

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

***Deinococcus radiodurans* ve REKOMBİNANTLARININ UV-C, AĞIR METAL  
DİRENÇLİLİĞİ ve BİYOSORPSİYON YETENEĞİ**

**ELİF ÖZBEY**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA  
EYLÜL 2014**

**Tezin Başlığı:** "Deinococcus radiodurans ve Rekombinantlarının UV-C, Ağır Metal Dirençliliği ve Biyosorpsiyon Yeteneği"

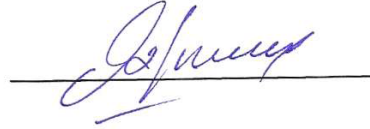
**Tezi Hazırlayan:** Elif ÖZBEY

**Sınav Tarihi:** 04.09.2014

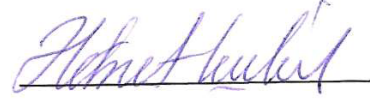
Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri:**

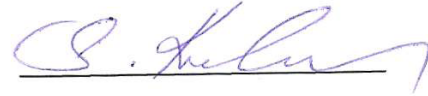
Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA



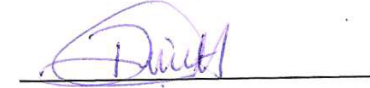
Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL



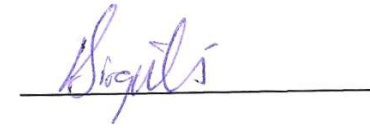
Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN



Prof. Dr. Dilek ASMA



Doç. Dr. Birgül ÖZCAN



Prof. Dr. MEHMET ALPASLAN  
Enstitü Müdürü

## Onur Sözü

Doktora tezi olarak sunduğum " *Deinococcus radiodurans* ve Rekombinantlarının Uv-C, Ağır Metal Dirençliliği ve Biyosorpsiyon Yeteneği " başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Elif ÖZBEY

*Her zaman yanımda olan eşim ve canım kızım  
Özde Derin'ime;*

# ÖZET

Doktora Tezi

## *Deinococcus radiodurans* ve REKOMBİNANTLARININ UV-C, AĞIR METAL DİRENÇLİLİĞİ ve BİYOSORPSİYON YETENEĞİ

Elif ÖZBEY

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

96 + vii sayfa

2014

**Danışman:** Prof. Dr. Dilek ASMA

Son yıllarda önem kazanan genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremediasyonla ilgili çalışmalarla ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle bu maddeleri daha zararsız bileşiklere yıkmak için gerekli olan gen sistemleri ile donatılmış bakteri türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği saptanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, yabancı *D. radiodurans* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşu kullanılmıştır. Bu sayede *D. radiodurans*' in Cd ve Cr gibi toksik metal biyosorpsiyon kapasitelerine ve UV radyasyon direnci araştırılıp bunlara ek olarak organizmaya daha fazla oksijenli ortam sağlayarak daha fazla büyümesini sağlayan *vgb* geninin, bakterinin biyosorpsiyon yeteneğine ve UV direncine yapacağı katkının araştırılması planlanmıştır. Aynı zamanda UV radyasyon uygulamalarının yabancı ve rekombinant *D. radiodurans*' in antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve karoten) üzerine etkisi araştırılıp *vgb*' nin bu savunma sistemine etkileri saptanmıştır.

Çalışmamızın sonunda, vgb geninin yüksek dozlardaki UV-C uygulamalarında bakterinin üreme potansiyeli ve radyasyon sonrası enzim aktivitelerindeki olumlu etkisi tespit edilmiştir. Ayrıca Cd ve Cr' un hem bakterilerin üreme potansiyelleri üzerinde hem de bu metallerin giderim çalışmalarında vgb geninin bakteriye daha fazla oksijenli ortam yaratıp daha fazla üremesini sağlayarak meydana getirdiği olumlu etki gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Deinococcus radiodurans*, ağır metal stresi, Vitreoscilla hemoglobin, UV-C radyasyon, antioksidan sistem, biyosorpsiyon

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### BIOSORPTION ABILITY and RESISTANCE HEAVY METAL and UV-C of *Deinococcus Radiodurans* WILD and RECOMBINANTS

Elif ÖZBEY

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
96 + vii pages  
2014

**Supervisor:** Prof. Dr. Dilek ASMA

In addition to studies concerning genetic engineering which has gained importance in recent years, studies related to bioremediation of heavy metals causing serious environmental problems and extensive research on detoxification of xenobiotics has been started. Especially alternative new-use of bacteria species equipped with necessary genes that has the ability to break down substances to harmless compounds has lately been identified. For this purpose, with *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) cloned wild *D. radiodurans* gene recombinant and *vgb*<sup>-</sup> was used as control recombinant strains. In this way, *D. radiodurans*'s Cd and Cr as toxic metal biosorption capacity and UV radiation resistance will be explored in addition, organisms will be exposed to more oxygenated environment by providing higher growth capacity with *vgb* gene, bacteria biosorption ability and UV resistance will be investigation is planned. At the same time, the effect of application of UV radiation to wild-type and recombinant *D. radiodurans*'s antioxidant defense systems (superoxide dismutaz, catalase, and carotene) is explored and the impact on *vgb* effect on the defense system has been identified. In conclusion, application of high doses of UV-C treatment on *vgb* genes had a positive effect on bacterial reproduction potential and on enzyme activity after irradiation was determined.

Also the effect of Cd and Cr 's on reproductive potential of bacteria and removal of these metals and more oxygen environment provided by *vgb* gene causing a more positive growth and reproduction effects were observed.

**Anahtar Kelimeler:** *Deinococcus radiodurans*, heavy metal stress, *Vitreoscilla* hemoglobine, UV-C radiation, antioxidant systems, biosorption



## TEŞEKKÜR

Hem Yüksek Lisans hem de Doktora çalışmamın tüm aşamalarında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımdayıllardır büyük emeği geçen İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi, değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA' ya,

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve her türlü laboratuvar imkanlarından faydalandığım Prof. Dr. Özfer Yeşilada ve Prof. Dr. Hikmet Geçkil' e,

Deneysel ve teorik çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ' ye ve radyasyon doz uygulaması için gerekli doz miktarlarının belirlenmesinde katkısı bulunan Öğrt. Grv. Süreyya NUR'a,

İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)' ndeki AAS çalışmalarımın sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde bana yardımcı olan Uzm. Onur ÖZGÜL' e, ve SEM çalışmalarım için yardım aldığım sayın Murat ÖZABACI' ya,

Her zaman olduğu gibi tez çalışmam boyunca da sürekli yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen canım dostlarım Öğrt. Grv. İdil KARACA ve Araşt. Gör. Dr. Filiz KURU' ya,

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de benden desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve tezimin her türlü görsel ve teknik anlamdayı biçimlendirilmesinde çok önemli yardımlarını aldığım, kardeşlerim Naci ÖZBEY ve Mahmut ÖZBEY' e,

Son olarak da bana inanan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Umut ÖZBEY' e, bu zor günlerde benim tek neşe ve motivasyon kaynağım biricik kızım Özde Derin ÖZBEY' e,

2012-192 no'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

ve başarımda katkısı bulunan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Stres.....	1
1.1.1. Ağır Metal Stresi.....	2
1.1.1.1. Kurşun (Pb).....	3
1.1.1.2. Kadmiyum (Cd).....	3
1.1.1.3. Krom (Cr).....	4
1.1.1.4. Civa (Hg).....	5
1.1.2. Metallerin Ekosistem ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi.....	6
1.1.2.1. Ekzopolisakkarit Üretimi.....	6
1.1.2.2. İndirgeme.....	7
1.1.2.3. Biyobirikim.....	7
1.1.2.4. Hücre Dışına Pompalama.....	7
1.1.3. Biyosorpsiyon.....	7
1.1.3.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları.....	10
1.1.3.2. Biyosorpsiyon Üzerine Etki Eden Faktörler.....	12
1.2. Radyoaktif Stres.....	14
1.2.1. Ultraviyole Radyasyon.....	14
1.2.2. Radyasyonun biyolojik etkileri.....	15
1.3. <i>Deinococcus radiodurans</i> .....	18
1.3.1. Genel Özellikleri.....	18
1.3.2. <i>D. radiodurans</i> ' ın Ekolojisi.....	19
1.3.3. <i>D. radiodurans</i> ' ın Fiziksel Yapısı.....	19
1.3.4. <i>D. radiodurans</i> ' ın Metabolik Yapısı.....	20
1.3.5. <i>D. radiodurans</i> ' ın Filogenisi.....	23
1.3.6. <i>D. radiodurans</i> ' ın Genetiği.....	24
1.3.7. <i>D. radiodurans</i> ' ın DNA Zarar Direnci ve Tamir Mekanizması.....	24
1.3.8. <i>D. Radiodurans</i> ' ın UV-C Radyasyona Direnci.....	26
1.3.9. <i>D. radiodurans</i> ' da Antioksidan Koruma.....	26
1.4. Vitreoscilla Hemoglobin ve Oksidatif Stres.....	28
1.5. Oksidatif Stres.....	30
1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	31
1.5.1.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması.....	31
1.5.1.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi.....	31
1.5.1.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi.....	31
1.5.2. Süperoksit Radikali (O <sub>2</sub> <sup>•</sup> ).....	33
1.5.3. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	33
1.5.4. Hidroksil Radikali (OH <sup>•</sup> ).....	33
1.6. Serbest Radikallerin Etkileri.....	34
1.7. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	34
1.7.1. Süperoksit Dismutaz (Süperoksit Oksidoredüktaz, E.C:1.15.1.1, SOD).....	35
1.7.2. Katalaz.....	38

1.7.3.	Glutasyon peroksidaz (GPx).....	36
1.7.4.	Glutasyon redüktaz (GR).....	36
1.7.5.	Glutasyon-S-transferaz (GST).....	36
1.7.6.	Karoten.....	37
1.7.6.1.	Deinoksantin.....	37
<b>2.</b>	<b>KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>39</b>
2.1.	<i>D. radiodurans</i> 'ın Ağır Metal Giderimine Yönelik Çalışmalar.....	39
2.2.	<i>D. radiodurans</i> 'ın UV-C Direncine Yönelik Çalışmalar.....	42
2.3.	<i>D. radiodurans</i> 'ın Antioksidan Enzim Kapasitesine Yönelik Çalışmalar.....	43
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>45</b>
3.1	Çalışmada kullanılan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve rekombinantları.....	46
3.2.	Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri.....	46
3.3.	Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar.....	47
3.4.	Bakteri Stoklarının Hazırlanması.....	47
3.5.	vgb Klonları.....	48
3.6.	Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	48
3.7.	Bakterilerin UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması ve Canlı Hücre Sayımının Yapılması.....	49
3.7.1.	Bakterilerin UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması ve Enzim Aktivite Tayini İçin Uygulaması Sonrası işlemler.....	50
3.8	Enzim Aktivite Tayini.....	52
3.8.1	Katalaz Enzimi Tayini.....	52
3.8.2.	Süperoksit Dismutaz Enzim Tayini.....	52
3.9.	Karetenoid Tayini.....	53
3.10.	Total Protein Tayini.....	54
3.11.	Bakterilere Ağır Metal Uygulaması.....	54
3.11.1.	Cd Uygulamasının Üreme potansiyeli Üzerine Etkisinin Saptanması.....	55
3.11.2.	Cr Uygulamasının Üreme potansiyeli Üzerine Etkisinin Saptanması.....	55
3.11.3.	Ağır Metal Biyosorpsiyonu.....	55
3.8.3.1.	Optimum Doz ve Sürenin Belirlenmesi.....	56
3.8.3.2.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	56
3.8.3.3.	Optimum pH' nin Belirlenmesi.....	56
3.8.3.4.	Optimum Karıştırma Hızının Belirlenmesi.....	57
3.9.	Bakterilerin metal uygulaması öncesi ve sonrası SEM fotoğraflarının saptanması.....	57
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>58</b>
4.1.	<i>D. radiodurans</i> ve Rekombinantlarının Üreme Eğrileri.....	58
4.1.1.	OD <sub>600</sub> ile Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	58
4.1.2.	Canlı Hücre Sayımı ile Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	58
4.2.	UV-C Uygulaması Sonrası Canlı Hücre Sayıları.....	59
4.3.	UV-C Uygulaması Sonrası Enzim Aktivitesi.....	61
4.3.1.	UV-C Uygulaması Sonrası SOD Aktivitesi.....	62
4.3.2.	UV-C Uygulaması Sonrası KAT Aktivitesi.....	62
4.5.	UV-C Uygulaması Sonrası Karoten Miktarındaki Değişimler.....	64

4.6.	Bakterilerin Cd (II) Varlığındaki Üreme Potansiyelleri.....	67
4.7.	Bakterilerin Cr (III) Varlığındaki Üreme Potansiyelleri.....	69
4.8.	Bakterilerin Cd ( II) Biyosorpsiyonu.....	71
4.8.1.	Doz- Süre Optimizasyonu.....	71
4.8.2.	Sıcaklık Optimizasyonu.....	73
4.8.3.	pH Optimizasyonu.....	74
4.8.4.	Karıştırma Hızı Optimizasyonu.....	75
4.9.	Bakterilerin Cr (III) Biyosorpsiyonu .....	74
4.9.1.	Doz- Süre Optimizasyonu.....	75
4.9.2.	Sıcaklık Optimizasyonu.....	75
4.9.3.	pH Optimizasyonu.....	76
4.9.4.	Karıştırma Hızı Optimizasyonu.....	77
4.10.	Bakterilerin Metal Uygulaması Öncesi ve Sonrası SEM Resimler.....	78
4.11.	Bakterilerin UV-C Uygulaması Öncesi ve Sonrası SEM Resimleri.....	81
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>83</b>
5.1.	Ağır Metal Uygulamasının Bakterilerin Üreme Potansiyelleri Üzerine Etkisi.....	89
5.2.	Ağır Metal Biyosorpsiyonu.....	93
5.3.	UV-C Uygulaması, Enzim ve Karoten Tayini.....	96
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>97</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>109</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Cr (VI) ve Cr (III) reaksiyonları .....	5
Şekil 1.2	Mikroorganizmaların metallere ilişkilerine göre biyoremediasyon teknikleri .....	8
Şekil 1.3	Biyosorpsiyon mekanizması (a) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırılmış (b) Metal alımının gerçekleştiği bölgelere göre sınıflandırılmış.....	11
Şekil 1.4	Bakteriyel biyomaslarda biyosorpsiyon çalışmaları.....	12
Şekil 1.5	UV Radyasyon ve Hücresel Etkileri .....	15
Şekil 1.6.	DNA' da UV ve IR' nin neden olduğu hasarlar.....	17
Şekil 1.7	<i>Deinococcus radiodurans</i> .....	18
Şekil 1.8	<i>D. radiodurans</i> ' in hücre duvarının çok tabakalı yapısı.....	20
Şekil 1.9	A: Ekstraselüler proteolizis, B: Glukozun dNTPs' e dönüşümü için Pentoz fosfat yolu(PPP) C: Karbohidrat ve polifosfat granülleri .....	22
Şekil 1.10	16S rDNA - rRNA analizlerine göre filogenetik dendrogram .....	23
Şekil 1.11	<i>D. radiodurans</i> ' da iyonize radyasyon direncine katkıda bulunan faktörler (hücresel temizlik, antioksidan savunma ve DNA tamiri.....	26
Şekil 1.12.	<i>D. radiodurans</i> ' da Enzimatik(A) (Tian, 2004) ve Enzimatik olmayan (B) (Tian vd., 2007) antioksidan savunma. ....	27
Şekil 1.13	Vitreoscilla hemoglobininin yapısı.....	29
Şekil 1.14	Vitreoscilla hemoglobininin potansiyel uygulamaları.....	30
Şekil 1.15	Serbest radikallerin oluşmasına neden olan eksojen ve endojen faktörler.....	32
Şekil 1.16	Reaktif oksijen türleri.....	35
Şekil 1.17	$\beta$ - Karotenin moleküler yapısı .....	37
Şekil 1.18	Deinoksantin' in moleküler yapısı .....	37
Şekil 3.1	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinantları.....	46
Şekil 3.2	pUC8 ve puc8:15 plazmitlerinin fiziki haritası .....	48
Şekil 3.3	Bakterilerin UV-C radyasyona maruz bırakılması.....	50
Şekil 4.1	<i>D. radiodurans</i> yabanıl (W), vgb <sup>+</sup> (vgb) ve vgb <sup>-</sup> (pUC8) bakterilerinin zamana bağlı üreme grafikleri.....	58
Şekil 4.2	<i>D. radiodurans</i> yabanıl (W), vgb <sup>+</sup> (vgb) ve vgb <sup>-</sup> (pUC8) bakterilerinin canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafikleri.. ..	59
Şekil 4.3	<i>D. radiodurans</i> (Yabanıl) ' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.4	<i>D. radiodurans</i> (vgb) ' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.5	<i>D. radiodurans</i> (pUC8)' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.6	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler.....	64
Şekil 4.7	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının 12 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler .....	65
Şekil 4.8	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının 24 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler .....	64
Şekil 4.9	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler.....	65

<b>Şekil 4.10</b>	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinantlarının Cd varlığında üreme potansiyelleri a) <i>D. radiodurans</i> (yabanıl), b) <i>D. radiodurans</i> (vgb ), c) <i>D. radiodurans</i> (pUC8).....66	66
<b>Şekil 4.11</b>	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinantlarının Cr varlığında üreme potansiyelleri a) <i>D. radiodurans</i> (yabanıl), b) <i>D. radiodurans</i> (vgb ), c) <i>D. radiodurans</i> (pUC8).....67	67
<b>Şekil 4.12</b>	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin farklı sıcaklıklardaki biyosorpsiyon %'leri.....70	70
<b>Şekil 4.13</b>	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinant bakterilerin farklı pH' lardaki biyosorpsiyon kapasiteleri.....71	71
<b>Şekil 4.14</b>	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının farklı karıştırma hızlarındaki biyosorpsiyon kapasiteleri.....72	72
<b>Şekil 4.15</b>	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin farklı sıcaklıklardaki biyosorpsiyon %' leri.....77	77
<b>Şekil 4.16</b>	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinant bakterilerin farklı pH' lardaki biyosorpsiyon kapasiteleri.....75	75
<b>Şekil 4.17</b>	<i>D. radiodurans</i> ve rekombinant bakterilerin farklı karıştırma hızlardaki biyosorpsiyon kapasiteleri.....76	76
<b>Şekil 4.18</b>	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) <i>D. radiodurans</i> (yabanıl)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi.....77	77
<b>Şekil 4.19</b>	<i>D. radiodurans</i> (vgb)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) <i>D. radiodurans</i> (vgb)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi.....78	78
<b>Şekil 4.20</b>	<i>D. radiodurans</i> (pUC8)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) <i>D. radiodurans</i> (pUC8)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi.....79	79
<b>Şekil 4.21</b>	<i>D. radiodurans</i> (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası Hücre yapılarında meydana gelen d eğişimler. a) <i>D. radiodurans</i> (yabanıl), b) <i>D. radiodurans</i> (vgb), c) <i>D. radiodurans</i> (pUC8).....81	81

