlayan ürettikleri EPS, piyosiyanın ve ramnolipid gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle çevresel atık sularda *Pseudomonas* cinsi bakteri fazla miktarda bulunmaktadır (Yalçın, 2016).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda;  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ağır metallerin uygun besi ortamında pH 5, 7, 9'da piyosiyanın pigmentinin analizi araştırıldı. Sonuçta çeşitli dozlarda  $Mn^{2+}$  bulunan *Pseudomonas* Broth P besiyerinde piyosiyanın miktarında; pH 5 'de pigment üretiminde azalış, pH 7'de ve 9'da artış olduğu görülmüştür.  $Ni^{2+}$  metalinde; pH 5 ve 7'de azalış, pH 9'da ise artış gözlenmiştir.  $Cd^{2+}$  metalinde her üç pH değerinde pigment üretiminde artış gözlenmiştir.  $Cd^{2+}$  bakteri hücrelerine indirekt etki göstererek DNA hasarına, protein ve membran lipidlerin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Hücre de bu stres koşullunda pigment üretimini artırarak antimikrobiyal etki göstermektedir.  $Pb^{2+}$  metalinde ise pH 5'de pigment üretiminde azalış, pH 7 ve 9'da artış gözlenmiştir. Pigment üretiminde pH'nın etkisini kıyasladığımız zaman genel itibariyle dört metal

için pH 5 piyosiyenin miktarında olumsuz etki gösterirken, pH 7 ve 9 piyosiyenin miktarında olumlu etki göstererek artışa sebep olmuştur.

Pigment üretimi ile yapılan benzer çalışmalarda; 0.5 ve 1 mM Cd<sup>2+</sup> bulunan ortamda piyoverdin pigmenti tespit etmişlerdir (Hassen vd., 1998b). Hasset ve ark.(1992) yaptığı çalışmada *P. aeruginosa* bakterisinin büyüme ortamına fosfataz (mM), FeNO<sub>3</sub> ve MnCl<sub>2</sub> (µM) ilave edip piyosiyenin miktarlarını karşılaştırmışlardır. 0.1(mM) KP<sub>i</sub>; 3 (µM) FeNO<sub>3</sub> ve MnCl<sub>2</sub> ilavesinde 10.9 µg/ml piyosiyenin tespit ederken, 0.1(mM) KP<sub>i</sub>; 300 (µM) MnCl<sub>2</sub> ve 0.6 (µM) FeNO<sub>3</sub> ilavesinde 1.6 µg/ml piyosiyenin tespit etmişlerdir (Hasset vd., 1992).

Bushnell-Haas (BH) besi ortamı ve proteaz, pepton, glikozamonyum tuzları (PPGAS) ortamında Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> varlığında piyosiyenin miktarları araştırılmıştır. M15 kültüründen elde edilen hücrelerin iyi miktarda piyosiyenin oluşturdukları ve ağır metallerin etkisine daha toleranslı oldukları bulunmuştur. Pigment üretimi *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu M15 suşundan daha az pigment üretmiştir ( Das ve Ma, 2013).

Son yıllarda, bitki kökünde bulunan özellikle *Pseudomonaslar* tarafından oluşturulan sideroforlar ve patojenlerin üremesini inhibe eden antimikrobiyal metabolitler biyolojik kontrol de önem kazanmıştır (Erdem, 2013). Bakteriyel sideroforlardan olan piyoverdin pigmenti çeşitli ortamlarda ağır metallerin gideriminde kullanılmaktadır. Piyoverdin üretimi ve ağır metal giderimi konusunda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, piyoverdin analizi çalışmamızda; Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> ağır metallerin uygun besi ortamında pH 5, 7, 9'da piyoverdin pigmentinin analizini araştırdık. Sonuçta çeşitli dozlarda Mn<sup>2+</sup> bulunan King B besiyerindeki piyoverdin miktarında; pH 5 'de pigment üretiminde azalış, pH 7'de ve 9'da artış olduğu görülmüştür. Ni<sup>2+</sup> metalinde; pH 5'de azalış, pH 7 ve 9'da ise artış gözlenmiştir. Cd<sup>2+</sup> metalinde de aynı şekilde pH 5'de azalış, pH 7 ve 9'da artış gözlenmiştir. Pb<sup>2+</sup> metalinde ise pH 5'de pigment üretiminde azalış, pH 7 ve 9'da artış gözlenmiştir. Bakterilerin hücre duvarı negatif yüklü olduğundan pozitif yüklü metaller bakteriye bağlanarak hücre içinde strese sebep olurlar. Hücre de bu stres koşullunda pigment üretimini artırarak antimikrobiyal etki göstermektedir. Kurşun proteinler üzerindeki sülfidril, fosfat ya da karboksil gruplarına bağlanarak enzimleri etkisizleştirir (Terzioğlu vd., 2017). Piyoverdin pigmenti üretiminde pH'nın etkisini kıyasladığımız zaman genel itibariyle dört metal için pH 5 piyoverdin miktarında



olumsuz etki gösterirken, pH 7 ve 9 piyoverdin miktarında olumlu etki göstererek artışa sebep olmuştur.

Hussein – Abdul Saha (2008) yaptığı çalışmada *P. aeruginosa*'ya 0.02M, 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M konsantrasyonda MgSO<sub>4</sub>, MgCO<sub>3</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> metalleri uygulamışlardır. Uygulama sonrasında piyoverdin üretiminde artışın olduğunu rapor etmişlerdir (Hussein ve Abdul Saha, 2008).

Aouada ve ark. (2006) yaptığı deneyde, casamino asit ortamında (CAA), vitrifiye dip kül (VBash) ve bazaltik cam ortamında kısa süreli ve uzun süreli yapılan deneylerde, bakterili ortam pH'sı 7.5, bakterisiz ortam 7.2 olarak ayarlanmıştır. *P. aeruginosa*'nın sarı yeşil flüoresan pigmenti olan piyoverdin üretiminde ve bakteriyel büyümede belirgin bir artış tespit etmişlerdir. Piyoverdin sentezi 73±12 mg/l iken, bakteri hücresi kuru ağırlığında 740±6 mg/l büyüme boyunca sabit bir değer kaydetmişlerdir (Aouada vd., 2006).

Braud ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada, *P. aeruginosa* suşu PAO1, piyoverdin ve piyoselin üretemeyen bir suşa göre toksik metallere karşı daha az hassas olduğu sonucuna varmışlardır. Metallsiz ve 100 µM konsantrasyonda metallerin bakteri büyüme inhibisyonlarını karşılaştırmışlar: Co<sup>2+</sup> ve Ga<sup>3+</sup> sırasıyla % 76 ve % 46; Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Tl<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> % 25 ve Cd<sup>2+</sup> % 12 inhibe ettiğini vurgulamışlardır (Braud vd., 2010).

Chiado ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, sıcaklığın piyoverdin üretimi üzerindeki etkisini, *P. aeruginosa*'da ayrıntılı olarak incelemişler ve bu suş, 30 ° C'de piyoverdin üretimi için optimal bir sıcaklığa ve 37 ° C civarında daha yüksek bir optimum büyüme sıcaklığına sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Piyoverdin regülasyonu, ortamdaki toksik metalleri geniş bir şekilde tespit edebilecek ucuz bir biyosensör oluşturmak için faydalı olabilir (Chiado vd., 2013).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda piyorubin analizi incelendiğinde; Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> ağır metallerin uygun besi ortamında pH 5, 7, 9'da piyorubin pigmentinin varlığı tespit edilmiştir. Sonuçta çeşitli dozlarda Mn<sup>2+</sup> ve Cd<sup>2+</sup> bulunan *Pseudomonas* Broth P besiyerindeki piyorubin miktarında; her üç metal içinde pigment üretiminde artış gözlenmiştir. Ni<sup>2+</sup> metalinde; pH 5 ve 7'de artış, pH 9'da ise azalış gözlenmiştir. Pb<sup>2+</sup> metalinde ise pH 5 ve 7'de pigment üretiminde azalış, pH 9'da ise artış gözlenmiştir. Piyorubin pigmenti üretiminde pH'nın etkisini kıyasladığımız zaman genel itibariyle dört metal için her üç pH 5, 7, 9'da piyorubin miktarında olumlu etki göstererek artışa sebep olmuştur.