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Geleneksel metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	9
Çizelge 1.2	vgb/VHb teknolojisini Biyoremediasyon uygulamaları.....	29
Çizelge 1.3	Reaktif oksijen Türleri.....	32
Çizelge 1.4	Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	35
Çizelge 3.1	TGY Broth Besiyerinin İçeriği (g L-1).....	47
Çizelge 4.1	Bakterilerin üreme fazları.....	58
Çizelge 4.2	Farklı dozlarda UV-C radyasyon uygulanan <i>D. radiodurans</i> ve rekombinant bakterilerde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitesi.....	61
Çizelge 4.3	<i>D. radiodurans</i> yabancıl ve rekombinant bakterilerin Cd(II)' i belli doz ve sürelerde biyosorbe etme %' leri a) <i>D.radiodurans</i> (yabancıl) b) <i>D.radiodurans</i> (vgb) ve c) <i>D.radiodurans</i> (pUC8) .....	69
Çizelge 4.4	<i>D. radiodurans</i> yabancıl ve rekombinant bakterilerin Cr(III)' i belli doz ve sürelerde biyosorbe etme %' leri a) <i>D.radiodurans</i> (yabancıl) b) <i>D.radiodurans</i> (vgb) ve c) <i>D.radiodurans</i> (pUC8) .....	74
Çizelge 4.5	<i>D. radiodurans</i> (yabancıl) ve rekombinantlarının Cd ve Cr için optimizasyon koşulları.....	77

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Molar( Mol/litre)	M
Milimolar	mM
Mikromolar	$\mu$ M
Celsius derece	$^{\circ}$ C
Gram	g
Mikrogram	$\mu$ g
Litre	L
Mililitre	ml
Mikrolitre	$\mu$ l
Ultraviyole C	UV-C
Watt	W
Mikrowatt	$\mu$ W
Optik Dansite	OD
Hidrojen İyon Konsantrasyonunun eksi logaritması	pH
Glutatyon	GSH
Glutatyon redüktaz	GSH-R
GlutatyonS-transferaz	GST
Reaktif Oksijen Türleri	ROT
Süperoksit dismutaz	SOD
Katalaz	CAT
Glutatyon peroksidaz	GSH-Px
Lipid hidroperoksitler	ROOH
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit radikali	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Hidroksil radikali	·OH
Etilendiamin tetra asetik asit	EDTA
Atomik Absorpsiyon Spektrometresi	AAS
Taramalı Elektron Mikroskobu	SEM





# 1. GİRİŞ

## 1.1. Stres

“Stres” kavramı bir canlının normal halini tehlikeye sokan, kapasitesini azaltıcı ve zorlayıcı olarak değerlendirilen, canlı ve çevre arasındaki etkileşim olarak tanımlanmaktadır. Stresin oluşması için, canlının içinde bulunduğu ya da yaşamını sürdürdüğü ortam ve çevrede meydana gelen değişimlerin, canlıyı belli düzeyde etkilemesi gerekmektedir. Birçok canlıda stres yanıtları, stres etkenlerine karşı koymak ve onunla başa çıkmaya çalışmak amacıyla doku ve organ fonksiyonlarında değişimlerle başlamakta ve homeostasis sürecinden uzaklaşma ile sonlanmaktadır. Sözü edilen bu değişimler organizmadan organizmaya değişiklik gösteren ama benzer karakteristiğe sahip fizyolojik yanıtlardır (Dönmez vd., 2006).

Stres ilgili olduğu alana göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır;

Fiziksel Stresler;

Isı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok,

Kimyasal Stresler;

Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler,

Biyolojik Stresler;

Mikrobiyal metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora.

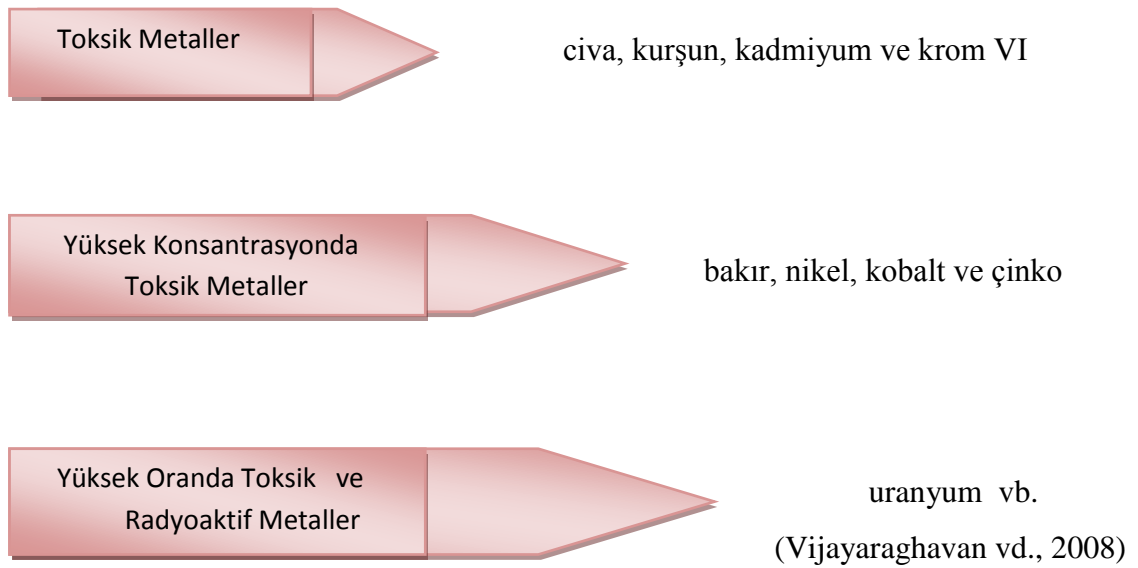
Ekosistemde özellikle organik kirleticiler ve ağır metallerin yarattığı stres koşullarından birincil olarak etkilenen canlı grubu bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalardır. Bu organizmalar çevresel stresle başedebilmek için savunma cevabında önemli olan genlerin sentezini düzenleme gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmektedirler. Bir mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese farklı yanıtlar verebilmektedir. Bakteriler zayıf stres olarak adlandırılan sublethal bir stres ile karşılaştıklarında, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Fakat üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır (Dikici., 2009).

### 1.1.1. Ağır Metal Stresi

Fiziksel özellikleri bakımından yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$  ten daha yüksek olan metaller ağır metal olarak adlandırılmaktadır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal girmektedir (Türkman vd., 2001; Hu., 2000).

Endüstriyel devrimle başlayan hızlı sanayileşmenin bir sonucu olarak ağır metal kirliliği bugün gelişmekte olan birçok ülkenin en önemli çevresel sorunlarından biri haline gelmiştir. Başlıca kaynağını fosil yakıtların kullanımı, madencilik, ağır sanayi kuruluşları ve tarımda kullanılan fertilizerler ve kimyasal ilaçların oluşturduğu (Florea ve Büsselberg, 2006) toksik metaller, biyolojik olarak ortadan kaldırılamaması ve canlı organizmalarda birikebilmelerinden dolayı insanların da dâhil olduğu birçok canlı için önemli bir risk oluşturmaktadır (Linde vd., 1996; Shukla vd., 2010; Ilijin vd., 2010).

Ağır metalleri bileşimleri açısından çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Toksisitelerine göre metaller üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar;



Bazı toksik metallerin özellikleri ve organizmalar üzerindeki etki şekilleri aşağıda verilmiştir;

### **1.1.1.1. Kurşun (Pb)**

Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en çok zarar veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından (çalışma ortamında izin verilen sınır 0,1 mg/m<sup>3</sup>) çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. Ekolojik olarak kurşun katı olarak çökme eğilimindedir ve özel durumlar dışında kompleks oluşturmaz (Bigersson vd., 1988). Genellikle doğaya salınan kurşun zor çözünür bileşikler (Pb<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Pb<sub>4</sub>O(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Pb<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH, (PbCO<sub>3</sub>) (PbS) oluşturur. Bu nedenle beslenme zincirinde yer alan bitkilerden kurşun alınımı sözkonusu değildir (Brim vd., 2000). Besin zincirinde kurşun yayılımı genellikle midye türü kalsiyumlu kabuklular üzerinden ve kalsiyuma bağlı olarak gerçekleşir. Tek hücreli canlıların ve balıkların 0,04 – 0,198 mg/l inorganik kurşun içeren suları tolere edebildikleri ancak daha düşük miktarlarda kurşunun besin yoluyla alınmasında akut zehirlenme gösterdikleri bilinmektedir (Duffus ve Worth, 1996).

Kurşun, proteinler üzerindeki sulfidril, fosfat ya da karboksil gruplarına bağlanarak enzimleri etkisizleştirir, ayrıca kalsiyum, çinko ve demir ile etkileşir. Böylece hücre zarlarını etkiler, sinirsel iletiyi bozar, hücrenin redoks olaylarını etkiler ve nükleotid metabolizmasını bozarak çoklu sistem hasarı oluşturmaktadır.

### **1.1.1.2. Kadmiyum (Cd)**

Kadmiyum, Cd- Ni pillerin üretiminde olduğu kadar belli boya ve plastikler için bir pigment olarak kullanımını da kapsayan çeşitli endüstriyel proseslerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kadmiyum, çeşitli hücresel zararlara neden olan ve biyolojik olarak elzem olmayan iki değerlikli tehlikeli bir metaldir. Önemli bir çevresel kirlenici olan kadmiyum, muhtemel etkisini diğer metallerin yerlerine geçerek ve esas metaboliklerle rekabet ederek göstermektedir (Gregory., 1997). Cd toksisitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar çok çeşitli ve komplekstir. Diğer iz elementlerin (örneğin Cr, Fe ve Cu) aksine Cd, aktif bir redoks metali değildir ve bu yüzden de reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi için elektron transfer reaksiyonlarını direkt olarak katalizlemez (McMurrey ve Tainer, 2003). Fakat Cd'nin indirekt olarak glutatyon, metalloproteinler ve proteine bağlı sulfidril grupları gibi serbest radikal temizleyicilerin miktarındaki azalma ile protein ve membran lipidlerinin oksidasyonuna

ve DNA hasarına yol açmaktadır (Tang ve Enger, 1993; Iijin vd.,2010). Hücre içi Cd'nin, membran bütünlüğünü bozması ve DNA'da tek zincir kırıklarına neden olmasının yanında DNA mismatch tamir sisteminin, nükleik asit ve protein sentezinin inhibitörü olarak bilinmektedir (Mikhailova vd., 1997). Cd'nin çevreye salınımındaki artış ve canlı sistemler üzerindeki toksik etkisi, göz önüne alındığında organizmaların Cd'ye maruz kaldıkları durumda buna nasıl cevap oluşturduklarının bilinmesi önem arz etmektedir (Lijun vd., 2005).

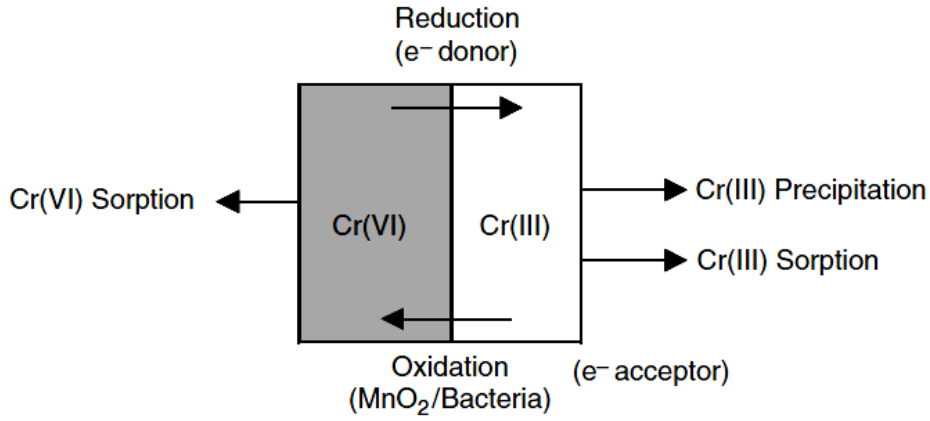
### 1.1.1.3. Krom (Cr)

Krom periyodik tablonun IV B gurubunda bulunan bir geçiş metalidir. Krom çok farklı formlarda bulunabilmesine rağmen en yaygın ve kararlı formları, üç değerlikli Cr (III) ve altı degerlikli Cr (VI) türleridir. Krom, çevrede doğal olarak trivalan (+3) formuyla  $Cr_2O_3$  seklinde bulunmaktadır (Muter vd., 2001). Cr (III) yeraltı suyunda çok az çözünmekte ve toprak tarafından kuvvetlice tutulmaktadır. Cr (III)'ün çözünürlüğünün yok denecek kadar az olması, çevrede yaratacağı toksik etkiyi de en aza indirmektedir. Buna rağmen Cr (VI) yüksek derecede çözünür olmakla birlikte oksijen ile birleşerek kromat ( $CrO_4^{2-}$ ) veya dikromat ( $Cr_2O_7^{2-}$ ) iyonu şeklinde bulunmaktadır. Taşınabilirliği de Cr (III)'e göre çok daha fazladır. Cr (VI) çok güçlü bir oksitleyici ajandır ve organik madde varlığında Cr (III)'e indirgenmektedir. Bu indirgenme asit içeren topraklarda olduğu gibi, asitli çevrelerde daha hızlı olmaktadır. Cr (VI), prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin membranlarından kolayca geçebilmektedir (Cervantes vd., 2001). İnsanlarda akciğer kanserine, kromat ülserine, nazal septum delinmesine ve böbrek hasarına neden olmaktadır (Bhide vd., 1996).

Krom (VI); biyolojik sistemlerde bulunan en toksik ve mutajenik metal iyonudur. Bu toksisitenin nedeni; sülfat iyonu kanalları yardımıyla membranı kolayca geçebilen hegzavalent Cr iyonlarıdır. Membranı geçen iyonlar redüksiyon tepkimelerine katılarak çeşitli reaktif ara ürünlerin oluşmasına neden olurlar. Bu ara ürünler de hücre organellerine, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verirler (Ting ve Lawson, 1991).

Krom (III) proteinler ve nükleik asitlerle etkileşime girebilmektedir. Krom klorür ( $CrCl_3$ ) ile yapılan çalışmalarda, nükleik asit sentezinin başlamasında gecikme ve dolayısıyla nükleik asit içeriğinde azalma belirlenmiştir. Potasyum dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) ile yapılan deneylerde de hücre bölünme süresinin uzaması ve hücre bölünmesinde azalma kaydedilmiştir. Potasyum dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ), DNA sentezini fazlasıyla

etkilemekte ve etkisini muhtemelen DNA polimerazı etkileyerek yapmakta, ikili sarmal DNA ile etkileşime girmektedir. İkili sarmal DNA, bazlar arasındaki H bağları ve buradaki negatif yüklü fosfatların karşılıklı olarak birbirini itme kuvveti ile kararlı formda tutulmaktadır. Krom klorürdeki Cr (III), negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanmaktadır. Böylece negatif yüklü fosfatlar nötralize olmakta, Cr (III)'ün arttırılmasıyla DNA'daki bazlar arasındaki zayıf H bağları kopmakta, DNA kararlı yapısını kaybetmekte ve erime sıcaklığı düşmektedir (Cervantes vd., 2001).



Şekil 1.1. Cr (VI) ve Cr (III) reaksiyonları (Hawley vd., 2004).

#### 1.1.1.4. Civa (Hg)

Civa oda sıcaklığında sıvı halde olan tek metal olup, kolayca buharlaşabilmektedir. Tepkimeye girmemiş metalik civa ( $Hg^0$ ), inorganik ve organik civa bileşikleri kağıt, deri, boya endüstrisinde ve elektrikli aygıtlar, pil, termometre gibi ölçüm gereçlerinde, antiseptik olarak, diş hekimliğinde amalgam yapımında kullanılmaktadır. Civa, klorür ve yakıcı madde üretiminde elektroliz basamağında ve altının arıtılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Civanın toksik etkisi kimyasal bileşimine ve karşılaşma yoluna göre değişir. Zehirlenme daha çok metalik civa buharının solunması sonucu olur. Buharı renksiz ve kokusuz olduğundan varlığı fark edilmeyebilir. Civa organizmada sulfidril gruplarıyla etkileşime girer, enzim etkinliğini bozar, hücre ölümüne neden olur (Amachi vd., 2010; Green vd., 2012)

### **1.1.2. Metallerin Ekosistem ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi**

Endüstriyel atık suların bırakılması sonucu sudaki ağır metal kirliliği, sucul ekosistemleri tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. Endüstriyel aktivitelerinin yaygın olarak kullanımının artması çevredeki ağır metallerin de hızla artmasına yol açmaktadır. Ağır metaller çevreye, hayvanlara ve insanlara ciddi toksik etkilerde bulunmaktadır. Metaller diğer toksik kirleticilerden farklı olarak biyodegrade olmazlar ve canlı dokular içersinde birikebilir ve sonuç olarak da besin zincirinde yoğun olarak bulunabilirler.

Metaller, mikroorganizmaların hücre zarını, sitoplazmasını, metabolizmasını ve yapısal işlevlerini bozmak suretiyle olumsuz yönde etkilemektedirler. Metabolizma üzerindeki etkileri ise transkripsiyonun inhibisyonu, hücre membranının bozulması, translasyonun inhibisyonu, DNA tahribi, hücre bölünmesinin inhibisyonu ve protein denatürasyonudur. Mikroorganizmalar bünyelerine çeşitli yollarla giren metallerin toksisitesinden korunmak için bazı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu savunma mekanizmaları arasında; pozitif yüklü iyonların negatif yüklü hücre yüzeyine (dış zar ya da hücre membranına) bağlanması, bu metalleri hücrenin ekzopolisakkarit (EPS) olarak da bilinen hücre dışı polimerik maddelere bağlaması, volatilizasyon, hücre içinde indirgeme, moleküler pompa, hücre içinde alıkoyma, sitoplazmada metalotiyonein gibi proteinlerin üretimi, sitoplazmada metal tuzları olarak presipite etme yer almaktadır.

Mikroorganizmalar metallere çeşitli şekillerde direnç gösterebilmektedir. Bu direnç mekanizmalarından bazıları aşağıda incelenmiştir.

#### **1.1.2.1. Ekzopolisakkarit Üretimi**

Bazı mikroorganizmaların hücre yüzeylerinde metalleri bağlayarak hücreye girmelerini engelleyen EPS olarak adlandırılan bir tabaka bulunur. Bu tabakanın pek çok metal iyonunu bağladığı gösterilmiştir. Bazı bakterilerin metalli ortamda EPS üretimini arttırdıkları bilinmektedir. Ayrıca ekstrasellüler (siderofor) selat bileşikler de metalleri hücre dışında bağlayarak detoksifiye ederler. Siyanobakterilerde bakır toksitesinin hücreden salgılanan siderophore ile azaltıldığı gösterilmiştir (Madigan vd., 1997).

### **1.1.2.2. İndirgeme**

Bazı metaller sıfır değerlikli hale indirgenerek detoksifiye edilirler. Örneğin iki değerlikli civa Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin plazmidinde bulunan *mer* operonu olarak adlandırılan genlerle sıfır değerlikli hale indirgenir. Periplazmik Hg<sup>+2</sup> bağlayıcı MerP proteini civayı membranda transport proteini olan MerT'ye verir. Sitoplazmada bulunan civa redüktaz enzimi (MerA) civayı indirger. Bu şekilde oluşan sıfır değerlikli civa buharlaşarak hücreyi terk eder. İndirgeme krom detoksifikasyonunda da görülür. Kromat redüktaz olarak adlandırılan enzim altı değerlikli çözünebilir formdaki toksik kromu, çözünebilir üç değerlikli forma indirger. Enzim hücre içinde ise krom hücre içinde biriktirilir. Enzim hücre membranında ise krom hücreye girmeden hücre dışında indirgenir. Sonuçta oluşan üç değerlikli krom çözümediği için hücrelere girip toksik etki gösteremez ve çökerek ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Madigan vd., 1997).

### **1.1.2.3. Biyobirikim**

Bazı mikroorganizmalar metalleri hücre içlerinde biriktirirler. Ökaryot mikroorganizmalar vakuollerinde biriktirebilir. Bazı hücreler sentezledikleri Metallothionein benzeri proteinlerle hücre içinde metalleri bağlarlar. Metal bulunan ortamlarda bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen metallothioneinler, küçük moleküler ağırlıklı sisteince zengin proteinlerdir. Bazı hücreler metal tuzları şeklinde hücrede metalleri çöktürürler (Aksu ve Dönmez, 2000a).

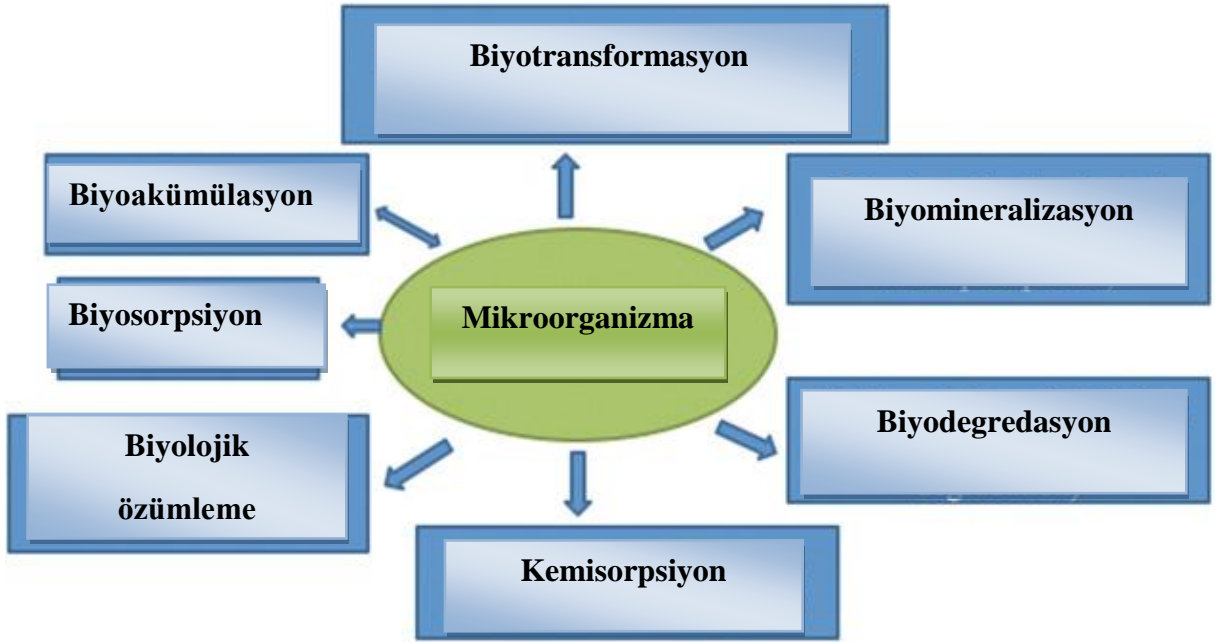
### **1.1.2.4. Hücre Dışına Pompalama**

Bazı metaller hücre dışına membran taşıyıcı proteinleri yardımıyla çıkarılmaktadır (Madigan vd., 1997).

### **1.1.3. Biyosorpsiyon**

Bazı metaller hücre dışı membranındaki ya da hücre duvarındaki karboksil, amino, tiyol ya da hidroksil gruplarına bağlanarak pasif olarak hücre dışında tutulur (Kapoor ve Viraraghavan, 1995). Bir hücre metalli ortamda yukarıdaki mekanizmaların bir ya da daha fazlasını kullanarak ağır metalleri detoksifiye edebilir.





**Şekil 1.2.** Mikroorganizmaların metallerle ilişkilerine göre biyoremediasyon teknikleri (Prakash vd., 2013).

Ağır metallerin gerek endüstriyel atık sulardan ve gerekse ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılmasında çeşitli kimyasal ve fiziksel süreçler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin ekonomik olmayışları ve elde edilen artım düzeyinin yeterli olmaması nedeniyle bu alanda önemli bir potansiyele sahip mikroorganizmaların etkin bir şekilde kullanıldığı ve tercih edildiği görülmektedir (Volesky, 1990; Gadd, 1990a; Gadd, 1990b; Matheickal ve Yu, 1997). Bu amaçla çeşitli bakterilerin, fungusların ve alglerin kullanıldığı bilinmektedir (Fourest ve Roux, 1992; Sağ vd., 1998; Aksu, 2001; Veglio ve Beolchini, 1997; Akar vd., 2006; Çabuk vd., 2006; Tunalı vd., 2006; Brady ve Duncan, 1994). Bu mikroorganizmaların sahip oldukları biyomoleküller gerek canlı ve gerekse ölü biyokütlelerin yüksek bir metal ilgisine sahip olmasını sağlamakta ve dolayısıyla çok yüksek bir biyosorpsiyon kapasitesi sunmaktadırlar.

**Çizelge 1.1.** Geleneksel metal uzaklaştırma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Metot	Avantaj	Dezavantaj
<b>Kimyasal çöktürme ve filtrasyon</b>	Basit Ucuz	Yüksek konsantrasyonlarda zor ayrılma Etkin değil Aktif çamur oluşumu
<b>Elektrokimyasal yöntemler</b>	Metali geri elde etme	Pahalı olması Sadece yüksek konsantrasyonlarda etkin olması
<b>Kimyasal oksidasyon ve indirgenme</b>	inaktivasyon	Ortam hassasiyeti
<b>İyon değişimi</b>	Etkin artım ve saf atık Metalin geri kazanımı	Partiküllere hassas ve reçinelerin pahalı olması
<b>Buharlaştırma</b>	Saf atık elde etme	Fazla enerji gereksinimi Pahalı olması Aktif çamur üretimi
<b>Ters ozmoz</b>	Geri dönüşüm için saf atık eldesi	Yüksek basınç Membran boyutu Pahalı olması

Biyosorpsiyon, endüstriyel atıkların giderimi için umut verici alternatif bir yöntemdir, bunun başlıca nedeni düşük maliyetinin olması ve yüksek metal bağlama kapasitesidir. Biyosorpsiyon, metabolizma yoluyla aktif olarak veya bazı fiziksel ve kimyasal proseslerle pasif olarak meydana gelebilmektedir. Biyolojik materyaller kullanılarak atık sulardan ya da topraktan ağır metallerin metabolizmalar aracılığı ile biriktirilmesi ya da fizikokimyasal yollarla alımı olarak tanımlanan, biyosorpsiyon için yaygın olarak kullanılan biyosorbentler ise algler, bakteriler ve mayalardır (Fourest ve Roux, 1992; Volesky, 1986; Vijayaraghavan, 2008).

### 1.1.3.1. Biyosorpsiyon Mekanizmaları

Biyosorpsiyon mekanizmaları mikroorganizma yapılarının kompleks olması nedeni ile çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar iki ana başlık altında toplamak mümkündür. Şekil 1.3'de bakteriyal biyomaslarda biyosorpsiyon mekanizmaları özetlenmektedir.

Hücre metabolizmasına dayalı biyosorpsiyon;

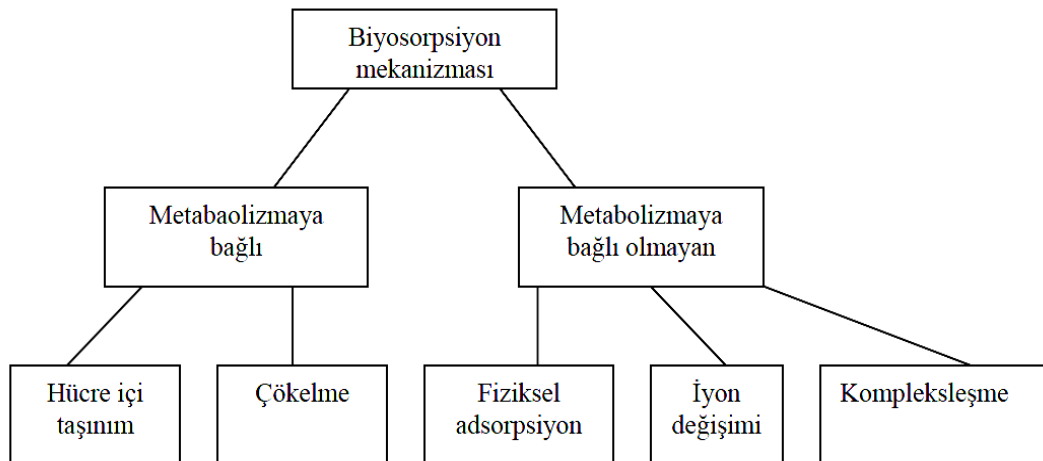
- \* metabolizmaya bağlı
- \* metabolizmaya bağlı olmayan

Metalin uzaklaştırıldığı bölgeye dayalı biyosorpsiyon;

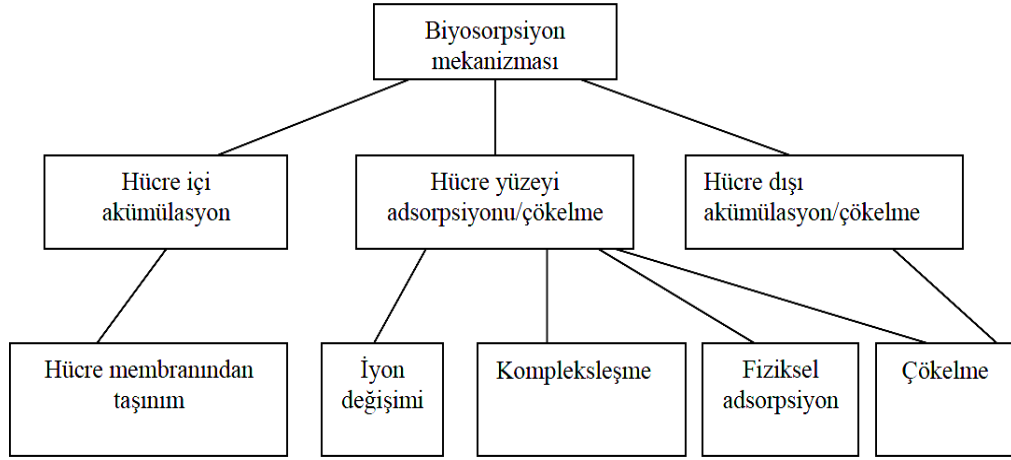
- \* ekstrasellüler akümülayon / presipitasyon
- \* hücre yüzeyi sorpsiyonu
- \* intrasellüler (hücre içi) akümülayon

Metal ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşim sırasında fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi ve kompleks oluşumu gerçekleşir ve buna hücre yüzeyinde sorpsiyon denir ve metabolizmadan bağımsızdır. Mikrobiyal biyokütlenin hücre duvarı büyük oranda polisakkarit, protein ve yağları içeren çok sayıda metal bağlama fonksiyonel gruplarına sahiptir. Bu gruplar; karboksilik, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gruplarıdır. Bu fizikokimyasal metal biyosorpsiyonu, metabolizmadan bağımsızdır ve nispeten hızlıdır. Alglerle 5-10 dakika içerisinde gerçekleşir (Zhang ve Majidi, 1994; Stevenson vd., 1996) ve metaller geri kazanılabilir (Kuyucak ve Volesky, 1988; Veglio ve Beolcini, 1997).

a)



b)



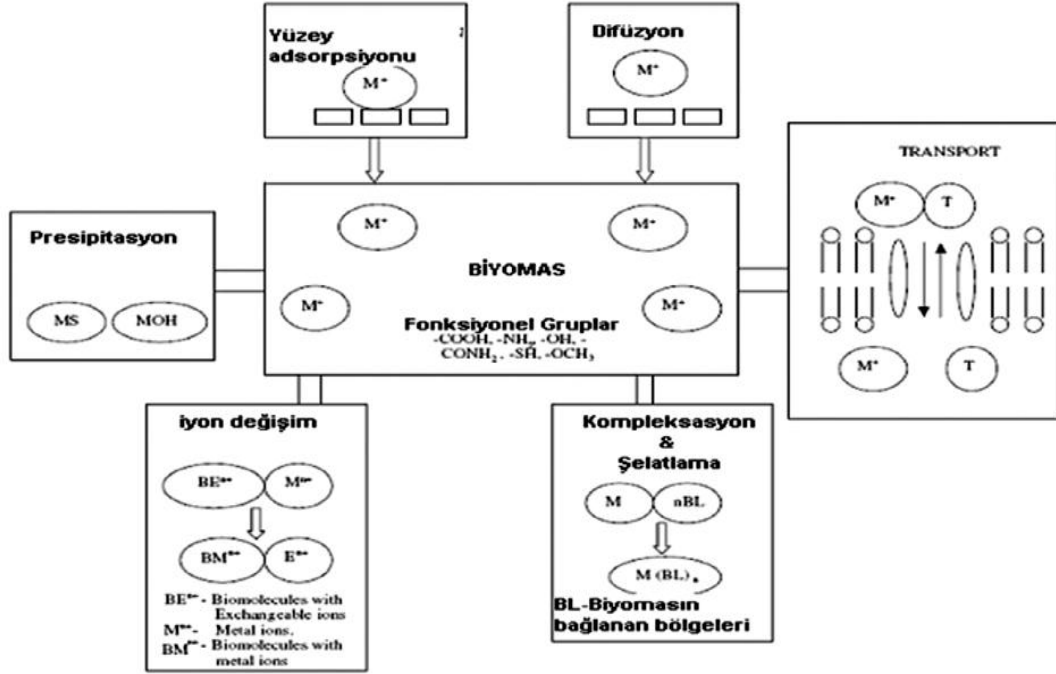
**Şekil 1.3.** Biyosorpsiyon mekanizması (a) Hücre metabolizmasına göre sınıflandırılmış (b) Metal alımının gerçekleştiği bölgelere göre sınıflandırılmış

Metal bağlama süreci iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamak, hücre duvarında metal ve reaktif kimyasal gruplar arasında sitokimiyetik etkileşimdir, ikincisi ise artan metal miktarlarının inorganik birikimidir. Bakteri hücre duvarı, metal iyonları ile temasta bulunan ilk bileşendir. Ölü veya inaktif hücre ile metal sorpsiyonunun tipi ekstrasellüler olduğu için hücre duvarının kimyasal fonksiyonel grupları biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Bakteri hücre duvarında bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, fosfonat, amin ve hidrosil gruplarıdır (Vijayaraghavan, 2008).

Bakteri ve siyanobakterilerin hücre duvarları temelde peptid zincirleri ile birlikte N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) disakkaritlerini içeren peptidoglikan tabakadan meydana gelmiştir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı, Gram pozitiflere nazaran daha ince olup, kuvvetli çapraz bağlara sahip değildir. Dış zar lipopolisakkarit (LPS), fosfolipid ve protein tabakalarından oluşmaktadır.

$Cd^{2+}$  biyosorpsiyonu açısından Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri karşılaştırmışlar ve Gram pozitif bakteri hücre duvarlarında bulunan glikoproteinlerin, LPS ve fosfolipidlerden daha fazla  $Cd^{2+}$ 'u bağlama bölgesine sahip olduğunu, ayrıca her iki grubun da metal bağlama açısından farklı kapasitelere sahip oldukları rapor edilmiştir. Bakteri hücre duvarlarının yapısında sadece bu yapılar metal bağlama görevi yapmazlar, bundan başka Gram pozitiflerde teikoik asit ve teikronik asitte metal bağlamada önemli rol oynamaktadır. *E. coli* dış zarında bulunan fosfolipid ve LPS'nin

sahip olduğu fosforil grupları da metal katyonlarının bağlanabileceği muhtemel bölgeler arasında yer almaktadırlar ( Gourdon vd., 1990; Sağlam ve Cihangir, 1995)



Şekil 1.4. Bakteriyel biyomaslarda biyosorpsiyon çalışmaları (Sud vd., 2008)

### 1.1.3.2. Biyosorpsiyon Üzerine Etki Eden Faktörler

Özellikle biyolojik olarak parçalanması zor olan kirleticilerin (metal ve boya) sudan uzaklaştırılması için kullanılan bu teknikte kirleticiler bakteri, fungus ve algler gibi biyolojik materyallere bağlanmaktadır. Günümüz çalışmaları kesikli denemelerde süreci etkileyen faktörler üzerine odaklanmıştır. Bu faktörler arasında; solusyon pH'ı, sıcaklık, iyonik kuvvet, biyosorbent miktarı, biyosorbent boyutu, ilk solut konsantrasyonu, çalkalama hızı yer almaktadır.

Solusyon pH'sı biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Yüksek solusyon pH'ında metal komplekslerinin çözünürlüğü presipitasyonu takiben azalır, bu da prosesi komplike hale getirmektedir. Örneğin bakteriyel biyokütle ile metal iyonlarının biyosorpsiyonu süresince iyon değişim mekanizması ile metal katyonlarının bağlanmasından sorumlu negatif yüklü karboksil gruplarından (pKa=3-5) dolayı biyosorpsiyon pH'ının 3-6 olması uygun bulunmuştur (Vijayaraghavan, 2008).

Metal alımının pH'ya bağlı olması, sorpsiyon ortamının yüzeyindeki protonlar ve metal katyonları arasındaki rekabetle ilişkilidir. Düşük pH'da H<sup>+</sup> iyonu konsantrasyonu fazla olacağından metal katyonundan ziyade hücre yüzeyine daha çok H<sup>+</sup> iyonu tutunacaktır. Hücre yüzeyleriyle metal arasındaki bu farklı kimyasal etkileşmeler sonucunda metal iyonları için çeşitli pH'larda farklı tutma kapasiteleri olabilmektedir. Solusyonun kimyası bakteriyel yüzey kimyasını da etkilemektedir. pH arttıkça solusyondaki metal iyonları hidrolize uğramaktadır (Koçberber ve Dönmez, 2008).