Piyomelanin pigmenti ise kanlı agar ortamında gözlemlenmiştir. Artan metal konsantrasyonunda petri içinde pigment üretiminde azalışın olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* bakterisine farklı dozlar uygulanmıştır. 1 ve 10 ppm metal konsantrasyonunda bakteri büyümesi ve pigment üretimi olumlu etkilenirken, giderek artan konsantrasyonda 100, 200 ve özellikle 500 ppm’de hem büyüme hem de pigment üretimi olumsuz etkilenmiştir.

Normal atom veya molekülde elektronlar eşlenik bulunmaları nedeniyle reaktif değilken, bu çiftlenmemiş elektronlar SOR'lara büyük bir reaktiflik kazandırır. Bu özellikleri DNA, nükleotid, protein, lipid ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermekte ve çeşitli biyolojik problemlere neden olmaktadır. Organizma sürekli olarak serbest radikal türevleri ile karşı karşıya kalmaktadır (Reiter, 1995). SOR'ların neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip organizmayı koruyan maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot, 1999; Özcan, 2011).

Hasset ve ark. (1992) yaptığı çalışmada *P. aeruginosa* bakterisinin büyüme ortamına fosfataz (mM),  $\text{FeNO}_3$  ve  $\text{MnCl}_2$  ( $\mu\text{M}$ ) ilave edip piyosiyanın, SOD ve katalaz aktiviteleri karşılaştırmışlardır. 0.1(mM)  $\text{KP}_i$ ; 3 ( $\mu\text{M}$ )  $\text{FeNO}_3$  ve  $\text{MnCl}_2$  ilavesinde 10.9  $\mu\text{g/ml}$  piyosiyanın, 2.340 U/mg protein katalaz ve 98 U/mg protein SOD aktivitesi tespit etmişlerdir. 0.1(mM)  $\text{KP}_i$ ; 300 ( $\mu\text{M}$ )  $\text{MnCl}_2$  ve 0.6 ( $\mu\text{M}$ )  $\text{FeNO}_3$  ilavesinde 1.6  $\mu\text{g/ml}$  piyosiyanın, 1.732 U/mg protein katalaz ve 54 U/mg protein SOD aktivitesi tespit etmişlerdir (Hasset vd., 1992).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, *P. aeruginosa* bakterisine  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  ağır metalleri uygulayıp endojen antioksidan olan SOD, KAT enzimleri ve TGSH miktarının metal varlığında ne şekilde etkilendiği araştırıldı. Sonuçta; SOD aktivitesinde, *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında dört metalde de kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde mangan (42.78 U/mg protein) kontrole (52.75 U/mg protein) yakın bir aktivite gösterirken, kurşunda (32.67 U/mg protein) ise daha düşük bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir.

KAT aktivitesinde, *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında mangan ve kurşun metalinde kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde artışın, nikel metalinde ise bir azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde mangan (423.48 U/mg protein) en yüksek enzim aktivitesi gösterirken, nikel

metalinde (243.15 U/mg protein) ise en düşük enzim aktivitesi gözlenmiştir. Kadmiyum metal uygulaması sonrası bakteri de herhangi bir aktivite kaydedilmemiştir.

TGSH miktarında ise, *P. aeruginosa* bakterisi 24 saat metal uygulama sonrasında nikel ve kurşun metalinde kontrol grubuna göre artışın, mangan metalinde ise bir azalışın olduğu tespit edilmiştir. Dört metal içinde en yüksek glutatyon miktarını nikel metali 14.75 U/mg protein ile gösterirken, mangan metali ise 2.43 U/mg protein ile en düşük miktarı almıştır.

$Cd^{2+}$ 'nin hücre içi membran bütünlüğünü bozması ve DNA'da tek zincir kırıklarına nedenolmasının yanında DNA yanlış eşleşme tamir sisteminin, nükleik asit ve proteinsentezinin inhibitörü olduğundan dolayı enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Mangan bu dört ağır metal içinde en az toksisiteye sahip olduğundan hem SOD hem de KAT enzimlerinin aktivitesini olumlu etkilerken, TGSH miktarını olumsuz etkilemiştir.

### **5.3. Ağır Metal Uygulamasının Metal Dirençliliği Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu endüstrilerden gelen atıksular içme sularına ve tarımsal amaçlı sulara karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla hayvan ve insanlara bulaşır. Ağır metal iyonlarının giderimi üzerine ülkemizde ve dünyada günümüze dek yapılan araştırmalar genellikle tek bileşenli sentetik sulu metal çözeltileriyle ilişkilidir (Tsezos ve Volesky., 1981). Metaller organizmaya alınmalarını takiben birçok farklı proteinle etkileşime girebilirler. Örneğin kurşun sentez enzimleri ile etkileşime geçerken; arsenik, kadmiyum ve civa enerji metabolizması ile ilgili enzimlerle etkileşir. Birçok metal metabolizma için önemli bir protein olan albümine bağlanır ve membrandan hücre içerisine geçerek hücre faaliyetlerini olumsuz etkilemektedir (Goyer vd., 2001).

Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte bu ağır metallerin çeşitli kaynaklardan gideriminde daha ucuz ve etkili yüksek metal bağlama biyosorbsiyon-biyobirikim yöntemi tercih edilmektedir. Atık sudan ağır metal gideriminin biyobirikim ile gerçekleşmesinde mikroorganizmalar tercih edilmekte; hızlı üremeleri, biyokütle yoğunluğunun fazla olması ve olumsuz koşullara olan dirençleri sebebi ile de

özellikle bakteriler kullanılmaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalar da biyolojik yöntemin tercih edilmesi yönünde ağırlık kazanmaktadır.

Çeşitli su ve atık su arıtma uygulamalarında Cr(III-VI)'un geri kazanımı için *P. aeruginosa*'nın kullanılma potansiyeli ve kirlenmiş sulu ortamların iyileştirilmesi için biyolojik ajanların kullanılmasının etkinliği araştırılmıştır (Kang vd., 2007).

Son yıllarda yapılan metal giderim çalışmalarında *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ilk sıralarda tercih edilme nedeni, bu mikroorganizmaların kirli ortamlarda canlılığını devam ettirebilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerinin kaynağı olarak da ürettikleri ikincil metabolitler gösterilmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda *P. aeruginosa* bakterisinin metal direnç tayini araştırıldı. CdSO<sub>4</sub> ve PbCl<sub>2</sub> ağır metallerin kirliliğinin ekolojik denge ve canlılar açısından kritik öneme sahip olması nedeniyle çalışmada bu metallere yer verilmiştir. Bu kapsamda, metal tuzları kullanılarak bakterinin metal direnç tespiti, MIC değerleri, biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Çalışmada genel metal yoğunluklarının ölçümleri ICP-MS cihazında ölçülmüştür. *P. aeruginosa*'da Pb<sup>2+</sup> MIC değeri 1000 ppm olarak bulunmuştur. Bulunan bu MIC değerinin 3 alt dozu 125 – 250 – 500 ppm Pb<sup>2+</sup> biyobirikim deneylerinde uygulanmıştır. ICP-MS cihazında örnekler üç tekrarlı olarak okunduktan sonra sonuçlar incelendiğinde; 125 ppm kurşun metali uygulandıktan sonra kurşun metali üç grubun ortalaması alınarak 72940 ortalama ile en fazla besiyeri içerisinde kalmıştır. 250 ppm kurşun uygulamasında 135900 ortalama ile en fazla besiyerinde kalırken, 500 ppm dozunda 355700 ortalama ile hücre duvarında tespit edilmiştir. Sonuçlara göre Pb<sup>2+</sup> metali düşük konsantrasyon yoğunluğunda besiyeri içerisinde kalırken, artan konsantrasyonda ise hücre yüzeyinde metal yoğunluğunun arttığı rapor edilmiştir. Bunun sebebi hücre duvarında bulunan fonksiyonel protein gruplarının Pb<sup>2+</sup> iyonuna bağlanmasından kaynaklanmaktadır.