Metal alımını etkileyen faktörlerden bir diğeri ise sıcaklıktır. Biyosorpsiyon 20-35°C arasındaki değerlerden daha az etkilenmektedir. Yüksek sıcaklık, sıvının kinetik enerjisini ve yüzey aktivitesini artırdığı için biyosorpsiyonu da artırmaktadır. Ancak yüksek sıcaklıklarda da biyosorbent fiziksel zarar görebilmektedir. Ağır metal iyonlarının mikroorganizmalara zayıf bağlarla bağlanması pasif veya fiziksel adsorpsiyonun bir sonucudur. Yüksek sıcaklıklarda bu bağlar kopar ve adsorpsiyonun tersinir olmasından dolayı desorpsiyonun önemi artarak hızı azaltıcı bir etki göstermektedir (Vijayaraghavan, 2008).

İyonik güç de biyosorpsiyon üzerinde etkili bir faktördür, örneğin klor gibi bazı inorganik iyonlar bazı metal iyonları ile kompleks oluşturarak biyosorpsiyon prosesine etki etmektedirler. Düşük biyosorbent miktarı, yüksek biyosorpsiyon ürünlerini vermektedir. Biyokütle konsantrasyonundaki artış biyosorbentin yüzey alanının artmasına neden olduğu için genellikle biyosorplanacak solütün miktarını da artırmaktadır. Böylelikle bağlanma bölgelerinin sayısı da artmaktadır. Buna karşın biyosorbentin birim ağırlık başına sorbe edilen solüt miktarı, biyosorbent miktarı ile azalmaktadır.




Küçük boyutlu partiküller daha iyi biyosorpsiyon yapma yeteneğine sahip olup, daha kısa sürede dengeye ulaşmaktadırlar. Yüksek solüt konsantrasyonunda biyosorpsiyon verimi daha iyi olmaktadır, düşük solüt konsantrasyonun da ise ilk konsantrasyondan bağımsız olarak fraksiyonel sorpsiyon meydana gelmektedir. Bu nedenle biyosorbentin maksimum doygunluk potansiyelinin öncelikli olarak tanımlanması gerekmektedir (Vijayaraghavan, 2008).

## 1.2. Radyoaktif Stres

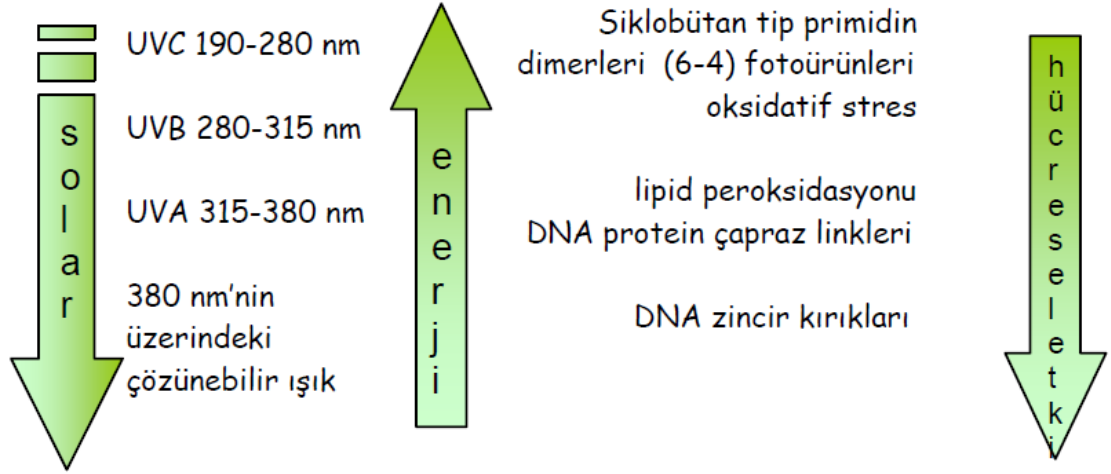
Radyasyon; güneş sisteminden ya da yeryüzündeki doğal kaynaklardan salınan elektromanyetik dalgalar ve parçacıklar biçimindeki enerji emisyonu (yayımı) aktarımıdır. Başlıca kaynağı güneş olan elektromanyetik radyasyon, dünyayı sürekli etkilemektedir. Elektromanyetik radyasyon; gama ışınları, X ışınları, ultraviyole (UV) ışınları, görünür ışık, infrared ışınlar, mikrodalgalar ve radyo dalgalarından oluşmaktadır.

### 1.2.1. Ultraviyole Radyasyon

UV, güneş tarafından yayılan ve göz tarafından algılanmayan radyasyon tipidir. Güneş, elektromanyetik spektrum olarak bilinen bir dizi enerji yaymaktadır ve bu enerjinin değişik şekilleri dalga boylarına göre sınıflandırılır. UV radyasyonu farklı dalga boylarına göre üç tipte incelenebilmektedir;

 UV-A	315-380 nm
 UV-B	280-315 nm
 UV-C	190-280 nm dalga boyları arasındadır.

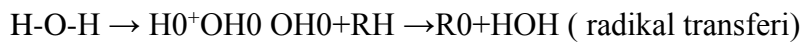
Dalga boyları ile radyasyonun enerjisi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle dalga boyu en az ve dolayısıyla enerjisi en yüksek olan UVC' nin daha ağır hücrel hasarlara neden olabileceği söylenebilmekte ve yine dalga boyu en yüksek ve enerjisi en az olan UVA' nın da hücrel zararlarının tolere edilebilecek düzeyde olduğundan bahsedilebilmektedir. Ozon tabakası, UVC'nin neredeyse tamamını ve UVB' nin de % 90'nını absorbe edebilmektedir. UVB' nin % 10' luk kısmı ve UVA ise tamamıyla yeryüzüne ulaşmaktadır. UV radyasyonu, deride yanma, immun baskılanma, ekstraseluler matrikste değişiklikler ve deri yaşlanmasını içine alan bir takım etkiler yaratmaktadır. UV radyasyonun etkileri Şekil 1.5' de sematize edilmiştir.(Leena ve Marikki, 2005)



**Şekil 1.5.** UV radyasyonu ve Hücresel etkileri

### 1.2.2. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyonun atomik düzeydeki etkisi elektronların eksitasyonu yani  $e^-$  nin bir üst yörüngeye geçmesi şeklinde olmaktadır. Radyasyonun gücüne göre  $e^-$  ya üst yörüngede kalacak ya da  $e^-$  nin salınımı sonucu geriye iyonize olmuş bir atom kalacaktır ki bu da büyük çoğunluğu sudan oluşan bir hücrede radyasyonun dozuna göre çeşitli hasarlara sebep olacaktır. Radyasyonun atom üzerinde neden olduğu eksitasyon ve iyonizasyonun ardından bir üst yörüngeye geçen  $e^-$  hücrede özellikle makromoleküllerde ve DNA'da hasarlar meydana getirmektedir. Serbest  $e^-$  etkisini direk ya da indirek olarak meydana getirmektedir. Serbest kalan bu  $e^-$  direkt etkisini, DNA' da fosfodiester bağları ya da H bağları üzerinde göstermekte ve bu bağlardaki atomlara afinite göstererek bağların kırılmasına sebep olmaktadır. Özellikle fosfodiester bağlarının kırılması DNA' da tek ya da çift zincir kırıklarına sebep olmaktadır. İndirek etkide ise serbest kalan bu  $e^-$  hücredeki su molekülleri ile etkileşime girerek suyun radyolizisine neden olmaktadır. Burada meydana gelen reaksiyon şu şekildedir: (Caspari, 2000)

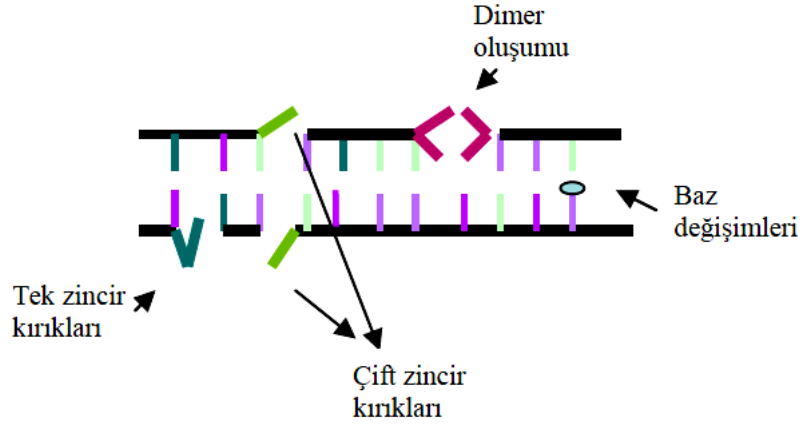




Bir serbest radikal, elektriksel olarak, orbitalinde paylaşılmamış bir elektrona sahiptir. Radikal elektrofilitir ve yüksek oranda reaktiftir. Serbest radikallerin DNA ile etkileşimi ile DNA' da baz değişimleri, çift ve tek zincir kırıkları gibi bir takım hasarlar meydana gelmektedir (Lakin ve Jackson, 1999).

UV-C radyasyon kısa dalga boyu ve yüksek enerjisi nedeniyle her çeşit mikroorganizmayı öldürebilir. UV ışınının en büyük antimikrobik etkinliği 250-260 nm (253.7 nm) dalga boyu bölgesindedir. Bu dalga boyu, DNA tarafından en etkin şekilde absorbe edilen dalga boyudur. Hücresel DNA'larca absorbe edilen UV radyasyon enerjisi, bitişik timin bazları arasında kimyasal kovalent bağlar oluşturarak timin dimerleri meydana getirir (Şekil 1.6). Ortaya çıkan bu timin dimerleri hücresel UV hasarının başlıca mekanizmasını oluşturur. Bu UV nedeniyle oluşan timin dimerleri, DNA iplikçiklerinde katlanmalara neden olur, DNA'nın doğal helikal yapısı bozulur. Bu durum hücre bölünmesi öncesi kromozom replikasyonunu güçleştirir, genlerin transkripsiyonu ve ekspresyonu yapılamaz. Kromozom replikasyonu yapılabilese bile üreyemeyen mutant hücreler ortaya çıkacaktır. Timin dimerleri yaşamsal fonksiyonları olan genlerde görüldüğünde, DNA replikasyonunu engellediğinde öldürücüdür. Belli koşullarda bazı organizmalar DNA hasarını onarabilir ve üremenin tekrar mümkün olabileceği aktif bir duruma dönebilir. UV ışınının şiddetinin çok yoğun olduğu durumlarda hasar çok yaygın olur ve bu durumda onarım olanaksızdır. Onarım mekanizmalarından ilki, çoğu mikroorganizmaların sahip olduğu ışıkla harekete geçen onarım sistemidir. Fotoreaktivasyon denilen bu sistem, timin dimerlerini ayırarak etki gösterir. Fotoreaktivasyon görülebilir dalga boyundaki güneş ışığının katalizör etkisinin sonucudur. Bazı mikroorganizmalarda ışığa gereksinim duymayan karanlık reaktivasyon (darkreactivation) denilen diğer bir onarım sistemi bulunur. Bu sistemde timin dimerleri taşıyan kısa DNA zincirleri kesilip atılır. Onarım belli bir sürede yapılabilir, bu süre içinde onarım olmazsa, hasar geri dönüşsüz olmaktadır.

UV radyasyonun antimikrobik etki mekanizmalarından bir diğeri de nükleotid bazlarına hidroksil gruplarının eklenmesidir. 290 nm'nin altındaki dalga boylarında çok az UV radyasyonun yer yüzeyine ulaşmasına rağmen, 325-400 nm arasındaki dalga boyuna sahip UV radyasyon da mikroorganizmalara zarar verebilir. UV radyasyonun germisidal etkisi doza bağlıdır. Işıma süresi arttıkça veya ışığa şiddeti arttıkça (yüksek voltaj veya ışık kaynağına yakınlık) ölen vejetatif hücre sayısı da artar.



**Şekil 1.6.** DNA' da UV ve IR' nin neden olduğu hasarlar

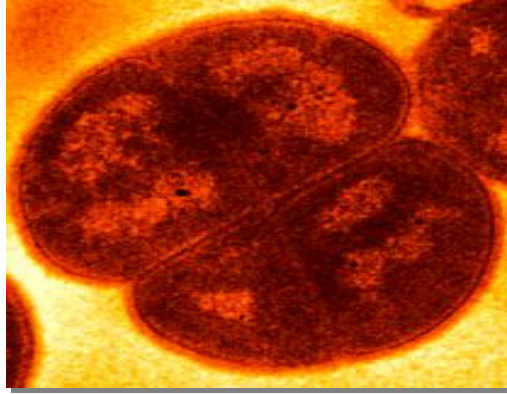
Ekosistemde başta ağır metaller olmak üzere çevrede stres oluşturan bütün kirletici unsurlar, yaşadığımız çevreyi ve bu çevredeki organizmaları olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir. Örneğin; sıvı atıklardan ağır metallerin uzaklaştırılması için çok sayıda metot geliştirilmiştir ancak bu metotlar öngörülmeven metal giderimi, yüksek reaktif ihtiyacı ve toksik çamur üretimi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu bağlamda, yeni çevre dostu, ekonomik ve etkili metal adsorbenti için araştırmalar bakteriyal ve algal biyomas gibi biyomateryaller üzerinde odaklanmıştır. Zaten bu kirleticiler ve ağır metaller gibi stres koşullarından birincil olarak etkilenen canlı grubu bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalardır. Bu nedenle mikroorganizmaların bu kirleticilerle baş edebilecekleri sistemlerin geliştirilmesi çalışmaları da önem kazanmıştır. Ayrıca moleküler tekniklerin potansiyel kullanılabilirliği araştırılmış ve özellikle bu maddeleri daha zararsız bileşiklere yıkmak için gerekli olan gen sistemleri ile donatılmış bakteri türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği saptanmıştır.

*Deinococcus radiodurans* bu amaçlar doğrultusunda etkin bir şekilde kullanılan bakterilerden biridir. *D. radiodurans*, yüksek seviyede iyonize radyasyon ve UV radyasyon, kuraklık ve DNA' ya zarar veren kimyasallar gibi bir çok ajan ve koşula olan direnciyle iyi bilinen bir ekstremofildir. Aynı zamanda çeşitli ağır metalleri ve radyoaktif metalleri yıkabilme özelliğine sahip bir bakteridir.

### 1.3. *Deinococcus radiodurans*

#### 1.3.1. Genel Özellikleri

*Deinococcus radiodurans* (Yunanca : deinos: güçlü, sıradışı ve coccus tanecikli meyve) aerobik, kırmızı pigmentli, spor oluşturmeyen, patojenitesi olmayan ikili ya da dörütlü hücre kümeleri şeklinde bulunan Gram (+) bir bakteridir. Ortalama bir hücre çapı 1µm (0.5-3.5 µm) kadardır (Murray, 1986). 32° C' de zengin TGY (%0.5tripton, % 0.1glukoz, % 0.15maya özütü) besi ortamında optimum üreyen mezofil bir bakteri olmasına rağmen sıcaklık sınırı 39 ° C 'nin üzerindedir. Bakterinin jenerasyon süresi yaklaşık olarak 100 dakika olduğu için kolonilerin yeteri kadar gelişmesi 3 gün sürmektedir. *D. radiodurans* RNA sentezini (ör: aktinomisin D), protein sentezini (kloramfenikol, streptomisin, neomisin, kanamisin ve eritromisin) ve hücre duvar sentezini inhibe eden (penisilin, basitrasin ve vankomisin) antibiyotiklere karşı duyarlıdır (Hawiger ve Jeljaszewic, 1967).



Şekil 1.7. *Deinococcus radiodurans*

*D. radiodurans*' ın 3.28 mb'lık genomu; 2,648,638 ve 412,348 bp'lik iki kromozom ve 177,466 ve 45,704 bp' lik iki plazmitten oluşmuştur (White, 1999). Genom 3,187 okunabilir bölge (ORFs) ve % 66.6 yüksek GC içeriğine sahiptir. (Moseley ve Schein, 1964) *D. radiodurans* DNA 'sında metil ya da metillenmiş baz ve DNA metiltransferaz aktivitesi (Dam\_ Dcm\_) (Schein, 1972) eksikliğini olduğu düşünülse Prasad ve arkadaşları (Prasad, 2005 ), *D.radiodurans* genomunda adenin metiltransferaz gibi aktivite gösteren N<sup>6</sup>-metiladeninin varlığını saptamışlardır. *D. radiodurans*' ın eksponensiyel fazındaki hücrelerinin ortalama DNA içeriği 3.4 x 10<sup>7</sup> bazdır ve her hücre, genomunun 10 kopyasını içerir (Driedger, 1970). Genomdaki kopya sayısı üremenin hangi aşamada olduğuna ve kültür ortamına bağlı olarak değişmektedir. (Gutman vd., 1994; Harsojo, 1981) Son yapılan çalışmalar zengin TGY

besi ortamında üreyen hücrelerin DNA içeriğinin minimal ortamda üreyen hücrelerinkinin yaklaşık olarak 2 katı olduğu gösterilmiştir (J. R. Battista, baskıda).

### 1.3.2. *D. radiodurans'* in Ekolojisi

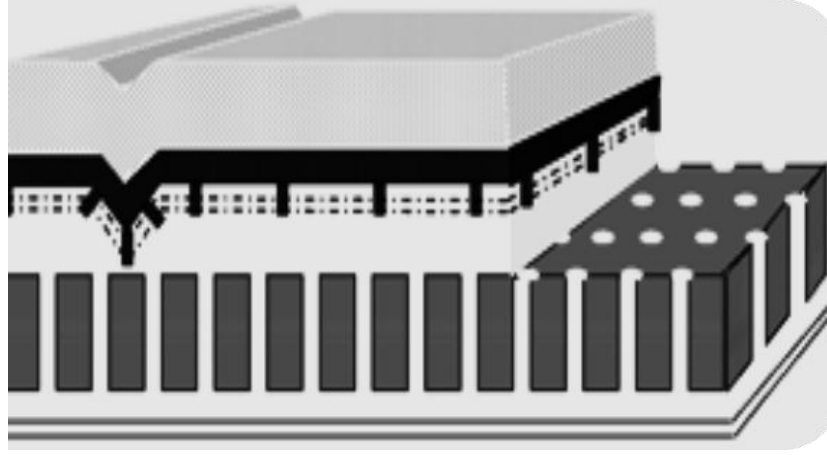
*D. radiodurans*, ilk kez Anderson ve arkadaşları tarafından Oregon' da gama ışınları uygulanmış konserve etten izole edilmiştir (Anderson vd., 1956). Morfolojik ve fizyolojik özelliklerine bakılarak bu bakteriye *Micrococcus radiodurans* adı verilmiştir (Raj, 1960). *M. radiodurans'* in, daha sonra Canada Ontario 'da bir hastanede havadan izole edilen Sark soyu ile morfolojik olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat 16S rRNA analizleri *M. radiodurans'* in bakterilerin benzersiz bir filogenetik grubunu oluşturduğunu ortaya koymuştur (Woese ve Stackebrandt, 1981). Bundan dolayı *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcaceae* adı verilen yeni bir familyada sınıflandırılmıştır (Brooks ve Murray, 1981). Şu ana kadar termofil, mezofil ve psikrofil üyeleri bulunan 43 *Deinococcus* türü tespit edilmiştir (Sanders ve Maxcy, 1979). Bu türler hayvan bağırsağı, kaplıcalar, çöller, alpler ve Antartika gibi çok çeşitli habitatlardan izole edilmiştir. Diğer bakteri sporlarının (ör: *Bacillus subtilis*) tersine kurutulmuş *D. radiodurans* yüksek nemi tolere etmez ve tüm *Deinococcus* türleri, özellikle iyonize radyasyon ve UV radyasyon gibi DNA' ya zarar veren ajanların öldürücü etkilerini tolere edebilme yeteneğine sahiptir (Battista, 1997).

### 1.3.3. *D. radiodurans'* in Fiziksel Yapısı

*D. radiodurans* Gram (+) olmasına rağmen hücre örtüsünün çok tabakalı yapısı (Lancy ve Murray, 1978; Thornley, 1965) ve lipit kompozisyonundan (Knivett, 1965; Work, 1964) dolayı Gram (-)' leri anımsatmaktadır. Gram (+) hücreler genellikle bir sitoplazmik membran ve bir mukopeptid ya da peptidoglikan içeren bir tabakaya sahiptir. Halbuki Gram (-) bakteriler lipopolisakkarit içeren bir dış membrana da sahiptirler. *D. radiodurans'* in hücre örtüsü, kalınlığı 150 nm' dir ve en az 5 tabakadan meydana gelmiştir.

- \* İç membran
- \* Peptidoglikan içeren holey tabaka
- \* Bölmeli tabaka
- \* Sitoplazmik membran

\* Hegzagonal paketlenmiş alt unitelerden oluşan S-layer (Lancy ve Murray, 1978; Work ve Griffiths, 1968).



**Şekil 1.8.** *D. radiodurans*' in hücre duvarının çok tabakalı yapısı

Holey tabaka, glukozamin, muramik asit ve 4 asıl amino asitten ( glutamik asit, alanin, glisin ve ornitin) oluşmaktadır (Work ve Griffiths, 1968). Hegzagonal paketlenmiş S- layer tabakası, karetenoidleri, lipitleri, proteinleri ve polisakkaritleri içermektedir. Polisakkaritler ramnoz ve mannoz izlerini taşıyan glukoz ve galaktoz içerir. Membran lipitlerinin % 43' ü alkilamin içeriğine sahip fosfoglikolipitlerden oluşmaktadır (Anderson ve Hansen, 1985). Genel olarak fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilkolin, ve fosfatidilinositol gibi bakteriyel fosfolipitler bulunmamaktadır (Thompson vd., 1980). Lipoproteinler esas olarak, çift sayılı, düz zincirli, baskın olarak palmitoleat içeren doymuş yağ asitlerinden oluşmaktadır (Girard, 1971 ). Fakat önemli miktarda bakterilerde yaygın olarak görülmeyen tek sayılı doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitlerine de sahiptirler (Knivett, 1965). Hücre membranının akışkanlığını arttıran doymamış yağ asitleri kuraklık boyunca meydana gelebilecek hacim değişikliklerine karşı uyum sağlamayı kolaylaştırmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri, siklopropil ve dallanmış zincirli yağ asitleri tespit edilmemiştir.

#### **1.3.4. *D. radiodurans* ' in Metabolik Özellikleri**

*D. radiodurans*, proteolitik yaşam stiline sahip organotrofik bir bakteridir (Makarova, 2007; Murray, 1986). *D. radiodurans*' in verimli bir şekilde üremesi için, bir karbon kaynağı, nikotinik asit, sülfür kaynağı, azot kaynağı ve mangan kaynağı gibi minimal besinsel ihtiyaçlara gereksinim duymaktadır. Amino asitler öncelikli karbon enerji kaynağı olarak tercih edilmektedir (He, 2009). Karbohidratlar ise fruktoz >

piruvat > laktat > glukoz > okzaloasetat > gliserol sırası ile kullanılmaktadır (Venkateswaran, 2000 ). Karbohidratlar muhtemelen megaplasmid üzerinde kodlanmış bir fosfoenolpiruvat fosfotransferaz sistemi yoluyla alınmaktadır (White, 1999). *D. radiodurans*, NAD biyosentezi için anahtar enzim olan ekzojen nikotinik asite bağımlıdır (Venkateswaran, 2000).

#### *D. radiodurans* ' ın

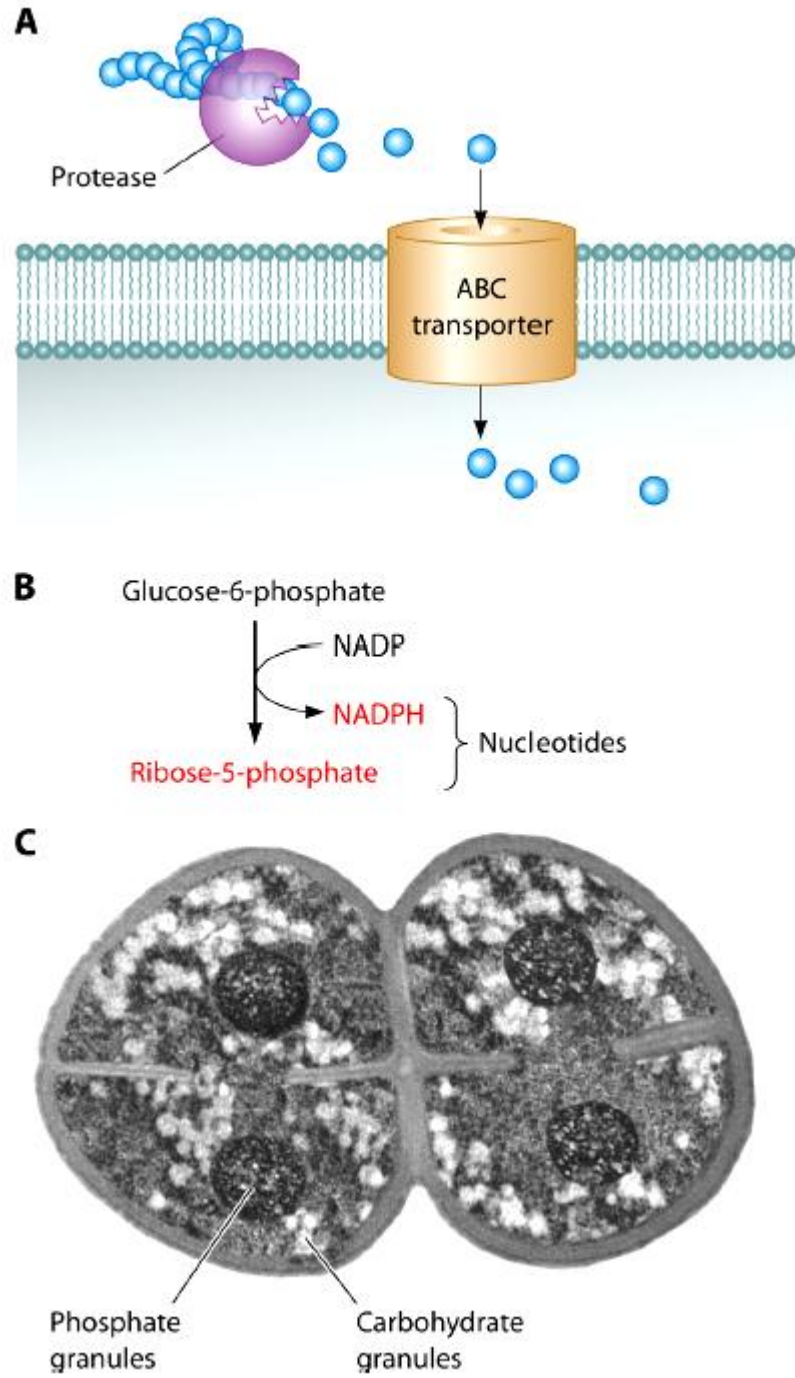
\* Proteoliziz ve ekzojen peptid ve amino asitlerin alınması, *D. radiodurans* enerjisinin büyük bir kısmını amino asit ve peptidlerin proteolizinden sağlanmaktadır.

\* Glukozun deoksinukleotit trifosfat (dNTPs) öncüllerine dönüşmesi Trikarboksilik asit döngüsünün (TCA) glioksilat bypassının induksiyonu ve Fe- S içeren enzimlerle solunum enzimlerinin sayısının redüksiyonu ile ROT üretiminin baskılanması

\* Metabolik bozukluklar hücrede metabolit birikimiyle sonuçlanır.

\* Karbohidrat ve polifosfatın granüler halde depolanması

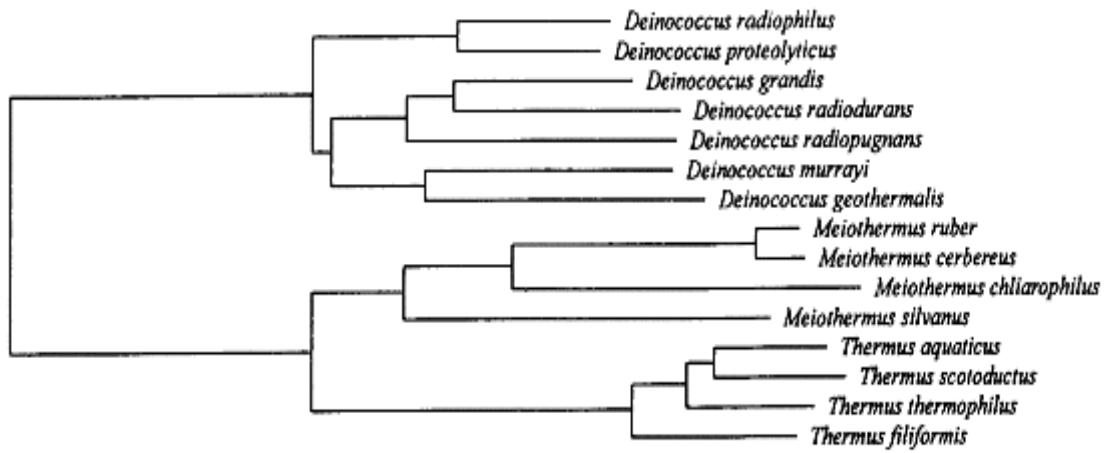
gibi çeşitli metabolik özellikleri onun oksidatif strese olan direncine katkı sağlamaktadır.



**Şekil 1.9.A:** Ekstraselüler proteolizis, **B:** Glukozun dNTPs' e dönüşümü için Pentoz fosfat yolu(PPP) **C:** Karbohidrat ve polifosfat granülleri

### 1.3.5. *D. radiodurans* ' ın Filogenisi

16S rRNA (Weisburg vd., 1989; Hensel vd., 1986; Woese, 1987) ve 5S rRNA dizi analizleri (Bakeeva vd., 1986) işaretli protein dizileri ve çeşitli korunmuş proteinlerin filogenetik analizleri (Gupta, 1998) sonucunda *D. radiodurans*' ın *Thermus thermophilus* ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Omelchenko, 2005). *D. radiodurans* ve *T. thermophilus* benzer GC içeriğine sahiptir, her ikisi de doğal olarak transforme olabilir, kırmızı pigmentli, spor oluşturmeyen, aerobik ve her ikisinde de A3 murein-tip peptidoglikana sahiptir.



**Şekil 1.10.** 16S rDNA - rRNA analizlerine göre filogenetik dendrogram (Battista vd., 1997).

*Deinococcus-Thermus* filumunun ortak atasının, bir mezofil ya da ılımlı bir termofil olduğu tahmin edilmektedir (Omelchenko, 2005; Makarova, 2001). Ortak atalardan ayrıldıktan sonra *Thermus* arke ve termofilik bakterilerden horizontal gen transferiyle yüksek sıcaklıklara adapte olmuş, *D. radiodurans* ise çeşitli bakterilerden stres cevap genlerini elde etmiştir. *Deinococcus-Thermus* filumuna özgü olan 65, sadece *Deinococcaceae* üyelerinde 206 protein (ör: PprA and DdrB), ve *D. radiodurans*' a özgü 399 protein bulunmuştur (Griffiths ve Gupta, 2007)



### 1.3.6. *D. radiodurans*' in Genetiği

*D. radiodurans* doğal yapıları nedeniyle eksponensiyel üreme fazında genetik manipülasyona uygundur. Transformatların sıklığı diğer bakterilerde sadece durağan faza girmeden maksimum düzeydeyken, (Ravin, 1961). *D. radiodurans*' da durağan faz süresince azalmaktadır ( Moseley ve Setlow, 1968; Tırgari ve Moseley, 1980). CaCl<sub>2</sub> (30 mM) transformasyon sıklığını 40 kez arttırmaktadır.

### 1.3.7. *D. radiodurans*' in DNA Zarar Direnci ve Tamir Mekanizması

*D. radiodurans*, İyonize radyasyon ve kuraklığın neden olduğu çift zincir kırıkları (DSBs), tek zincir kırıkları (SSBs) ve baz zararı gibi DNA ' ya farklı şekillerde zarar veren çeşitli ajanlara karşı direnç göstermektedir. MMC, DNA zincirleri arasında çapraz bağlara neden olmaktadır. UV radyasyon, çeşitli primidin dimerlerine ve hidrojen peroksit, metil metan sülfonat (MMS) *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidin (MNNG), nitroz asit, ve hidrokiamin gibi ürünlerin oluşumuna ve bu ürünlerde nukleotid zararını tetiklemektedir. *D. radiodurans*' in dayanabildiği DNA zararının çeşitliliği kullandığı tamir yolunun seçimiyle orantılıdır.

- \* Zararı direkt tersine çevirme
- \* Baz ve nukleotid eksizyon tamiri
- \* Mismatch tamir
- \* Rekombinasyonel tamir (Moseley ve Evans, 1983).

Fotoreaktivasyon ve translasyon sentezi bulunmaz. İyonize radyasyon, *D. radiodurans* genomunu çift zincir kırıkları ile birçok fragmente ayırmakla kalmaz hem de 10 kat daha fazla SSBs ve bir çok bölgede baz hasarına neden olmaktadır. Etkili bir eksizyon tamir sistemi, geniş substrat özgülüğü ile baz ve nukleotit hasarını tamir edebilmektedir. En önemli DNA hasarı olarak bilinen DSB'ler,, iki mekanizma ile ardışık olarak yamanır (Makarova, 2001).

\*Uzun sentez bağımlı iplikçik bağlanması (ESDSA).

\*Homolog rekombinasyon (Zahradka, 2006 ).

*D. radiodurans*, iyonize radyasyona *E. coli*' den 30 kat ve insandan 1000 kat daha dayanıklıdır. Ayrıca genom başına yaklaşık 200 DSBs ya da 190 çapraz bağı

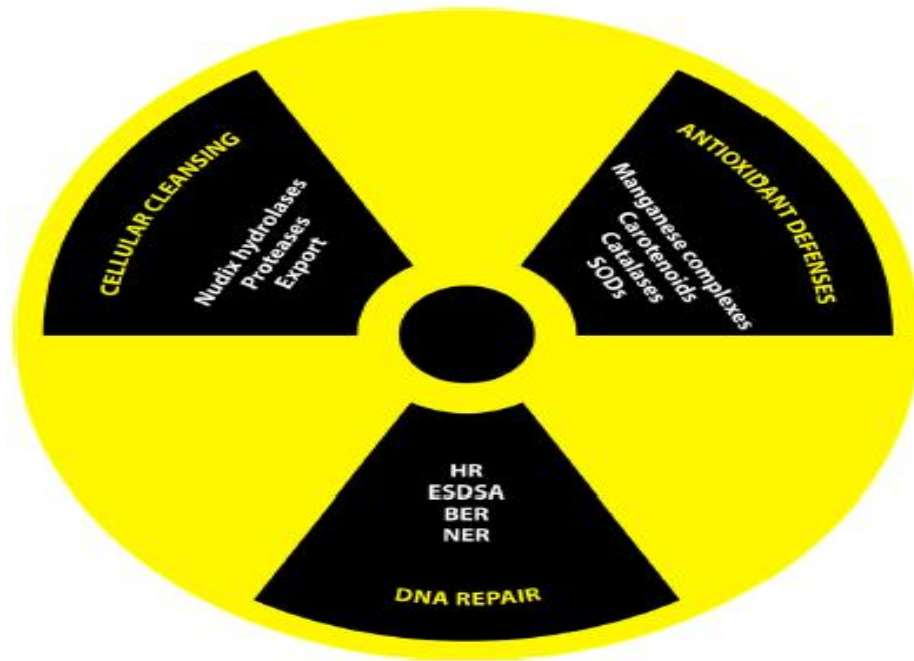
canlılık kaybı olmaksızın tamir edebilmektedir (Battista, 1997; Harsojo vd., 1981; Kitayama, 1982; Moseley ve Copland, 1975).

*D. radiodurans*, DNA'ya zarar veren ajanlara karşı sigmoidal hayatta kalma eğrileri göstermektedir. Bu organizmanın DNA zarar direncinde, DNA tamir kapasitesine katkıda bulunmaktadır. Şu ana kadarki genomik ve genetik analizler Deinococcal DNA tamir enzimolojisinin çok da olağanüstü olmadığını göstermiştir. Araştırmalar DNA tamir sistemlerinin *E. coli* ya da *Shewanella oneidensis*'den daha az kompleks olduğunu göstermiştir (Daly, 2009; Daly, 2004; Makarova, 2001; Makarova, 2007) ve *D. radiodurans*'daki radyasyona duyarlı DNA tamir mutantları tamamen ya da kısmen *E. coli* genleriyle bağlantılıdır. Fakat *D. radiodurans*'da DSB'lerin tamir mekanizması maya hücreleriyle benzerlik göstermektedir. (Daly vd., 1994; Daly ve Minton, 1995; Daly ve Minton, 1997; Slade, 2009; Zahradka, 2006). Fakat diğer organizmalarda bulunmayan ve *Deinococcus*'daki işlevi tam olarak tespit edilemeyen spesifik DNA tamir enzimlerinin evrimsel avantajları tam olarak bilinmemektedir. (Groot, 2009; Griffiths ve Gupta, 2007), *D. radiodurans*, 11 DNA gliksilaz, 2 UV tamir yolağı (UvrABC and UV zarar endonukleaz [UVDE]), 2 farklı SSB protein (Norais vd., 2009) ve nükleozit trifosfat pirofosforilazı içeren Nudix ailesine ait 23 gen kodlamaktadır. Yine de, *Deinococcus* alanındaki son gelişmeler bakterinin DNA zararına gösterdiği direnç düzeyinin oksidatif stresle mücadelede görevli enzimlerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Daly, 2009; Daly, 2007).