*P. aeruginosa*'da Cd<sup>2+</sup> MIC değerleri 100 ppm olarak bulunmuştur. Bulunan bu MIC değerinin 3 alt dozu 12.5 – 25 – 50 ppm Cd<sup>2+</sup> biyobirikim deneylerinde uygulanmıştır. ICP-MS cihazında örnekler üç tekrarlı olarak okunduktan sonra sonuçlar incelendiğinde; 12,5 ppm kadmiyum metali uygulandıktan sonra kadmiyum metali üç grubun ortalaması alınarak 6198 ortalama ile en fazla hücre duvarı içerisinde tespit edilmiştir. 25 ppm kadmiyum uygulamasında 9530 ortalama ile en fazla hücre duvarında bulunurken, 50 ppm dozunda 22330 ortalama ile besiyeri içerisinde tespit edilmiştir. Sonuçlara göre Cd<sup>2+</sup> metali düşük konsantrasyon

yoğunluğunda hücre yüzeyinde kalırken, artan konsantrasyonda ise besiyeri içerisinde metal yoğunluğunun arttığı rapor edilmiştir. Adsorblama ile temas süresi ilişkisi ele alındığında başlangıçta mevcut olan yüksek yüzey alanı sonucunda adsorblama miktarında bir artış beklenmektedir. Süre ilerledikçe azalan yüzey nedeniyle yani adsorban miktarının azalmasına bağlı olarak adsorblama oranının düşmeye başlaması gerekmektedir. Doygunluk değerine ulaşılmasıyla birlikte adsorblama dış yüzey yerine adsorbantın gözeneklerinde gerçekleşmekte ve iç yüzey alanının daha az olması nedeniyle, artan temas süresi, adsorblamanın azalmasına yol açmaktadır (Yu vd., 2000). Aynı zamanda değişik derişim değerlerinde birim hacimdeki adsorbant miktarı değişeceği için buna bağlı olarak, adsorbant tarafından adsorblanan molekül miktarı da değişecektir. Adsorblama ilerledikçe çözelti içerisindeki adsorbant miktarı azalacağından, adsorblamanın da yavaşlanması beklenmelidir. Farklı adsorbant ve adsorbanlar kullanıldığında başlangıç derişiminin etkisi de değişmektedir. Örneğin, yüksek metal derişimleri adsorblama için uygun olmamaktadır. Genel olarak metal iyonlarının adsorblanma yüzdeleri sulu çözeltide metal iyonu derişimi arttıkça azalmaktadır (Erdem vd., 2004; Özbey, 2014). Bu sebeple bizim çalışmamızda da başlangıçta hücre yüzeyinde tutulan  $Cd^{2+}$  metali artan konsantrasyon ile birlikte süre ilerledikçe azalan yüzey nedeniyle yani adsorbant miktarının azalmasına bağlı olarak adsorblama oranı düşmeye başlamıştır ve  $Cd^{2+}$  besiyeri içerisinde birikmiştir.

Metal direnci ile ilgili yapılan çalışmada, metal dirençliliği en yüksek olan Kurşun(II) için *P. aeruginosa* BK14, Nikel(II) için *P. stutzeri* BK23 izolatları çeşitli (50, 100, 200, 400 ppm) konsantrasyonlarda metal içeren besiyeri ortamlarında bir gece inkübe edilmiş; 10., 30. dakika ve 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20., 24. saatlerde metal biyobirikim çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada yapılan biyobirikim deneylerinde Kurşun(II) metalinde % 56'sı (114,40 ppm) hücre yüzeyinde, % 28' i (57,20 ppm) hücre içinde olmak üzere toplamda % 84 (174,60 ppm) giderim sağlanmıştır. Nikel(II) metalinde ise % 47 (87,51 ppm) hücre yüzeyinde % 29 (54 ppm) hücre içinde olmak üzere % 76 (141,51 ppm) Kurşun ve Nikel metali giderim sağlanmıştır. Kurşun(II) metal iyonlarının Nikel(II) iyonlarına oranla daha fazla hücre yüzeyine tutunmuş olması hücre duvarında bulunan fonksiyonel protein gruplarının  $Pb^{+2}$  iyonuna bağlanma yeteneğinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da canlılar için toksik etkiye sahip Kurşun(II) ve Nikel(II) metalleri ile atık suda giderim ve biyobirikim deneyleri yapılmıştır (Keloğlu, 2017). Yapılan deneysel

çalışmalar sonucunda kurşun metalinin hücre yüzeyinde birikiminin paralel olduğunu göstermektedir.

Hussein ve ark., (2004), *Pseudomonas* bakterilerinin Cr, Cu, Cd ve Ni metallerini biyosorbsiyon kapasitelerini araştırmışlar. 1, 2, 5 ve 10 mmol/L konsantrasyonda metal uygulayıp biyosorpsiyon kapasiteleri karşılaştırılmış ve sonuçta, maksimum adsorbsiyon kapasitesi Ni>Cd>Cu>Cr olduğunu kaydetmişlerdir (Hussein vd., 2004).

Chang ve ark. (1997) yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa* PU21 'nın ağır metal biyosorbsiyonunu araştırmışlardır. Yapılan çalışmada  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  metallerinin farklı pH (3-6) değerlerinde biyosorbsiyonu araştırmışlardır. Üç metalin biyosorbsiyon kapasiteleri karşılaştırıldığında en iyi giderimi  $Pb^{2+}$  ortamında gerçekleştirdiği vurgulamışlardır (Chang vd., 1997).

Congeevaram ve ark. (2007), ağır metal dirençli mantar ve bakteri izolatları ile krom ve nikel biyosorbsiyonu çalışmışlardır. pH (3-11) arasında Cr  $100 \text{ mg l}^{-1}$  konsantrasyonda, Ni  $50 \text{ mg l}^{-1}$  konsantrasyonda uygulandığında, bakterilerde maksimum giderim pH 7'de Cr % 90 Ni % 55 oranında adsorbsiyon olduğu sonucuna varmışlardır. Sonuçta bir mantarın  $10.000 \text{ mg l}^{-1}$  kromun toksisitesini tolere ettiğini bildirmişlerdir (Congeevaram vd., 2007).

Lo'pez ve ark. (2000), *P. fluorescens* 4F39 ile pH'nın nikel ve diğer ağır metallerin biyosorpsiyonu üzerine etkisini çalışmışlar ve Ni>Hg>U>As>Cu>Cd>Co>Cr>Pb metal katyonlarından metal birikim affinitesi göstermektedir (Lo'pez vd., 2000).

Matyar ve Akkan (2010) yaptığı İskenderun Körfezi'ndeki üç farklı bölgeden izole ettiği bakterilere bu çalışmada altı ağır metalin direnç analizini yapmışlardır. *Pseudomonas* izolatlarının metal dirençliliği Cu >Cd >Mn >Zn >Cr >Pb şeklinde iken; Cu % 75.4, Cd % 56.5, Mn % 44.9, Zn % 41.3, Cr % 31.9, Pb % 7.2 metallerine bu yüzdelerde direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Matyar ve Akkan, 2010).

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda *P. aeruginosa*'nın  $Pb^{2+}$  için MIC değerini 1000 ppm olarak tespit ederken,  $Cd^{2+}$  için MIC değerini 100 ppm olarak kaydedildi. Hassan ve ark. (2008) yaptığı çalışmada ise *Pseudomonas* spp.'nin altı izolatında çeşitli ağır metaller uygulamışlar. *P. aeruginosa* ASU 6a izolatının Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) sırasıyla  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,

$Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  için 6.3, 5.9, 6.8, 9.2, 5.8, 4.4 ve 3.1 mM bulunmuştur. Yapılan çalışmalar ağır metallerin *Pseudomonas* spp. izolatlarına karşı toksisitesi,  $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$ ; bu yüzden kurşun, kadmiyum ve krom  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ dan daha toksiktir (Hassan vd., 2008).