### 1.3.8. *D. radiodurans*'in UV-C Radyasyona Direnci

*D. radiodurans*, UV-C radyasyona (190- 280 nm) son derece dirençli bir organizmadır ve UV-C'nin tetiklediği siklobütan, primidin dimerleri (CPDs) ve primidin-(6-4) primidon (6-4 PPs) gibi biprimidin ışık ürünlerini (BPPs) etkili bir şekilde tamir edebilmektedir (Setlow ve Duggan, 1964). UV-C'e maruz kalmış *D. radiodurans*'ın en önemli primidin ürünleri primidin dimerleridir (Moeller, 2010). UV-C'nin tetiklediği DNA zararı iki nukleotit eksizyon tamir mekanizması. UvrABC ve UVDE (Minton, 1994; Moseley ve Evans, 1983) ve bir genetik rekombinasyon mekanizması ile tamir edilmektedir (Moseley ve Copland, 1975; Moseley vd., 1972) *D. radiodurans*'da UV-duyarlı DNA tamir mutantları: *recA*, *recO*, *polA*, *uvrA* ve *uvrE* mutantlarıdır (Earl vd., 2002; Tanaka, 2005; Xu, 2008). Halbuki UV'e maruz kalmış *E.coli*'de eksponensiyel canlılık kayıpları görülmektedir. *D. radiodurans*, 500 J/m<sup>2</sup>'lik

radyasyon dozuna dayanabilmektedir (Battista, 1997). *D. radiodurans* 'ın *E. coli*'e göre 20 kat daha dayanıklı olması hem DNA' sını BPPs' lere koruyabilmesinden hem de UV nin tetiklediği oksidatif zarara karşı proteinlerini koruyabilmesinden ileri gelmektedir (Krisko ve Radman, 2010). *D. radiodurans* ve *E. coli*' nin 500 J/m<sup>2</sup> lik doz uygulaması sonucunda iyonize radyasyonun tetiklediği DSBs' ler gibi UV' nin tetiklediği BPPs' lerde benzerdir., 14,000 ürün, 19,500 BPPs/ 10<sup>7</sup> baz meydana gelmektedir. Aradaki bu fark, *E.coli*'deki daha yüksek genomik primidin dinukelotit sıklığı ve daha düşük GC içeriği ile açıklanabilir (Moeller, 2010; Setlow ve Duggan, 1964).



**Şekil 1.11.** *D.radiodurans*' da iyonize radyasyon direncine katkıda bulunan faktörler (hüresel temizlik, antioksidan savunma ve DNA tamiri).

### 1.3.9. *D. radiodurans*' da Antioksidan Koruma

Genel olarak *D. radiodurans*' daki oksidatif protein zararı, radyasyona maruz kalmış veya kalmamış organizmada bulunan karbonilasyon düzeyi ile belirlenmektedir (Daly, 2007). Radyasyona dirençli *D. radiodurans* ve radyasyona duyarlı *E. coli* bakterilerinin her ikisinde de UV radyasyon dozuna bağlı olarak karbonillenmiş proteinlerin miktarı artış göstermekte ve canlı kalma oranları azalmaktadır (Krisko ve Radman, 2010). Karbonilasyon, oksidatif strese bir biyolojik belirteç olarak kullanılan

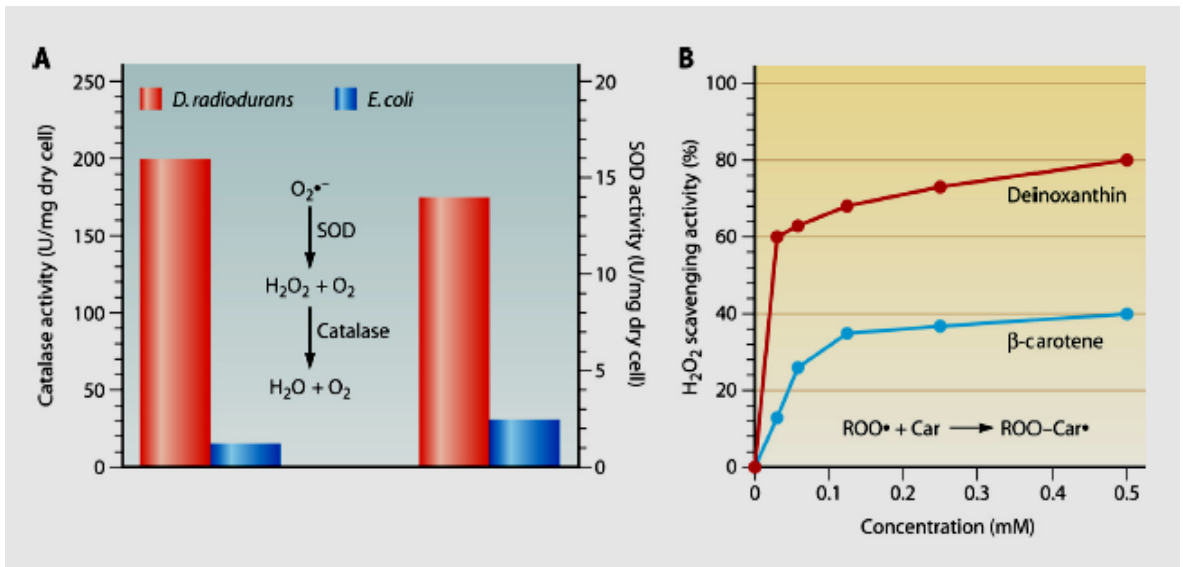
proteinlerin en yaygın oksidatif modifikasyonudur. Oksidatif zarara uğramış proteinlerin birikimi onların katalitik aktivitelerini ve etkileşimlerini değiştirerek hücrel fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümlerine neden olmaktadır. DNA tamir proteinlerinin oksidasyonu, DNA mutasyonlarıyla sonuçlanan hataya açık faaliyetlere neden olmaktadır (Daly, 2007). Yüksek oranda çeşitlilik gösteren antioksidan savunma sistemleri, protein oksidasyonuna engel olur ve Reaktif Oksijen Türlerini temizleyerek *D. radiodurans'* daki oksidatif stresi hafifletmektedir. *D. radiodurans'* daki antioksidan savunma makinesi, genel olarak 3 reaktif oksijen türüne karşı etkili olmaktadır.

\* hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ) (Dunford, 1987; Mello ve Meneghini, 1984)

\* süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ )

\* hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Imlay, 2006)

*D. radiodurans'* in  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  gibi reaktif oksijen türlerini temizleme kapasitesi, *E.coli'* den sırasıyla 30 kat, 17 kat ve 6 kat daha yüksektir (Tian 2004). Enzimatik ROT temizleyicileri; 3 katalaz, 4 süperoksit dismutaz ve 2 Dps proteini ile enzimatik olmayan iki değerlikli mangan kompleksleri ve karetenoid aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.



**Şekil 1.12.** *D. radiodurans'* da Enzimatik (A) (Tian, 2004) ve Enzimatik olmayan (B) (Tian vd., 2007) antioksidan savunma.

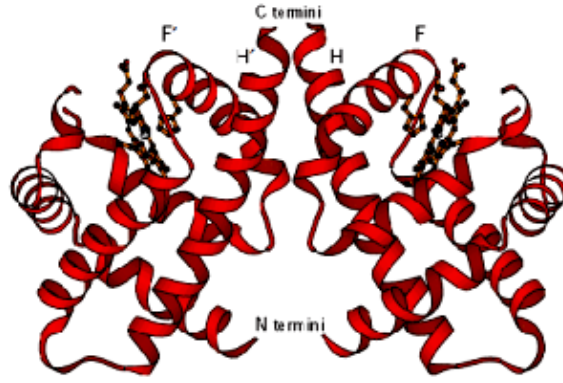
*D. radiodurans* oldukça yüksek katalaz ve SOD aktivitesine sahiptir. (Lipton, 2002). Katalazlar ve peroksidazlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' i uzaklaştırırken SOD' lar hücrelerden süperoksit radikallerini elimine etmektedirler. *D. radiodurans*, *katE* katalazları DR1998, DRA0259 ve ökaryotik tip DRA0146 olmak üzere 3 tip katalaz, Mn-bağımlı DR1279, Cu/Zn-bağımlı DR1546, DRA0202 ve DR0644 olmak üzere 4 tipte SOD 'u kodlayabilmektedir. Aynı zamanda sitokrom-c peroksidaz (DRA0301) ve bir Fe-bağımlı peroksidaz (DRA0145) bulunmaktadır (Makarova, 2001). *D. radiodurans* katalaz (DR1998) ve süperoksit dismutaz (DR1279) mutantları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and paraquata 16 kGy' dan daha düşük radyasyon dozlarında nispeten daha duyarlıdır.(Markillie vd., 1999).

*D. radiodurans* ayrıca glutaredoksin, tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve alkil hidroperoksit redüktaz gibi diğer oksidatif savunma proteinlerini kodlayabilmektedir. Glutasyon, Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz bulunmamaktadır (White, 1999).

*D. radiodurans*, sadece % 14 dizi özdeşliğine sahip Dps1 (DR2263) ve Dps2 (DRB0092) olmak üzere 2 tip Dps homologunu kodlayabilmektedir. Dimerik yapıdaki Dps1 proteini DNA' yı ·OH radikallerine karşı korumaktadır (Grove ve Wilkinson, 2005), bu özellik Dps 2 için de geçerlidir. Çünkü Dps2 mutantlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e duyarlı oldukları görülmüştür (Yan vd., 2007). Dps1 ve Dps 2 ' nin iyonize radyasyon sonrası üretimi artmaktadır. (Lin, 2003; Tanaka, 2004) *E.coli* Dps proteinleri, Nucleoit bütünlüğü yanında DNA' ya bağlanarak DNA'ı oksidatif zarardan korumaktadır. Fe <sup>+2</sup> iyonlarını şelatlar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i H<sub>2</sub>O' a indirgemektedir (Almiron vd., 1992; Martinez ve Kolter, 1997).

#### **1.4.. Vitreoscilla Hemoglobin ve Oksidatif Stres**

Hemoglobinler, 1986 yılına kadar ökaryotik orjinli proteinler olarak bilinmekteydi. Ancak Dr. Webster ve arkadaşları Gram (-) bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*' nın doğal olarak hemoglobin içerdiğini tespit etmişlerdir (Wakabayashi vd.,1986). Beggiatoaceae familyasında bulunan *Vitreoscilla* zorunlu aerob, Gram (-) ve kemoorganotrof filamentli bir bakteridir. Zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır ve bu koşullarda yaşamını sürdürebilmek için hemoglobin (*vgb*) genini sentezlemektedir (Woose vd., 1984).



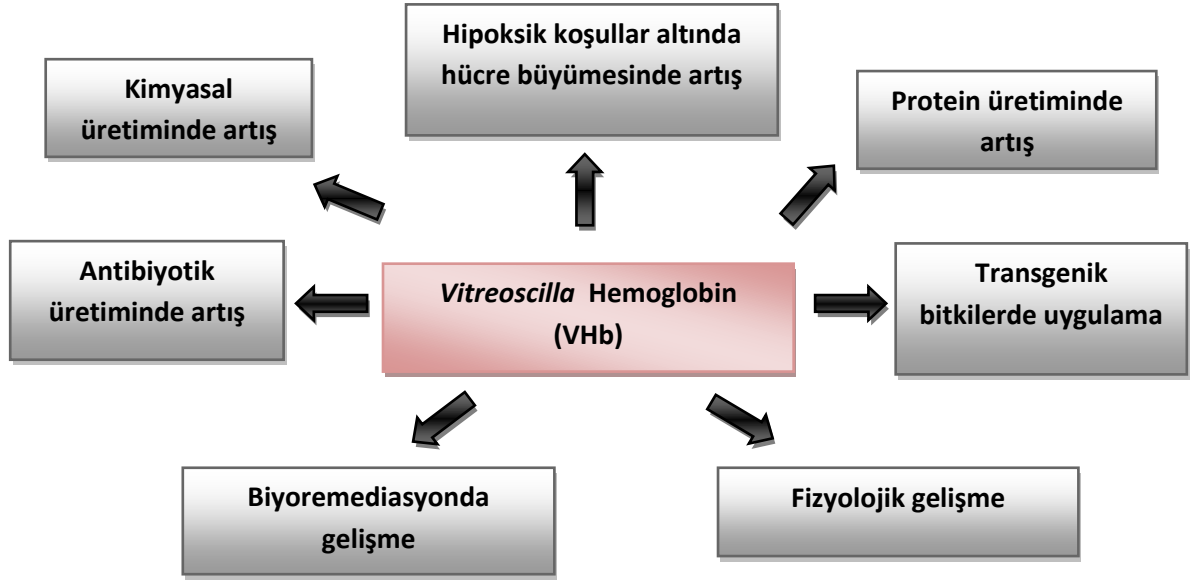
**Şekil 1.13.** *Vitreoscilla* hemoglobininin yapısı

*V. stercoraria'* dan alınan bakteri hemoglobin geni, hipoksik koşullarda yaşayan bakterilere aktarıldığında bu bakterilerin gelişimini, protein sentezini, metabolit üretimini strese direncini geliştirmekte ve bakteri için faydalı ürünlerin üretimini arttırmaktadır (Zhang, 2007; Khosla ve Bailey, 1988). Ayrıca zararlı bileşiklerin etkisinin azaltılmasında da önemli etkisinin olması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar için çok büyük önem taşımaktadır (Stark vd., 2011). *Vitreoscilla* hemoglobin teknolojisinin çeşitli biyoremediasyon uygulamaları Tablo 1.3' de verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** vgb/VHb teknolojisinin biyoremediasyon uygulamaları

Organizma	Biyoremediasyon	Referans
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Benzen, toluen, ksilen	Kahraman ve Geçkil, 2005
<i>Burkholderia cepacia</i>	2-klorbenzoat	Demirtaş vd., 2005; Demirtaş vd., 2006
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Cd	Khleifat vd., 2006
<i>Gordonia amarae</i>	Biyosülfaktan	Doğan vd., 2006
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Dibenzotiofen, sülfür (dizel yağından)	Xiong vd., 2007
<i>Pseudomonas putida</i>	Benzen, toluen, klorobenzen	Ouyang vd., 2007
<i>Pseudomonas diafieldii</i>	sülfür (dizel yağından)	Li vd., 2006

*Vitreoscilla* hemoglobininin (VHb) ökaryotik hemoglobinlerle yüksek homoloji göstermekte olup molekül büyüklüğü 15,775 Dalton' dur. 146 amino asitten oluşan VHb benzer iki alt üiteden oluşmaktadır. Farklı yapısal organizasyonu ve konformasyonu durumlarında kalma yeteneği gösterebilmesi onun birden fazla işlevi gerçekleştirebilmesine imkan sağlamaktadır ( Liu, 2008).



**Şekil 1.14.** *Vitreoscilla* hemoglobininin potansiyel uygulamaları (Wei ve Chen, 2008)

Yapılan son çalışmalarda VHb ve transkripsiyon faktörü OxyR (oksidatif strese gerekli bir regülonu kontrol etmektedir) arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. VHb hem endojen oksidatif türlerin üretimine hem de eksojen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e karşı bir savunma gücü oluşturduğu aynı zamanda süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerinin seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir (Akbas vd., 2011).

### 1.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, pro-oksidanlarla, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortamda artmasına engel olan antioksidanların savunma yeteneği arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. (Wells vd., 1997). Oksidatif stres bir oksidatif patlama ya da süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijen ve hidrojen peroksit radikali gibi ROT 'nin yüksek oranda hızlı ve geçici üretimi olarak da tanımlanabilmektedir. (Halliwell ve Gutterdige, 2007). ROS üretimi, çeşitli dış faktörler tarafından tetiklenen doğal bir olgudur ve (Rijstenbil vd., 1994) genellikle

organizmanın normal büyüme koşullarında indirgenmiştir (Ferrat vd., 2003). Oksidatif patlama direkt olarak çeşitli kirletici unsurlarla ya da dolaylı olarak bunların metabolizması sonucu indüklenmektedir (Droege, 2002). Organik bileşiklerin ve geçiş metallere pro-oksident olabileceği ve oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırabileceği gösterilmiştir. (Halliwell ve Gutteridge, 2007), Bu oksijen radikallerinin artışı, lipid peroksidasyonunda ve membran bütünlüğünün kaybında da artışa neden olmaktadır (Rijstenbil vd., 1994).

### **1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri**

Reaktif Oksijen Türleri terimi, oksijen radikallerini ve oksitleyici ajan ya da radikallere dönüşebilen bazı radikal olmayan türleri ( $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) içermektedir. Tüm oksijen radikalleri reaktif oksijen türleridir ancak reaktif oksijen türlerinin tümü oksijen radikali değildir. ROT'nin tümü 3 temel mekanizma ile oluşmaktadır;

#### **1.5.1.1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması**

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler.

#### **1.5.1.2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi**

Radikal özellik göstermeyen bir molekülden elektron kaybı sonucu dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur.

#### **1.5.1.3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi**

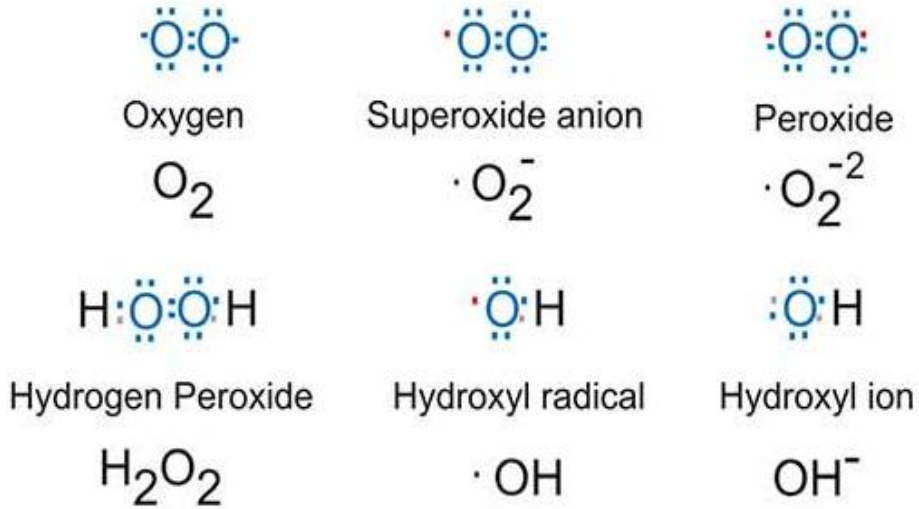
Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.



**Çizelge 1.3.** Reaktif oksijen türleri

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz Asit, $HOCl$
	Hipobromöz Asit, $HOBr$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, $O_3$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet Oksijen, $\Delta g O_2$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	

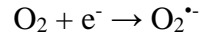
Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) dir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).



**Şekil 1.15** Reaktif oksijen türleri

### 1.5.2. Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

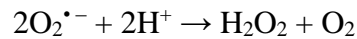
Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, süperoksit anyonu meydana gelmektedir. Süperoksit radikali hidroksil radikalinden daha az reaktiftir. Sulu çözelti halindeyken biyolojik moleküllerin çoğuyla reaksiyona girmez ancak diğer radikaller ya da radikal olmayan türlerle reaksiyona girmektedir ve diğer radikallerin oluşumunu tetiklemesi açısından önemli bir kaynaktır.



Süperoksit radikali, ksantoksinler gibi ajanlarla, ksantin oksidaz'ın rol aldığı enzimatik tepkimelerle, bazı oksidaz tepkimelerinde, fagositoz sırasında, elektron transport sistemi sırasında endojen eksojen kaynaklarla oluşmaktadır. Süperoksit radikali, SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyon reaksiyonu ile temizlenmektedir (Halliwell vd., 1992).

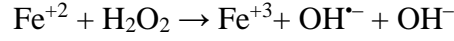
### 1.5.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit serbest radikal olarak değerlendirilmemesine karşın biyolojik membranlara penetre olabilmeye özelliğinden dolayı oldukça önemlidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, daha reaktif ROS moleküllerinin üretiminde bir aracı rol oynamaktadır. Moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşmaktadır. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) meydana getirir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membranlardan geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır (Halliwell vd., 1992).



### 1.5.4. Hidroksil Radikali (•OH)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metallere varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir.



Son derece reaktif ve zararlı bir oksidan moleküldür. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasarlara neden olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına yol açar (Halliwell vd., 1992). Hidroksil radikalının diğer bir kaynağı ise iyonize radyasyondur. Yüksek enerjili radyasyona maruz kalınması, suyun homolitik fizyonu ile hidroksil radikallerinin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu radikaller hücrede DNA, protein ve lipitlere zarar vermektedir (Betteridge, 2000).

### **1.6. Serbest Radikallerin Etkileri**

Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom p450) peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Araştırmacılar, insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikal hücumuna uğradığını belirtmektedirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleustaki genetik kodu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asite (DNA) etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).

### **1.7. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Elemanları**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları

etkisiz hale getirenler şeklinde de gruplandırılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Akkuş, 1995).

**Çizelge 1.4.** Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

<b>Enzimatik Antioksidanlar</b>	<b>Enzimatik Olmayan Antioksidanlar</b>	
	<b>Doğal</b>	<b>Sentetik</b>
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)	$\alpha$ - tokoferol	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Katalaz	Karotenoidler	Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)
Glutatyon redüktaz (GR)		Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

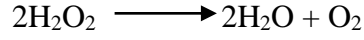
### 1.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz, dismutasyon reaksiyonu ile süperoksit anyon radikallerini dismutasyonunu moleküler oksijen ve hidrojen peroksite katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan metalloenzimlerdir. SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defanstır. SOD'un fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Fridovich, 1973; Lavelle vd., 1973; Petkau vd., 1975; Sheng vd., 2004). Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

### 1.7.2. Katalaz

Katalaz, peroksidomlarda lokalize ve yapısında 4 "hem" grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığı ile oluşan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın en reaktif tür olan HO-

radikalinin öncülü olması nedeniyle en fazla oksidatif hasara sebep olur. Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalar:



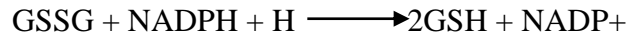
### 1.7.3. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfür) oksidasyonunu katalize ederken, hidrojen peroksiti de suya dönüştürür (Demirsoy vd., 2003).



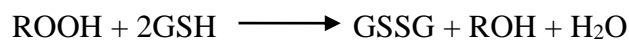
### 1.7.4. Glutasyon redüktaz (GR)

GPx tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve diğer lipid peroksitlerin indirgenmesi esnasında glutasyon okside glutatyona dönüşmektedir. Bu okside halin tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında glutasyon disülfiti (GSSG) tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirir:



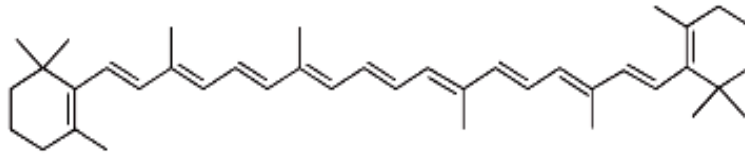
### 1.7.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler:



### 1.7.6. Karoten

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan karoten, yağda çözünebilir doğal antioksidanlardır. 600'den fazla karotenoid çeşidinin var olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoidden oluşmaktadır. Başta singlet oksijen ve peroksi radikalleri (ROO<sup>•</sup>) olmak üzere ROT türlerine karşı etkili bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (Stahl ve Sies, 2003; Tatsuzawa vd., 2000). Karotenoidler, DNA'yı oksidatif zarardan, proteinleri karbonilasyondan ve membran lipitlerini lipit peroksidasyonundan korumaktadır (Stahl vd., 1998; Zhang ve Omave, 2000). *D. radiodurans*'ın hücre içi karotenoidleri, (•OH, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) gibi ROT (Zhang vd., 2007; Tian vd., 2007) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil gibi RNT (Reaktif Nitrojen Türleri)'ni ortamdan temizleyebilmektedir. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, yapısındaki konjuge çifte bağlardan ileri gelmektedir. Şekil 1.16'da β-karotenin kimyasal yapısı görülmektedir. *D. radiodurans* bakteriyeye turuncu rengini veren çok miktarda karoten sentezlemektedir. Carbonneau vd., *D. radiodurans*'ın renksiz mutant soyunun indüklenmiş oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türlerine yabancıla oranla daha duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 1.16. β- Karotenin moleküler yapısı (Tian vd., 2007)

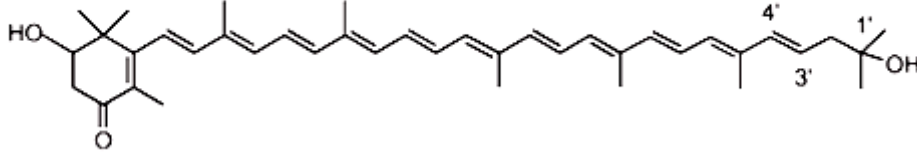
#### 1.7.6.1. Deinoksantin

*D. radiodurans*'da karotenoid biyosentezinde görevli 13 gen bulunmaktadır. Deinoksantin, karotenoid sentez yolağındaki önemli bir üründür. Deinoksantin, likopen ve β-karoten ya da ksantofiller (zeaksantin ve lutein) gibi diğer karotenlere göre daha güçlü bir radikal temizleyicisidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleme kapasiteleri,

Deinoksantin > Likopen > Lutein > Zeaksantin > β- Karoten olarak sıralanmıştır.

Deinoksantin aynı zamanda diğer karotenoidlere göre daha yüksek <sup>1</sup>O<sub>2</sub> temizleme kapasitesine sahiptir. Deinoksantin yüksek antioksidan aktivitesi diğer karotenoidlerden farklı olan kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Yapılarındaki

konjuge çift bağların uzunluğu ve bağlantı bölgeleriyle fonksiyonel grupların varlığı bu yüksek antioksidan aktivitesini desteklemektedir (Albrecht vd., 2000). Karotenlerin ROT temizleme aktiviteleri, konjuge çift bağlı moleküler orbitallerinin uzunluğu ve maksimum örtüşmesine bağlı olarak değişmektedir.



**Şekil 1.17.** Deinoksantin' in moleküler yapısı (Tian vd., 2007)

Deinoksantin'in diğer bir görevi de, plazmit DNA' sı üzerinde OH- iyonlarının meydana getirdiği süpersarmal plasmid oluşumunu engelemek amacıyla koruyucu rol üstlenmesidir.(%20'). Bu sayede plazmitte meydana gelecek kırıklar engellenmektedir (Tian vd., 2007).

Bu çalışmada, yabancı *D. radiodurans* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşu kullanılmıştır. Bu sayede *D. radiodurans*' in Cd ve Cr gibi toksik metal biyosorpsiyon kapasitelerine ve UV radyasyon direnci araştırılıp, bunlara ek olarak organizmaya daha fazla oksijenli ortam sağlayarak daha fazla büyümesini sağlayan *vgb* geninin, bakterinin biyosorpsiyon yeteneğine ve UV direncine yapacağı katkının araştırılması planlanmıştır. Aynı zamanda UV radyasyon uygulamalarının yabancı ve rekombinant *D. radiodurans*' in antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve karoten) üzerine etkisi araştırılıp, *vgb*' nin bu savunma sistemine etkileri saptanacaktır. Çünkü hem toksik metallerin giderimi hem de UV' nin hücrel zararına karşı antioksidan savunma mekanizmalarında, oksijen gerektiren çeşitli oksijenaz ve deoksijenazlarla katalizlenen, etkin bir oksijen alımı ve kullanımını sağlayan *vgb* geni aktarılmış rekombinant bakterinin daha etkili olacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda radyasyona dirençliliğiyle Guinness rekorlar kitabına girmiş *D. radiodurans*' in *vgb*/VHb sisteminin rekombinant suşlarında UV-C direnci ve metal biyosorpsiyon kapasitesine etkisi ve organizmanın bundan nasıl etkileneceği ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *D. radiodurans* 'ın Ağır Metal Giderimine Yönelik Çalışmalar

Metal bağlama kapasitesine sahip biyokütle türleri üzerindeki çalışmalar 1985'ten beri hız kazanmıştır. Bazı biyokütle türleri gerçekten ağır metal akümülyasyonunda çok etkilidirler. Arıtma amacıyla kullanılan biyokütlelerin seçiminde kolay elde edilebilirlik önemli bir faktördür. Biyokütlenin doğada kolay bulunabilen hatta atık maddelerde bulunan türleri tercih edilmelidir. Bazı biyosorbentler herhangi bir öncelik olmaksızın ağır metalleri bağlayabilmesine rağmen bazıları sadece belli tip metalleri bağlayabilmektedir.

Metal biyosorpsiyonunda kullanılacak biyokütleler seçilirken göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktör biyokütlenin kökenidir. Endüstriyel atıklardan veya doğadan elde edilebilen, ve hızlı üreyen mikroorganizmalar seçilmelidir.

Frederickson ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada *D. radiodurans* RI soyunun Fe (III), Cr (VI), U (VI) ve Tc (VII) gibi metalleri indirgeme kapasitelerini araştırmak amacıyla anaerobik koşullarda kültür ortamlarına bu metalleri indirgeyici bazı elektron alıcı ve verici substratlar (Piruvat, laktat, süksinat, asetat, AQDS (anthraquinone-2,6-disulfonate) ilave etmişlerdir. *D. radiodurans* bu substratlardan laktatın varlığın da laktatı CO<sub>2</sub>' e oksiteleyerek Fe (III)' i de Fe (II) ' e indiregeyebilmiştir. Yine piruvat Fe' in redüksiyonunda laktat kadar iyi sonuç vermiştir. U (VI) ve Tc (VII) gibi metallerin indirgenmesi için de ortama AQDS ilave edilmiş ve sonuçta % 95-100 oranında bir indirenme sağlanmışır. *D. radiodurans* Cr (VI) ' i ortama herhangi bir substrat ekmeden direkt olarak % 72 oranında Cr (III)' e indirgeyebilmiştir ve AQDS varlığında bu indirgeme kapasitesi daha da artmıştır. Bu sonuçlar metal ve radyoaktif metal kirliliğinin olduğu alanlarda metal remediasyonunun potansiyel uygulanabilirliği kanıtlanmıştır (Frederickson vd., 2000).

Joe vd., 2011' in çalışmasında, *D. radiodurans*'ın Cd<sup>+</sup> un subletal konsantrasyonunun (100 µM) etkisini tam-genom mikroarray yöntemi kullanarak karakterize etmişlerdir. Genel gen ifade profili , toplam 3.116 ORFs geninin haricinde 1.505 genin varlığını göstermiştir. Bu genlerin Cd uygulamasına cevapta çok kısa bir süre içinde 2 kattan daha fazla sayıda sentez edilmişlerdir. Bu genlerin büyük bir çoğunluğu Fe alınımı, sistein biyosentezi protein disülfid stresi ve çeşitli DNA tamir



sistemleriyle ilgilidir. Sistein biyosentezinde ve disülfid stresinde genlerin sentezinin artması, Cd'ın sülfür bileşiklerine yüksek affiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Demir desteği ile Cd ile uygulanan hücrelerin demir eksikliği ve yeniden büyümeye başlamasının teşviki, [Fe-S] kümeleri gibi demir-sülfür içeren proteinlerde CdS formlarının varlığını da göstermişlerdir. Baz eksizyon, mismatch, ve rekombinasyonel tamir sistemlerinin indüklenmesi, çeşitli tipteki DNA hasarlarını özellikle de Cd uygulaması ile artan baz eksizyonunu ortaya çıkarmıştır. Subletal Cd uygulaması, hücrelerin üreme oranını azalttığı gibi hücre membranı, translasyon ve transkripsiyon gibi hücre büyümesiyle ilgili genlerin sentezinde baskılar. 52 düzenleyici genin farklı sentezi, Cd uygulamasında kompleks düzenleyici bir sistemin varlığını göstermektedir. Bu sonuçlar *D. radiodurans*'ın Cd maruz kalma etkisini ve ilgili genlerin bu stres durumunda nasıl sentezlendiğini ortaya çıkarmıştır.

Yapılan bir çalışmada iyonik civa içeren radyoaktif atıkların temizlenmesinde radyasyona dirençli *D. radiodurans* kullanılmıştır. Minton vd. (2000) *Escherichia coli*'den merA geni transfer edilmiş *D. radiodurans*'ın radyoaktif alanlardaki Hg'i indirgeyebilme kapasitesini araştırmışlardır. Bu amaçla yüksek oranda karakterize edilen merA geni *E. coli*'den *D. radiodurans*'a klonlanmıştır. merA geni tarafından kodlanan Civa redüktaz enzimi, yüksek oranda toksik ve tiyol reaktifi Hg (II)'i daha az toksik olan, elementsel olarak kararlı ve uçucu Hg (0) formuna dönüştürmektedir. *D. radiodurans*'da merA geninin dört farklı sentez sistemi geliştirilmiş ve çeşitli hücrel gen düzeylerinde regülasyonları sağlanmıştır. MerA sentezleyen *D. radiodurans* soylarının 6000 rad/saat dozda ve 30– 50 µM Hg (II) varlığında civanın bakteriosidal etkisine karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bu soyların yüksek düzeyde Hg ve radyasyonlu atık alanlarında gelişebildiği gösterilmiş ve Hg II 'yi etkili bir şekilde daha az toksik olan, buharlaşabilen Hg (0) elementine dönüştürdüğü tespit edilmiştir.

Vido ve arkadaşları (2001) *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile yaptıkları çalışmada, Cd (II) stresine maruz bıraktıkları maya hücrelerinin bu stres koşuluna hücrel yanıtını proteom analizi ile belirlemişlerdir. Araştırmada, *S. cerevisiae* hücreleri ağır metal stresine cevap olarak 54 proteinin sentezini arttırırken, 43 proteinin sentezini azaltmıştır. Çalışmada, özellikle sülfür içeren aminoasitlerin biyosentezi ile ilgili enzimlerin yapımının arttığı görülmüştür. Aynı zamanda araştırmacılar, glutatyon sentezi ile antioksidant özelliğe sahip bazı proteinlerin Cd (II) iyonları ile muamele edilen maya hücreleri tarafından daha fazla sentezlendiğini göstermişlerdir. Çalışmada, tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktaz gibi proteinlerin yapımı da ağır metal içeren

ortamda artmıştır. Araştırmacılar sentezi artan bu proteinlerin *S. cerevisiae* mayasının Cd (II) iyonlarına karşı hücrel savunma mekanizmasında esansiyel olduğunu bildirmişlerdir

Brim vd. (2006), toluen ve diğer hidrokarbonların yıkımını tamamlamak için ağır metaller içeren bu ortamlardan Cr (IV)'un indirgemesinde *D. radiodurans*'ı kullanmıştır. *D. radiodurans* Cr (IV)'u daha az toksik olan Cr (III)' e doğal olarak indirgeyebilmektedir. Toluenin yıkımı için *Pseudomonas putida*'dan tod ve xyl genleri bakteriye klonlanmış ve rekombinant Tod/xyl soyunun <sup>14</sup>C etiketli toluenin karbon dioksit ve hücrel makromoleküllerle birleştiği gösterilmiştir. Bakterinin kronik iyonize radyasyon varlığında veya yokluğunda kompleks besi veya minimal ortamlarda tolueni okside edebildiği ve Cr (IV)'u indirgeyebildiği ve Cr (III) 'e dönüştürebildiğini saptamışlardır.

Özer ve Özer tarafından (2003) yapılan çalışmada, *S. cerevisiae* mikroorganizması ile Cr (VI)'nın giderimi için en uygun ortam koşullarını araştırmışlardır. Biyosorpsiyon için en uygun pH değeri 1 olarak bulunmuştur. Sıcaklık deneylerinde 15-25 °C arasında biyosorpsiyonun belli bir sıcaklığa kadar arttığı fakat sıcaklık artmaya devam ettikçe artan sıcaklık ile azaldığı bunun sebebinde artan sıcaklık ile biyokütle aktif sitelerin zarar görmüş olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu koşullara göre optimum sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Çalışmada başlangıç metal iyonu konsantrasyonu 200 mg/L, biyokütle miktarı da 1g/ L kullanılmış ve elde edilen deneysel veriler Langmuir izotermine uygulandığında Qmax değeri 32,6 mg/g olarak bulunmuştur. *S. cerevisiae* üzerine Cr (VI) biyosorpsiyonun tek tabakalı gerçekleştiği ve hesaplanan entalpi değerine göre de (-2,890 kcal/mol) biyosorpsiyonun egzotermik ve fiziksel olarak gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Nakiboğlu Kang ve ark. (2007), *Pseudomonas aeruginosa* biyokütlesi ile Cr (III) ve Cr (VI) iyonları biyosorpsiyonunu araştırmışlardır. Biyosorpsiyon kapasitesini ve izoterm modellerini elde edebilmek için kesikli sistemde çeşitli başlangıç konsantrasyonları ile çalışma yapmışlardır. Buna göre *P. aeruginosa* ile Cr (VI) için Freundlich modelleri uygun bulunurken Cr (III)'ün en iyi Langmuir izoterm modeli tarafından açıklanacağı bulunmuştur. FT-IR analizi sonuçları bakteri hücre yüzeyindeki krom bağlayıcı bölgelerin büyük olasılıkla karboksil ve amin grupları olduğunu ve bu gruplara krom iyonlarının bağlanmasında kompleksmenin etkin olduğunu göstermiştir

## 2.2. *D. radiodurans* 'ın UV-C Direncine Yönelik Çalışmalar

Chen vd., 2000 *D. radiodurans* genomunun 60 kDa büyüklüğünde bir otoantijen olan ve Ro olarak adlandırılan bir RNA bağlayıcı protein içerdiğini tespit etmişlerdir. Önceleri yalnızca yüksek yapılı ökaryotlarda olduğu düşünülen bu protein, Y RNA olarak bilinen RNA 'ların küçük alt ünitesine bağlanmaktadır. Ro proteininin ortoloğu Rsr *D. radiodurans*' ın UV radyasyona olan direncine katkıda bulunmaktadır. Rsr, RNA' nın çeşitli küçük alt ünitelerini bağlar ve rsr ' i kodlamaktadır, UV radyasyonun akabinde bu rsr sentezlenerek birikmeye başlar. Bu sonuçlar Ro RNPs ' nin hücrede UV radyasyonu takiben hücresel savunmada rol oynadığını ortaya koymuştur.