Chakraborty ve Das (2014), *P. aeruginosa* JP-11 aerobik koşullarda  $CdCl_2$  metalinde  $Cd^{2+}$ 'nin MIC değerini 1.250 ppm ve  $Cd^{2+}$  dirençliliğini 1.000 ppm olarak tespit etmişlerdir (Chakraborty vd., 2014).

Hussein – Abdul Saha yaptığı çalışmada *P. aeruginosa*'ya 0.02 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M konsantrasyonda  $MgSO_4$ ,  $MgCO_3$ ,  $NiSO_4$ ,  $CuCl_2$ ,  $CdCl_2$  metalleri uygulamışlardır. Uygulama sonucunda  $CdCl_2$  MIC değeri 0.2 M bulunurken,  $NiSO_4$  kontrol ile kıyaslandığında absorbanı 18. saatte 0.054' den 0.33'e, 24 ve 48. saatlerde 0.4 ve 0.45  $\mu M$  artış olduğu tespit edilmiştir (Hussein ve Abdul Saha, 2008).

Aouada ve ark. (2006) yaptığı deneyde, casamino asit ortamında (CAA), vitrifiye dip kül (VBash) ve bazaltik cam ortamında kısa süreli ve uzun süreli yapılan deneylerde, bakterili ortam pH'sı 7.5, bakterisiz ortam 7.2 olarak ayarlanmıştır. Buna karşılık bazalt ortamında VBash ortamından daha az nikel varken, CAA ortamında nikel konsantrasyonunun değişmeden kaldığını gözlemlemişlerdir. Uzun süreli 174 gün süren deneyde, VBash ortamında nikel konsantrasyonunun ICP-AES cihazında 174 gün sonra büyüme ortamında 18.5  $\mu g$ , bakteri hücrelerinde 4.2  $\mu g$ , biyofilm içerisinde 2  $\mu g$  toplamda 24.7  $\mu g$  nikel tespit edilmiştir. Steril ortamdaki çözülmüş nikel miktarı ise 58  $\mu g$  rapor etmişlerdir (Aouada vd., 2006).

Wang ve ark. 1997 yılında yaptığı çalışmada, yapay deniz ortamında *P. aeruginosa* tarafından  $Cd^{2+}$  metalinin giderimini araştırmışlardır. 0-1-3-5 mM  $Cd^{2+}$  konsantrasyonunda 50 saat sonra  $OD_{600}$  ve pH değerlerini sırasıyla  $OD_{600}$  1.37 – 1.31 – 1.54 – 0.45 ABS; pH 8.5 – 8.5 – 8.3 – 8.1 bulmuşlardır. 140 saat sonra ise  $OD_{600}$  ve pH değerlerini sırasıyla  $OD_{600}$  0.43 – 0.94 – 1.22 – 1.30 ABS; pH 9.1 olarak bulmuşlardır. Ortamdaki  $Cd^{2+}$  giderimi sırasıyla 50 saat sonra 0- % 99 - % 92 - % 14 iken, 140 saat sonra 0 - % 99 olarak kaydetmişlerdir (Wang vd., 1997).

Raja ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada *P. aeruginosa* BC15 suşunun metal dirençliliğini araştırılmıştır. Çalışmada LB, King A ve minimal ortam kullanmışlardır. LB ortamına 0.1 mM, King A ve minimal ortama 0.05 mM konsantrasyonda  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  metalleri uygulamışlardır. BC15 suşunun metallere direnç sırasının  $Pb^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{2+}$  olduğu bulunmuştur.  $Pb^{2+}$

metaline 800 ppm, Ni<sup>2+</sup> 700 ppm, Cd<sup>2+</sup> 500 ppm, Cr<sup>2+</sup> 400 ppm direnç göstermiştir. Bakterinin metal alım kapasitesi biyosorbsiyonu açısından kıyaslandığında, en yüksek biyosorbsiyon kapasitesi % 93 Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> % 65, Cd<sup>2+</sup> % 50 ve Cr<sup>2+</sup> % 30 olduğu gözlemlenmiştir (Raja vd., 2006).

Sonuç olarak evsel ve endüstriyel atıksuların mikroorganizmalar yardımıyla arıtımı, verimlilik ve maliyet açısından avantaj sağlaması sebebiyle giderek önem kazanmaktadır. Bu alanda biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* bu işlem için uygun potansiyele sahip olması ve tutulan metallerin geri kazanımında endüstriyel açıdan fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda; ağır metallerin mikroorganizmalarca gideriminin mümkün olduğu ve en çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile giderimin gerçekleştiği, metallerin mikroorganizmaların enzim ve sekonder metabolit olan pigment üretimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen tüm sonuçların Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji, Biyokimya, Toksikoloji, Çevre biyolojisi ve Çevre Teknolojisi alanlarında temel düzeyde yeni bilgiler sunması beklenilmektedir.



## KAYNAKLAR

Aebi. (1984). H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.

Ahalya, N., Ramachandra, T. V. and Kanamadi, R. D. (2003). Biosorption of Heavy Metals. *Res. J. Chem. Environ.* **7(4)**.

Akar, T., Çabuk, A., Tunali, S., Yamac M. (2006). Biosorption Potential of The Macro- Fungus *Ganoderma carnosum* for Removal of Lead(II) Ions From Aqueous Solutions. *J. Of Environ. Sci. and Health, Part A Toxic/Hazardous Substance & Environmental Engineering.* **41**, 2587-2606.

Akkan, T., Dinçer, S., Kaya, A. (2013). Antibiotic levels and heavy metal resistance in gram-negative bacteria isolated from seawater, Iskenderun Organized Industrial Zone. *Journal of Applied Biological Sciences.* **7 (1)**: 10-14.

Akoğlu A. (2006). *Çiğ Sütte Pseudomonas aeruginosa Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar.* Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Aksu, Z., Dönmez, G. (2000). The use of molasses in copper (II) containing wastewaters effects on growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry.* **36**, 451-458.

Aksu, Z. (2001). Equilibrium and Kinetic Modelling of Cadmium (II) Biosorption by *C. vulgaris* in a Batch System. *Effect of Temperature. Sep. Purif. Technol.* **21**, 285-294.

Alexei, B., Songhua, L. and Lewis, K. (2000). A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **44**, 640–646.

Anonim. (2015e). <http://nkfu.com>, erişim tarihi: 10.08.2015

Anonymous, (1995). CODEX General Standard for Food Additives, 192.

Aouada, G., Crovisier, J. L., Geoffroy, V. A., Meyer, J. M., Stille, P. (2006). Microbially-mediated glass dissolution and sorption of metals by *Pseudomonas aeruginosa* cells and biofilm. *J. Hazard. Mater.* **B136**, 889–895.

Artola, A. and Rigola, M. (1992). Selection of optimum biological sludge for zinc removal from wastewater by a biosorption process. *Biotechnol Lett.* **14(12)**, 1199-1204.

Ata M. Y. (2013). Mikroorganizmalarda Pigment Üretimi ve Eczacılıkta Kullanımı. Bitirme ödevi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Aydemir, B., Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Vet J.* **2(2)**, 56-60.

Aydın F. (2001). *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması*. Uzmanlık tezi, A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.

Ayhan, K. (2000). Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını*, 522.

Aytan E. (2009). *Vitreoscilla Hemoglobin Geninin Erwinia herbicola'ya Klonlanması ve L-Dopa Üretimi Üzerine Etkisi*. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Babtie, A., Tokuriki, N., Hollfelder, F. (2010). What makes an enzyme promiscuous?. *Current Opinion in Chemical Biology*. **14(2)**, 200–207.

Baldwin, D. R., Marshall, W. J. (1999). Heavy metal poisoning and Its laboratory investigation. *An of Clin Biochem*. **36**, 2567-3000.

Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, F. J., Tomasini, A., Mejia, A. (2005). Secondary Metabolites Production by Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. **1(1)**, 1-6.

Baştürk S. (2005). *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması*. Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

Blais, F., Tyagi, R. O. and Auclair (1993). Bioleaching of metals from sewage sludge. Effects of temperature. *Water Res*. **27(1)**, 111-120.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248–254.

Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., Lebeau, T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*. **74**, 280–286.

Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Gaëtan, M. L. A. and Schalk, I. J. (2010). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol. Repor*. **2(3)**, 419–425.

Brady, D., Duncan, J. R. (1994). Bioaccumulation of Metal Cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **41**, 149-154.

Brady, J. and Tobin, M. J. (1995). Binding of hard and soft metal ions to *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Biotechnology*. **9**; 791-796.

Breierová, E., Vajczikova, I., Sasinková, V., Stratilová, E., Fišera, M., Gregor, T., and Šajbidor, J., (2002). Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **57(7-8)**, 634-639.

Bruins, M. R., Kapil, S. and Oehme, F. W. (2000a). *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and Groundwater Aerobic Bacteria with Pathogenic and Biodegradation Properties. *Ecotox. Environ. Safe*. **47**, 105-111.

Bruins, M. R., Kapil, S. and Oehme, F. W. (2000b). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotox. Environ. Safe*. **45**, 198-207.

Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent *pseudomonads*. *Fems Microbiol Rev*. **10(3-4)**, 209-28.

Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G. B., Andremont, A. and Ruimy, R. (2003). Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **185(24)**, 7222-30.

Caparanga, A. R., Balatbat, A. S. and Tayo, L. (2017). Effects of heavy metals ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Cr}^{6+}$ ) on low-level energy generation in a microbial fuel cell. *Materials Science and Engineering (MSCE)*. **206**, 012-031.

Castric, A. P. (1974). Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol*. **21**, 613-618.

Chakraborty, J., Das, S. (2014). Characterization and cadmium-resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **14(7)**, 1356-3308.

Chang, B. V., Wu, W. B. and Yuan, S. Y. (1997). Biodegradation of Benzene, Toluene and other aromatic compound by *Pseudomonas sp.* D8. *Chemosphere*. **35**, 2807-2815.

Charlwood, F. C., Billowes, J., Campbell, P., Cheal, B., Eronen, T., Forest, D. H., Fritzsche, S., Honma, M., Jokinen, A., Moore, I. D., Penttilä, H., Powis, R., Saastamoinen, A., Tungate, G., Äystö, J. (2010). Ground state properties of manganese isotopes across the N=28 shell closure. *Physics Letters B*. **690(4)**, 346–351.

Cherubini, A., Ruggiero, C., Morand, C., Lattanzio, F., Dell'aquila, G., Zuliani, G., Di, I. A., Andres-Lacueva, C. (2008). Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem*. **15**, 1236-1248.

Chiadò, A., Varani, L., Bosco, F. and Marmo, L. (2013). Opening Study on the Development of a New Biosensor for Metal Toxicity Based on *Pseudomonas fluorescens* Pyoverdine. *Biosensors*. **3**, 385-399.

Cochrane, C. G. (1991). Cellular injury by oxidants. *Am J Med*. **56**; 23-30.

Collier, L., Balow, A. and Sussman, M. (1998). Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections. *Systematic Bacteriology*. **2**, 1091-1118.

Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin M., Thamaraiselvi K. (2007). Biosorption of chromium and nickel by heavy metalresistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Mater.* **146**, 270–277.

Cornu, J. Y., Elhabiri, M., Ferret, C., Geoffroy, V. A., Jezequel K., Leva Y., Lollier M., Schalk, I. J.,Lebeau, T. (2014). Contrasting effects of pyoverdine on the phytoextraction of Cu and Cd in a calcareous soil. *Chemosphere.* **103**, 212–219.

Costa, A. C. A., and Leite, S. G. F. (1991). Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorellahomosphaera*. *Biotechnol Lett.* **13(8)**, 559-562.

Coşan, D. T., Dal, A., Soyocak, A., Çolak, E., Çiçek, A., Kurt, H. (2017). Kadmiyum Toksisitesi Oluşturulan Sıçanlarda Tannik Asitin, Ağır Metal Giderimi ve Bazı Biyokimyasal Değerler Üzerine Etkisinin Araştırılması. *Kocatepe Medical Journal.* **18**, 146-153.

Cox, C. D. (1986). *Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin.* *Infect Immun.* **52(1)**, 263-70.

Crist, R, Oberholsen, K., Norman, S., Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell wallas. *Environmental Science and Technology.*

Çabuk, A., Akar, T., Tunali, S., Tabak, O. (2006). Biosorption Characteristics of *Bacillus* sp. ATS-2 Immobilized in Silica Gel for Removal of Pb (II). *J. Hazard. Mater.* **136**, 317-323.

Çardak, M., Altuğ, G. (2016). Türkiye Denizlerinde Ağır Metal Tuzlarına Dirençli Bakteriler. Türkiye Denizleri Bakterilerinin Biyoteknolojik Kullanımı Çalıştayı Bildiriler Kitabı Edit. G.Altuğ. 88-99.

Daly, J. A., Boshard, R. and Matsen, J. M. (1984). Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **19(6)**, 742-3.

Dao, K. H. T., Hamer, K. E., Clark, C. L. and Harshman, L. G. (1999). Pyoverdine Production By *Pseudomonas aeruginosa* Exposed To Metals or An Oxidative Stress Agent. *Ecolog. Appl.* **9(2)**, 441–448.

Das, P., Ma, L.Z. (2013). Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **85**, 278-283.

Davies, S. J., Reichardt-Pascal, S.Y., Vaughan, D., Russel, G.I. (1995). Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol.* **3**, 348-354.

Demain, Arnold L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiol.* **1**, 259-264.

Demain, Arnold L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463.

Deredjian, A, Colimon, C., Brothier, E., Favre-Bonte, S., Cournoyer, B., Nazaret S. (2011). Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology.* **162**, 689–700.

Dietrich L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen A., Whiteley M. and Newman D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiol.* **61(5)**, 1308–1321.

Dikici, A. (2009). Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar Ve Mekanizmaları. *Journal. of Food Technol.* **4(3)**, 59-68.

Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59.

Diril H., (2013). Romatoid Artrit ve Sistemik Sklerozlu Hastalarda Nitrik Oksit, Malondialdehit Düzeyleri, Ksantin Oksidaz ve Süperoksit Dismutaz Aktiviteleri. Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

Dönmez, A. E., Kalay., M, Özkan., F., Koyuncu, C.E. (2006). FMC ve malahat yeşili sağıltım dozlarının *Oreochromis niloticus*'un bazı kan parametrelerinde meydana getirdiği değişimler. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi*, **23**, 61-64.

Dursun, A., Uslu, G., Tepe, O. (2003). A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions growing *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal.* **2**, 87-92.

Duthie, G. G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* **2**, 51-62.

Dündar, Y., Aslan, R. (2005). Yaşamı kuşatan ağır metal kurşunun etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi.* **6**, 1-5.

Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and Metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 687-692.

Elliot, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* **53(2)**; 46-48.

Erdem, E., Karapinar, N., Donat, R., (2004). The Removal of Heavy Metal Cations by Natural Zeolites. *Journal of Colloid and Interface Science*, **280**, 309-314.

Erdem, B. (2013). Mikrobiyal Sideroforlar ve Biyoteknolojideki Uygulama Alanları. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Sciences.* **3(8)**, 77-88.

Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. and Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas*

*aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* **172**, 884-900.

Evgen E. (2012). *Pseudomonas Cinsi Bakterilerde Hezavalent Krom İndirgeme Üzerine Ağır Metallerin Etkisi*. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Favero, N., P. Costa, M. L. Massimino (1991). In vitro uptake of Cadmium by *Basidiomycetes (PleurotusCl5 treatus)*. *Biotechnol Lett.* **13(10)**, 701-704.

Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Blaghen, M. (2000). Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Current Microbiology.* **41**,151–156.

Florea, A. M., Büsselberg, D. (2006). Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metalcompounds. *Biometals* **19**, 419-427.

Fourest, E., Roux, J. C. (1992). Heavy Metal Biosorption by Fungal Mycelial by-Products: Mechanisms and Influence of pH. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **37**, 399-403.

Ganesan, V. (2008). Rhizoremediation of Cadmium Soil Using a Cadmium-Resistant Plant Growth-Promoting Rhizopseudomonad. *Curr. Microbiol.* **56**, 403–407.

Garbisu, C. and Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection.* **3**, 58-66.

Gee, W. L., Daniel, J. H., Huimin, R. and Fansheng, K. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine.* **10**, 599-606.

Gerene, M. D., Shankar, S. I., Krzysztof, J. R., Yunxia, O'M., George, T. R. and Bradley, E. B. (2003). *Phenazine-1-carboxylic acid, asecondary metabolite of Pseudomonas aeruginosa, alters expression ofimmunomodulatory proteins by human airway epithelial cells.* *Am J PhysiolLung Cell Mol Physiol.* **285**, 584-592.

Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H. and Robinson, J. B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.* **181(5)**, 1623-9.

Goyer, R. A., Clarkson, T. W., Toxic effects of metals, *In Toxicology, The Basic Science of Poisons*, Klaassen CD (ed.), McGraw-Hill Co., New York, pp.811-867., 2001.

Göksungur, Y., Üren, S., ve Güvenç, U., (2003). Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass. *Turkish Journal of Biology.* **27(1)**, 23-29.

Guo, Y., Zheng, H., Yang, Y., Wang, H. (2007). Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P34 Isolated from Soil in Beijing as a Potential. *Biocontrol Agent.* **55**, 247-253.

Gupta, C. P., Sharma, A., Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K. (2001). Effect of metal ions on growth of *Pseudomonas aeruginosa* and siderophore and protein production. *Indian Journal of Experimental Biology*. **39**, 1318-1321

Gupta, A., Kumar, M. and Goel, R. (2004). Bioaccumulation Properties of Nickel-, Cadmium-, and Chromium-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* NBRI 4014 at Alkaline pH. *Biological Trace Element Research*. **99(1-3)**, 0269.

Gupta, D. G. (2010). *Isolation and Characterization of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Different Environments*. Master Of thesis, Rajasthan University of Veterinary and Animal Sciences, Bikaner.

Guzzo, J., Diorio, D. C., Alexander, D. C. and DuBow, M. S. (1999). Toward understanding metal stress in environment microbial flora. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Canada.

Gülcan S. (2006). Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Han, S., Seo, R., Chung, Y. (1992). Growth and copper resistance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing a metallothionein gene. *Biotechnol. Lett.* **14(1)**, 7-11.

Haroun, A. A., Kamaluddeen, K. K., Alhaji, I., Magaji, Y. and Oaikhen, E. E. (2017). Evaluation of Heavy Metal Tolerance Level (MIC) and Bioremediation Potentials of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Makera-Kakuri Industrial Drain in Kaduna, Nigeria. *European Journal of Experimental Biology*. **7(5)**, 2248-9215.

Harrison, J. J., Turner, R. J. and Ceri, H. (2005). Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **7(7)**, 981–994.

Hassan, S. H. A., Abskharon, R. N. N., Gad El-Rab, S. M. F. and Shoreit, A. A. M. (2008). Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *J. Microbiol.* **48**, 168–176.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998a) Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. *Bioresource Technology*. **64**, 7-15.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998b). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*. **65**, 73-82.

Hassett, D. J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D. E., and Cohen, M. S. (1992). Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Pyocyanin: Mechanisms of Resistance, Antioxidant Defenses, and Demonstration of a Manganese-Cofactored Superoxide Dismutase. *Infection and Immunity*. **60**, 328-336.

Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Nielsen, T. T., Givskov, M. and Molin, S. (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa*

biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cellto- cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(4)**, 2008-17.

Hu, H. (2000). Exposure to metals. *Occupational and Environmental Medicine*, **27**, 983-996.

Hussein, H., Moawad, H. and Farag, S. (2003). Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *Arab J. Biotech.* **7(1)**, 13-22.

Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K. and Moawad, H. (2004). Biosorption of Heavy Metals from Waste Water Using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotech.* **7(1)**, 38-46.

Hussein, K ., Abdul-Sada. (2008). A Resistance Study of *Pseudomonas aeruginosa* to Heavy Metals. *Medical Journal of Babylon.* **5**.

Ilgaz, A. (1999). Özel Mikrobiyoloji. *Medison Yayınları* 91-96. Ankara.

Ilijin, L., Mataruga, P., Radojicic, V., Lazarevic, R. J., Vlahovic, Nenadovic, V. M., Mrdakovic, M. (2010). Effect of cadmium on protocerebral neurosecretory neurons and fitness components in *Lymantria dispar* L. *Folia Biologica* (Krakow) **58**, 91-99.

Ines, A., Lucila, J. B., Pajara, M., Eraso, A. (1985). Pyoverdine Production by *Pseudomonas fluorescens* in Synthetic Media with Various Sources of Nitrogen. *J. General Microbiol.* **131(325)**, 1-3254.

Ingram, J. M. and Blackwood, A. C. (1970). *Microbial production of phenazines.* *Adv. Appl. Microbiol.* **13**, 267-282.

Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K. (2012). Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. *Scientific reports.*

Işık A. (2017). *Van'da Tüketime Sunulan İnci Kefali (Alburnus Tarichi, Guldenstädt 1814) ve Bazı Balık Türlerinde Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması.* Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.

Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B. (2007). Trace Elements from Soil to Human. *Springer Berlin Heidelberg New York.* 1-519.

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. (2003). Metallerin çevresel etkileri-I. *Metal Dergisi.* **136**, 47-53.

Kalita, D., Joshi, S. R. (2017). Study on bioremediation of Lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat. *Biotechnology Reports.* **16**, 48-57.



- Kang, So-Y., Lee, J., Kima, K. W. (2007). Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Eng. J.* **36**, 54-58.
- Kantarıcı, G. (1992). Balıklı besiyerinin *Pseudomonas* pigmentlerini üretme yeteneği. *Mikrobiyoloji Bülteni.* **26**, 281-283.
- Karatuna, O. and Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi.* **38**, 42-51.
- Kargın, F., Erdem, C. (1991). Accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle of *Cyprinus carpio*. *Doğa Tr J of Zool.* **15**, 306-314.
- Karihtala, P., Soini, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* **115**, 81-103.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech.* **36**; 703-725.
- Kayar E. (2009). *İzmir'de Marketlerde Satışa Sunulan Et ve Et Ürünlerinde Pseudomonas aeruginosa Aranması ve Tanımlanması*. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Keloğlu B. (2017). *Atık Sulardan İzole Edilen Pseudomonas Spp.'lar İle Kurşun(II) Ve Nikel(II) Ağır Metallerinin Giderimi*. Yüksek lisans tezi, Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir.
- Kerry, E. (1993). Bioremediation of experimental petroleum spills on mineral soils in the vestfold hills, Antarctica. *Polar Biol.* **13**, 163-170.
- Kılıç, M. and Bozkaya, O. (2017). Çiğ Süt Örneklerinde Ağır Metal ve Metal Kontaminasyonlarının Belirlenmesi ve Sağlık Üzerine Etkisi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi.* **16(1)**.
- Koca, N., Karadeniz, F. (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*.
- Koçoğlu F. (1994). *Sivas Yöresinde Çeşitli Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas Türleri ve Bunların Bazı Antimikrobeyellere İn-Vitro Duyarlılıkları*. Uzmanlık tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Sivas.
- Krohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Delden, C. and Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182(21)**, 5990-6.
- Kratochil and Volesky. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnology.* **16**, 291-300.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* **27(4)**; 969-978.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*. **10**, 12.

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Ader, F., Courcol, R., Guery, B. P., Faure, K. and the Group, P. (2008). Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. **14(4)**, 337-343.

Leisinger, T. and Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent *pseudomonads*. *Microbiol Rev*. **43(3)**, 422-42.

Lehay, J. G. and Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Res*. **54(3)**, 305-315.

Lewis, D., Kiff, R.J. (1988). The removal of heavy metals from aqueous effluents by immobilized fungi biomass. *Environ. Technol. Lett*. **9**, 991-998.

Lo'pez A., La'zaro, N., Priego, J. M. and Marque's, A. M. (2000). Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *J. Indust. Microbiol. & Biotechn.* **24**, 146-151.

Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R. (1984). Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. *Gen. Mikrobiol.* **130**, 53-62.

Madigan, M. and Parker. (1997). *Biology of Microorganisms*. Southern Illinois University. Eighth Edition.

Mandelbaum, R. T., Allan, D. L. and Wackett, L. P. (1995). Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1451-1457.

Mann, H. (1990). Biosorption of heavy metals by bacterial biomass (pp. 93-138). In: B.Volesky (ed.), CRC. Press Boca Raton, FL.

Matyar, F, Akkan, T, Uçak, Y, Eraslan, B. (2009). *Aeromonas and Pseudomonas* Antibiotic and Heavy Metal Resistance Species from Iskenderun Bay, Turkey (Northeast Mediterranean Sea), *Environ Monit Assess.* 1051-1

Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y., Eraslan, B. (2010). *Aeromonas and Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (Northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess.* **167**,309-320.

Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. and Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J.Bacteriol.* **183(21)**, 6454-65.

McEldowney, S. (2000). The Impact of Surface Attachment on Cadmium Accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiology Ecology*. **33**, 121-128.

- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for Erythrocyte hemoglobin (Hemocytoglobin). *The J. Biol. Chem.* **244**(22), 6049-6055.
- Meyer, J. M. and Abdallah, M. A. (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens* : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *J. Gene. Microbiol.* **107**, 319-328.
- Mickle, D. A., Weisel, R. D. (1993). Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol.* **9**, 89-93.
- Muneer, B., Iqbal, M. J., Shakoory, F. R. and Shakoory, A. R. (2016). Isolation, Identification and Cadmium Processing of *Pseudomonas aeruginosa* (EP-Cd1) Isolated from Soil Contaminated with Electroplating Industrial Wastewater. *Pakistan J. Zool.* **48**(5), 1495-1501.
- Murathan, A., Hıdıroğlu, B., Murathan, A. S. (2008). Atık sulardaki nikel iyonunun dolgulu kolonlarda adsorbsiyonla giderimi. *Kafkas Üniv. Fen ve Müh. Derg.* **1**(1), 9-12.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H. (1995). *Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition.* ASM Pres, 1327-1341.
- Naik, M. M., Dubey, S.K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **98**, 1-7.
- Nawar, W. W. (1996). Lipids. (pp: 225-319) In: O.R. Fennema (Ed),. *In Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York.
- Nies, D. H. and Silver, S. (1995). Ion Efflux Systems Involved in Bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.* **14**(2), 186-199.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *M. Biotechn.* **51**, 730-750.
- Norman, R. S., Moeller P., McDonald, T. J. and Morris, P.J. (2004). Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4004-4011.
- Norris, P. R. and Kelly, D. P. (1979). Accumulation of metals by bacteria and yeasts. *Dev. Ind. Mikrobiol.* **20**, 299-308.
- Onbaşılı D. (2006). *Çevredeki Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi.* Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Orbitbiotech. (2006). [/Fermentation, Food Microbiology/Pseudomonas aeruginosa: Isolation and identification \(28.12.2018\) internet sitesi.](#)
- Özan M. (1996). *Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile Pseudomonas aeruginosa 'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar.* Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Özbey E. (2014). *Deinococcus radiodurans* ve Rekombinantlarının Uv-C, Ağır Metal Dirençliliği ve Biyosorpsiyon Yeteneği. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Özbolat, G., Tuli, A. (2016). Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. **25(4)**, 502-521.

Özcan D. (2011). *Vitreoscilla Hemoglobin Geni Taşıyan Stres Altındaki Rekombinant Pseudomonas aeruginosa'da Piyosiyenin Üretimi*. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Özdilek H. G. (2002). *Distribution and transport of copper and lead in the Blackstone River, Massachusetts*. Worcester Polytechnic Institute. PhD Thesis, USA.

Özkarlı M. (2011). *Pamukkale Termal Sularından İzole Edilen Bacillus licheniformis'ten Katalaz Enziminin Klonlanması, Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Özsoy, M. F., Öncül, O., Pahsa, A., Erdem, H. ve Emekdaş, G. (2001). Etil Alkol, Povidon İyot ve Benzalkonyum Klorürün *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarına Karşı Etkinliği. *Klinik Dergisi*. **14(1)**, 30–32.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. and Vega, M. (2003). Biosorption of Cadmium, Copper, Lead and Zinc by Inactive Biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 26-32.

Pelczar, J. M and Reid, D. R. (1958). Microbiology. *Kogakusha Company Ltd.*, 125, Tokyo.

Preetha, B. ve Viruthagari, H., (2006). Bioaccumulation of chromium (VI), copper (II), Nickel (II) ions growing *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*. **703**, 00361- 5.

*Pseudomonas aeruginosa* Infection in NCFBE Patients Leads to Higher Healthcare Costs, Study Finds November 21, 2017.

Raja, C. E., Anbazhagan, K. and Selvam, G. S. (2006). Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **22**, 577–585.

Rajendran, P., Muthukrishnan, J. And Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*. **41**, 935-944.

Ran, H., Hassett, D. J. and Lau, G. W. (2003). Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Pnas*. **100 (24)**, 14315–14320.

Rao, M. P. N., Xiao, M. and Li, W. J. (2017). Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology*. **8**, 1113.

Rashid, H. M. and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pnas.* **97**,4885-4890.

Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D. X., Burkhardt, S. (2001). Free radical mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* **939**, 200-215.

Reiter, R. J. (1995). Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J.* **9**, 526-533.

Ross, D. (1988). Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther.* **37**, 231-249.

Sağ, Y., Açikel, Ü., Aksu, Z., Kutsal, T. (1998). İkili metal karışımlarından Krom (VI), Demir (III), Bakır (II) iyonlarının *R. arrhizus* ve *C. Vulgaris*'e yarışmalı biyosorpsiyonu, *J. Engin. and Environ. Sci.* **22**, 145-154.

Sağlam, N., Cihangir, N. (1995). Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi.* **11**, 157-161.

Samanta, S., Thavasi, R. and Jayalakshmi, S. (2008). Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *J. Microbiol.* **3(3)**, 122-128.

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. and Bestervelt L. L. (2012). Microbial siderophores: a mini review. *J.Ba. Microbiol.* **52**, 1-15.

Sakuragi, Y. and Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189(14)**,5383-5386.

San N. O. (2007). *Ağır Metal ve Boyar Madde İçeren Atıksuların Rhodotorula Sp. ile Arıtımı*. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Sandrin, T. R. and Maler, R. M. (2003). Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants. *Environment Health Perspectives.* **111(8)**, 1093-1101.

Sang, E. O., Sedky, H. A., Jin, J. H. (2009). Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *World J Microbiol Biotechnol.* **25**, 1771-1778.

Sar, P., Kazy, S. K., Asthana, R. K., Singh, S. P. (1998). Nickel Uptake by *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Modifying Factors. *Current Microbiology.* **37**,306-311.

Schwarzer, C., Fu, Z., Fischer, H., Machen, T. E. (2008). Redox-independent activation of NF-kappaB by *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin in a cystic fibrosis airway epithelial cell line. *J. Biol. Chem.* **283(40)**, 27144-53.

Scott, A. and Karonjkar, A. M. (1992). Repeated cadmium biosorption by regenerated *Enterobacter aerogenes* biofilm attached to activated carbon. *Biotechnol. Lett.* **14(8)**, 737-740.

Sheng, D., Gao, G., Tian, B., Xu, Z., Zheng, Z., Hua, Y. (2005). RecX is involved in antioxidant mechanisms of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Fems Microbiol. Lett.* **244(2)**, 251–257.

Shukla, K. P., Singh, N. K., Sharma, S. (2010). Bioremediation: developments. *Curr. Pract. Perspect. J. Genet. Eng. Biotechnol.* 1–20.

Silver, S. (1998). Genes for all Metals – A bacterial View of the Periodic Table the 1996 Thom Award Lecture., *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **20**, 1-12.

Singh, S. K., Juwarkar A. A., Mudhoo, A. and Dubey, K. V. (2012). Remediation of chromium-contaminated soils using *Pseudomonas aeruginosa* Strain BS2. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.* **6(2)**, 100-105.

Sinha, S., and Mukherjee S. K. (2008). Cadmium-Induced Siderophore Production by a High Cd-Resistant Bacterial Strain Relieved Cd Toxicity in Plants Through Root Colonization. *Curr Microbiol.* **56**, 55–60.

Steinberger, R.E. and Holden, P.A. (2005). Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl. Environ Microbiol.* **71(9)**, 5404-10.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406(6799)**, 959-964.

Supriya, B. and Nutan, M. (2010). Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs. *Pharmacognosy.* **4(7)**, 12-26.

Şengöz, G., Karabela, Ş., Durdu, Y., Yaşar, K., Yıldırım, F., Bakar, M., Koldaş, M. Ve Nazlıcan, Ö. (2005). *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerde İsepanisin Direncinin Araştırılması ve Diğer Aminoglikozid Dirençleriyle Karşılaştırılması. *Klimik Dergisi.* **18(1)**, 41-44.

Terzioğlu, K., Türe, H., Tunca, E. (2017). Manyetik aljinat/perlit kompozit mikrokürelerin karakterizasyonu ve sulu çözeltiden Pb (II) ve Ni (II) iyonlarının uzaklaştırılmasında optimum şartların belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* **21(6)**, 1483-1496.

Theodorus, P., Akerboom, M., Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **77**, 373- 383.

Thrane, A. S., Skehan, J. D., Thrane, P. S. (2007). A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses.* **68**, 1363-1370.

Ting, Y. P., Lawson, F., and Prince, I. G. (1989). Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*: Part 1. Individual Ion Species. *Biotech. and Bioeng.* **34**, 990-9.

Tobin, M., Coper, D. G. and Neufeld, R. (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Mikrobiol.* **47**, 821-824.

Torlak Z. (2014). *Ratlarda Deneysel Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Modelinde Ozon Tedavisinin Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması*. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Tortora, J. G., Funke, R. B. and Case, L. C. (1992). Microbiology. *The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc.* 523, California.

Töreci, G.Ü. (1981). *Pseudomonas aeruginosa'nın pigmentleri toksinleri ve enzimleri*. II. Ulusal Kükem Kongresi, 76-91.

Tunali, S., Çabuk, A., Akar, T. (2006). Removal of Lead and Copper Ions from Aqueous Solutions by Bacterial Strain Isolated from Soil. *Chem. Eng. J.* **115(3)**, 203-211.

Türkmen A. (2003). *İskenderun Körfezi'nde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taç istiridyesi'nde (Spondylus Spinosus Schreibers, 1793) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma*. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

Türkman, A., Aslan, Ş., Ege, İ. (2001). Doğal zeolitlerle atıksulardan kurşun giderimi (Lead Removal from Wastewaters by Natural Zeolites. *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, **3(2)**, 13-19.

Tsezos, M. and Volesky, B. (1981). Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering.* **3**, 583-604.

Ulusoy S. (2007). *Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması*. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Veglio, F., Beolchini, F. (1997). Removal of Metals by Biosorption. A Review. *Hydrometallurgy.* **44**, 301-316.

Virág, L., Szabó, C. (2002). The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* **54**, 375-429.

Volesky, B. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.

Wa'ad, M. R., Ibraheem, A., Rahman, L. (2010). In Vitro Study of the Swarming Phenomena and Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Human Infections. *European Journal of Scientific Research.* **47(3)**, 405-421.

Wang, C. L., Michels, P. C., Dawson, S. C., Kitisakkul, S., Baross, J. A., Keasling, J. D. and Clark, D. S. (1997). Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Appl Environ. Microbiol.* **63(10)**, 4075–4078.

Wilson, S. G. and Miles, A. A. (1964). Principles of Bacteriology and immunity. *Edward Arnold (Publishers) Ltd.* London, 636-643.

Wong, P. K. and Kwok S. C. (1992): Accumulation of nickel ion ( $Ni^{+2}$ ) by immobilized cells of *Enterobacter* species. *Biotechnol Lett.* **14(7)**, 629-634.

Yalçın M. S. (2007). *Hepatitli hastalarda antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) aktivite düzeylerinin belirlenmesi.* Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Yalçın S. (2016). *Atık Sulardan İzole Edilen Pseudomonas Spp.'lerin Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi.* Yüksek lisans tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir.

Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, G. (1993). Studies on metal resistance system in *Kluyveromyces marxianus*. *Biological Trace Element Research.* **38**, 117-127.

Yıldırım O. (2017). *Ülkemizde Geleneksel Tedavilerde Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Tohumlarında Ağır Metal Ve Mineral Besin Element Tayini.* Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Yurdakul, İ., Kalınbacak, K., Terzi, D., Peker, R. M. (2017). Ağır Metallerin Tarla Şartlarında Buğday (*Triticum Aestivum* L.) Verimine Toksik Etkisinin Belirlenmesi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi.* **6(2)**, 580-593.

Yu, B., Zhang, Y., Shukla, A., Shukla, S., Dorris, S. (2000). The Removal of Heavy Metal from Aqueous Solutions by Sawdust Adsorption-Removal of Copper. *J. Hazard. Mater.* **80**, 33-42.

Yuuka, C., Kazuhiro, I., Jae, M. L., Takahiro, K., Chisa, Y. A. (2008). Inactivation of pyocyanin synthesis genes has no effect on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori*. **278**, 101–107.

Yüce M. (2007). *Aritımı Yapılmamış Atıksulardan İzole Edilen Mikroorganizmalarla Reactive Black B Ve Krom(VI) Giderimi.* Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Zhou, L. and Kiff, R. J. (1991). The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass. *Chem. Tech. Biotechnol.* **52**, 317-330.



## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı** : Duygu (ÖZCAN) GÜÇLÜ  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : MALATYA - 11.06.1985  
**E-Posta** : [dyozcan81@gmail.com](mailto:dyozcan81@gmail.com)  
**Önlisans** : Malatya Meslek Yüksekokulu İnşaat Teknikerliği  
(Malatya, 2012-2014) - Atatürk Üniversitesi Çocuk Gelişimi (2017-2019)  
**Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji  
Bölümü, (Malatya, 2005-2009)  
**Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Anabilim Dalı, (Malatya, 2009-2011)  
**Doktora** : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Anabilim Dalı, (Malatya, 2011-2019)

## BİLİMSEL FAALİYETLER

1. Suç ve Genetik (Seminer, 2010)
2. Ozon ve Bilim (Seminer, 2011)
3. Türkiye Genom Projesi (Seminer, 2012)
4. İnönü Üniversitesi 7.Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi
5. İnönü Üniversitesi Evrim Sempozyumu
6. Denizli 20.Uluslararası Biyoloji Kongresi
7. Ege Üniversitesi 21.Uluslararası Biyoloji Kongresi

## MESLEKİ DENEYİM

1. Malatya Kürecik İlköğretim Okulunda Vekil Öğretmenlik (2009-2010)
2. Malatya Parantez İlköğretim Dershanesinde Fen Bilgisi Öğretmeni (2012-2013)
3. 14 Mart Anadolu Sağlık Meslek Lisesi Biyoloji Öğretmeni (2013-2014)
4. Özel Uğur Hazırlık Lisesi Biyoloji Öğretmeni (2014-2015)

## YAYINLAR

1. Kahraman, H., Aytan, E., Kurt, A., Özcan, D., ‘‘Phenazine Production in The Presence of Heavy Metals in Recombinant Erwinia herbicola Bearing the Hemoglobin Gene’’, *Journal of Natural and Applied Sciences*, 2013, 17:2.2.