*D. radiodurans* ' ın gama ( $\gamma$ ) radyasyonun akut dozlarından etkilenmemesi, DNA çift zincir kırıklarını tamir eden etkin bir homolog rekombinasyonu içeren bifazik bir mekanizma ile gösterilmiştir. Fakat bazı bakterilerde DNA zincir kırıklarını tamir eden enzim (RecBC ) mutantının, *E. coli* ' den daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Rekombinant *Deinococcus* ' da, *E. coli* ' nin *recBC* genini ifade edildiğinde UV toleransının 3 kat daha arttığı tespit edilmiştir. *D. radiodurans*' ın radyasyona olan cevabında RecBC 'nin aşırı ifadesi RecD' den bağımsızdır.  $\gamma$  radyasyon toleransının eksikliği in vivo degradasyon oranının artmasına katkıda bulunmaktadır. *Deinococcus* hücrelerinin UV maruziyetine bağlı olarak RecBC sentezleyebildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, RecBC' nin aşırı üretiminin gama radyasyonun zarar verdiği DNA tamir mekanizmasıyla rekabet içinde olduğunu desteklemektedir (Khairnar vd., 2008).

## 2.3. *D. radiodurans* 'ın Antioksidan Enzim Kapasitesine Yönelik Çalışmalar

Sheng vd., 2005 yılında yaptıkları çalışmada radyasyonun neden olduğu reaktif oksijen türlerine direnç gösterebilen *D. radiodurans*' da *reX* (dr1310) geninin mutasyonu ile reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizması artırılmıştır. Ayrıca *reX*' in bu bakteride aşırı ifadesi antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde baskılamıştır. Radyasyona maruz bırakılmayan hücrelerde mutant *D. radiodurans* yabanıla göre 2.16 kat ROT süpürücü etkiye sahiptir. Diğer taraftan *recX*+/*DR1* soyu yabanıla göre daha düşük ROT süpürücü etkiye sahiptir. Radyasyondan sonra mutant soyda radikal süpürücü etki tetiklenmemiştir. Hücrelerdeki iki önemli antioksidan proteinler olan süperoksit dismutaz ve katalaz analizleri sonucu *reX* ' in antioksidan enzimlerin üretimini baskıladığı ve *D. radiodurans*' da ROT savunma sistemini negatif olarak regüle ettiğini ve bu etkinin radyasyon ile azalabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Yun ve Lee (2001) yaptıkları bir çalışmada, elektroforetik özellikleri ve metal kofaktörlerine bağlı olarak yüksek UV-dirençli bakteriler olan *D. radiodurans*, *D. grandis* ve *D. proteolyticus* gibi *Deinococcus* türlerinde süperoksit dismutaz (SOD)' in elektroforetik ayrıştırması ile birden fazla süperoksit dismutaz (SODs) formunu ortaya çıkarmıştır. *D. radiophilus* ve *D. radiopugnans*' da tek tip SOD, *Deinococcus radiodurans*' da MnSOD, FeSOD ve Mn / FeSOD bulunmaktadır. metal kofaktör yapılarına bağlı olarak çeşitlilik gösteren her bir mezofilik *Deinococcus* türündeki SOD profili, *Deinococcus* türlerinin belirlenmesinde önemli olmaktadır.

Tian vd., (2007), reaktif oksijen türlerine yüksek direnç gösteren *D. radiodurans*' da karotenin bu dirençteki katkısı araştırılmıştır. Bunun için *D. radiodurans*' da mutasyonla karotenoid sentez yolağını fitoen sentaz geni bloke edilerek çevresel stres altında hücrelerin hayatta kalma dereceleri değerlendirilmiştir. *D. radiodurans*'ın renksiz mutanı R1ΔcrtB, karotenoid sentezinde başarısız olmuştur ve yabancı tipe göre iyonize radyasyon, hidrojen peroksit ve kuraklık gibi koşullara daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *D. radiodurans* karotenoidlerinin çevresel stresle mücadelede bakteriye katkısının olduğunu düşündürmektedir. Kemilüminesans analizleri, karotenoid sentez yolunda önemli bir ürün olan deinoxanthin' in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve singlet oksijene savunmada karoten (likopen ve β-karoten) ve iki ksantofil (zeaksantin ve lutein) 'den önemli ölçüde daha güçlü bir savunma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Deinoksantin' in aynı zamanda DNA üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular deinoksantin'in güçlü bir antioksidan etkisinin olduğunu ve *D. radiodurans*' in direnç mekanizmasına direncine katkıda bulunduğunu desteklemektedir.

Hua vd., 2003 yaptıkları çalışmada, *D. radiodurans*' da DNA tamirinde ve antioksidan savunmada anahtar rol oynayan *pprl* genini tanımlamışlar ve bu genin bir transpozonla inaktive edilmesi sonucu bakterinin yabancılarına göre daha duyarlı hale geldiğini saptamışlardır. Yapılan analizler sonucunda *pprl* geninin katalaz enzim aktivitesini arttıran *recA* ve *pprA* geninin sentezini aktive ettiğini tespit etmişlerdir. Yine bu genin bloke edilmesi *D. radiodurans* ' in antioksidan savunmasında önemli payı olduğu düşünülen karotenoidlerin sentezinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Song vd. (2000) *D. radiodurans* ' da süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin indüklenme durumlarını araştırmışlardır. Enzimlerin

indüklenme durumlarını saptamak amacı ile *D. radiodurans*, artan dozlarda ( $6.10^{15}$  ile  $8.10^{14}$  iyon/cm<sup>2</sup> ) N<sup>+</sup> ışınlarına maruz bırakılmış ve buna bağlı olarak hücrelerdeki SOD ve CAT enzimi arasındaki değişim karşılaştırılmışlardır. Buna göre N<sup>+</sup> ışını ile maruz bırakılan örneklerde enzim aktivitelerinde bir artışın olduğu saptanmıştır. Özellikle hücrelerin Mn-SOD aktivitesinde artışlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bakterinin, oksidasyonun zararlı etkisine karşı etkin bir savunma mekanizmasına sahip olduğunu ve Mn-SOD 'un indüklenebilir bir enzim olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada bakterilerin büyüme ortamlarına bir protein sentezi inhibitörü olan kloramfenikol eklenerek enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Sonuçta kloramfenikol içeren ortamlardaki bakterilerin enzim aktivitelerinde bir artış gözlenmemiştir. Bu da *D. radiodurans*'ın oksidatif strese adapte olmak için de-novo protein sentezine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir.

Katalaz, reaktif oksijen türlerine karşı hücreleri korumada anahtar rol oynayan bir enzimdir. Kobavashi vd., 2006 yaptıkları bir çalışmada, radyasyona dirençli *D. radiodurans* bakterisinden Kat A (DR1998)' karakterizasyonunu, saflaştırılmasını ve klonlanmasını araştırmışlardır. Saflaştırılan *D. radiodurans* Kat A monomerinin molekül büyüklüğünün 65 kDa, enzimin büyüklüğünün 240 kDa olduğu tespit edilmiştir. Homotetramer yapıdaki Kat A 'nın spesifik aktivitesi 68800 U/mg proteindir ve aktivitesi sodyum azid, sodyum siyanid ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi kimyasallarla bloke olmaktadır. Kat A' nın absorpsiyon spektrumu 408 nm' de max absorbans vermiştir. Peroksidaz aktivitesi bulunmamaktadır. Bu sonuçlar *D. radiodurans* Kat A' nın tipik bir tek fonksiyonlu olduğunu ve hem grubu içerdiğini göstermiştir. hücrelerde bol miktarda bulunan Kat A tipik olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ' ye karşı hücrel savunmada görev alarak bakterinin oksidatif zarara karşı canlı kalma stratejisinde anahtar rol oynamaktadır.

Yapılan bir çalışmada Melin vd. (1997) *D. radiodurans*'ın farklı soylarının oksidatif zarara karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bu amaçla kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit, bakır sülfat, ve askorbik asit gibi oksidanlar eklenmiştir. *D. radiodurans*'ın kırmızı pigmentli (yabanıl) ve renksiz mutant soylarında antioksidan enzimleri ve vitamin düzeylerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Buna göre farklı oksidanların yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak pigmentli bakterinin SOD ve CAT aktivitesinin renksiz mutant soydan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca pigmentli bakterilerle renksiz mutant soyların, radikallerin letal etkisine karşı yüksek koruma sağlayan A ve E vitamini düzeyleri karşılaştırıldığında pigment içeren

bakterinin, A ve E vitamini düzeylerinin renksiz bakteriden daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır.

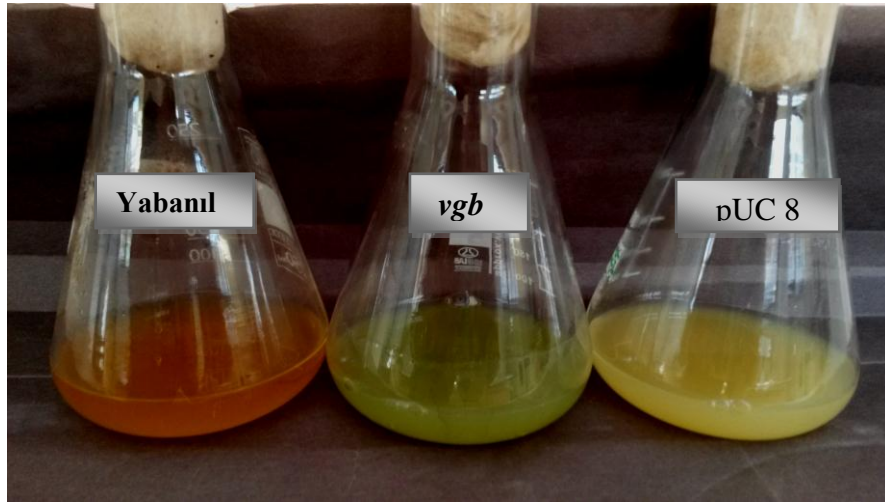
Markille vd., 1999 *D. radiodurans'* ın R1 suşunda basit ve genel hedef mutasyonlar yaparak katalaz (KAT A) ve süperoksit dismutaz (SOD A) mutantlarını oluşturmuşlardır. Yabanıl ve mutant kültürlerine 8000-32000 Gy arası farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmıştır. Yabanıl ve KAT A mutanı düşük dozlara benzer şekilde cevap verirken yüksek dozlarda KAT A mutantının, yabanıla göre 2-15 kat daha duyarlı hale geldiği görülmüştür. SOD A mutanı ise, yüksek dozlarda yabanıl ve KAT A mutanına göre 3-90 kat daha duyarlı hale gelmiştir. Bu sonuçlar süperoksit dismutaz ve katalaz proteinlerini içermeyen her iki mutantında iyonize radyasyonun neden olduğu oksidatif stresle başa çıkmada yabanıla göre daha hassas olduğu ve bu iki enzimin bakterinin radyasyona karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarına katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda, farklı doz ve sürelerdeki UV radyasyon ve ağır metal uygulamaları gibi stres faktörlerinin etkilerini saptamak amacıyla bakterilerdeki adaptasyon mekanizmalarıyla ilişkili olduğu düşünülen çeşitli biyobelirteçlerin tesbiti şu şekilde planlanmıştır;

#### 3.1 Çalışmada kullanılan *Deinococcus radiodurans* ve rekombinantları

Bu çalışmada, oksidatif zarara, genotoksik kimyasallara, iyonize ve UV radyasyonun yüksek seviyelerine ve kurumaya karşı ekstrem olarak direnç gösteren *Deinococcaeae* familyasına ait Gram (+) bir bakteri olan *Deinococcus radiodurans* R1 (ATCC BAA-816), bu bakterinin *vgb* geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da  $vgb^-$  rekombinant suşu kullanıldı. *Deinococcus radiodurans*' in iki rekombinantından puc8 plazmitini taşıyan Dr[pUC8] olarak, aynı plazmitin *vgb* geni taşıyan formu ise Dr[pUC8:15] olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.1. *D. radiodurans* ve rekombinantları

#### 3.2. Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri

Çalışmamızda *D. radiodurans*' in büyüme ortamı olarak bu bakterinin kendi özel besiyeri olan TGY agar (Trypton Glukoz Yeast Agar) ve TGY broth (Trypton Glukoz Yeast broth) (pH:7,5) kullanıldı. Besiyerinin içeriği Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Besiyerleri 100 ml kapasiteli erlenlerde 20 ml besiyeri olacak şekilde 20 dakika 121°C’de 1 atm basınç altında otoklavlandı.

**Çizelge 3.1.** TGY Broth Besiyerinin İçeriği (g L<sup>-1</sup>)

Tripton	10
Maya özütü	5
Glikoz	1

Bu sıvı besi yerlerinin içine 15g L<sup>-1</sup> agar ilave edilerek katı besiyerleri elde edilmiştir.

### 3.3. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar

Bu çalışmada kullanılan TGY agar besiyeri, Ksantin, ksantin oksidaz, sitokrom-c, BSA (Bovine Serum Albumin), SOD (Süperoksit Dismutaz) ve NaOH Sigma’dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA (Etilen daimintetraasetik asit) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise Merck firmasından temin edildi. Ağır metal uygulamalarında kullanılan Cd(NO)<sub>2</sub> Alfa Aesar firmasından CrCl<sub>3</sub> ise Aldrich firmasından temin edilmiştir. Yine SOD ve CAT enzimlerinin protein elektroforezi için gerekli kimyasallar ve standartları Sigma firmasından temin edilmiştir.

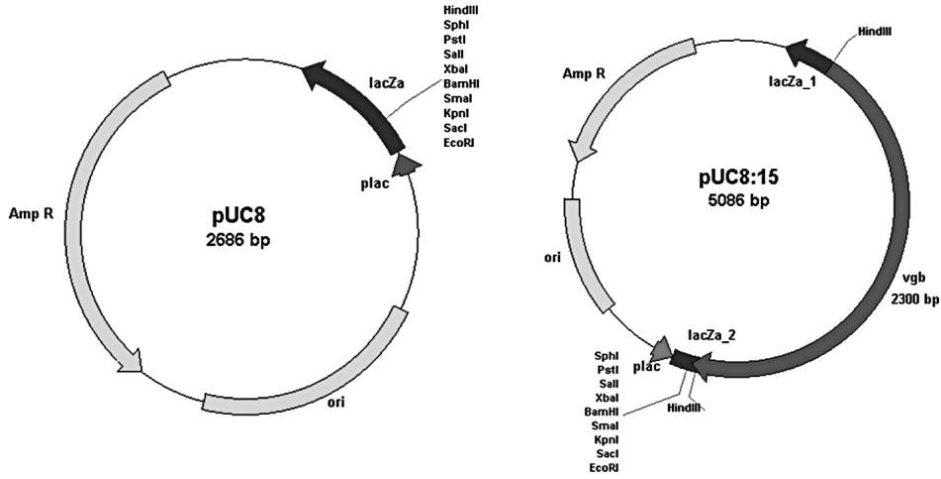
### 3.4. Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları % 20 gliserol (v/v) içeren TGY sıvı besiyerinde hazırlanarak -20 °C ‘de muhafaza edildi. Ancak her çalışmada kullanılan bakterilerden *D. radiodurans* ve rekombinantları TGY agar içeren petrilere üretilmiş ve +4 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Buzdolabında saklanan bakterilerden steril şartlar altında öze ile alınarak Bölüm 3.2.’ de anlatıldığı gibi hazırlanan TGY broth (20 ml/100ml) içeren erlenlere ekimi yapılmıştır. Yabanıl ve rekombinant bakteriler 32 °C’de ve 150 rpm’de çalkalamalı olarak üretildi. Üretilen bu stok kültürler bir gece inkübasyonun sonunda alınarak TGY broth besiyeri içeren erlenlere 1ml/20ml olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Daha sonra bu kültürler deneyin sonraki aşamalarında amaca uygun olarak kullanıldı.



### 3.5. vgb Klonları

Bu çalışmada kullanılan *D. radiodurans*'ın Dr[pUC8] ve Dr[pUC8:15] rekombinantları İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji bölümünde Hikmet Geçkil' in laboratuvarından temin edilmiştir. pUC8 plazmiti 2.7 kb büyüklüğünde olup işlevsel bir lacZ geni taşımaktadır. pUC8:15 plazmiti ise, 5 kb büyüklüğündedir ve 2.3 kb uzunluğundaki multi klonlama bölgesine vgb geni yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2. pUC8 ve pUC8:15 plazmitlerinin fiziki haritası

### 3.6. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Çıkartılması:

Bu çalışmada üreme potansiyelleri bilinmeyen rekombinant bakterilerin üreme eğrilerini saptamak amacıyla TGY broth besiyeri hazırlandı, otoklavlandı ve steril koşullar altında bakterilerin ekimi yapılarak stok kültürler oluşturuldu. Bu stok kültürlerden taze hazırlanan besi yerlerine 1/50 ml olacak şekilde ve her bakteri için üç tekrarlı olmak koşuluyla ekimler yapıldı ve 0. saatten itibaren başlayarak 12. saate kadar her saat başı, daha sonra da 24.saat, 48.saat ve 72. saate kadar 600 nm'de absorbanslar okundu. Bu absorbans değerlerine bağlı olarak her iki bakteri suşu için elde edilen sonuçlara göre üreme eğrileri saptandı. Aynı zamanda her iki bakteri suşu için canlı hücre sayımı da yapılarak üreme eğrisi için elde edilen absorbans değerleri desteklendi.

### 3.7. Bakterilerin UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması ve Canlı Hücre Sayımının Yapılması

Bakterilerin ultraviyole radyasyona olan direncini saptamak amacıyla, her üç bakteri için sıvı stok kültürler hazırlanmış ve bunların TGY broth içeren 20/100 ml 'lik erlenlere ekimi yapılarak belli sürelerde (30, 60, 90, 120, 180, 240 ve 360 dk.) UV-C'e

maruz bırakılmıştır. UV radyasyona maruz kalan bir organizmanın canlı kalma yeteneği, tipik olarak UV uygulanmış kültürlerin uygun dillüsyonlar kullanılarak agar içeren plaklarında canlı kalan hücrelerin sayılmasıyla belirlenmektedir. Canlı hücre sayımında kullanılmak üzere seri sulandırma için de % 0,09 NaCl içeren serum fizyolojik ve yine her bakteri için steril koşullarda TGY agar dökülmüş plaklar hazırlandı. Hazırlanan serum fizyolojik 15 ml'lik tüplere, her tüpe 10ml olacak şekilde aktarıldı. Seri sulandırma 5 tüp üzerinden yapılmıştır. Her üç bakteri için stok kültürlerden belli miktarlarda alınarak önce 1. tüpe sonra bu tüp karıştırıldıktan sonra 2. tüpe, 2. tüpten 3, 4 ve 5. tüplere aktarılmış ve canlı hücre sayımı 3. 4. ve 5. tüplerden 2 farklı konsantrasyonda (50 µl ve 100 µl) alınıp plaklara ekimi yapılarak 32 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Gözle görülebilir büyüklüğe erişen koloniler sayılarak kültür ortamındaki canlı hücre sayıları tespit edildi. Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının verilmesinde koloni oluşturan birim esas alındı (kob/ ml).

$\text{kob/g (ml)} = \text{İki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü}$

Bu çalışmada Philips TUV 15 Watt/G15 T8 254 nm dalga boyuna sahip 45 cm boyunda UV-C lambası kullanılmıştır. Örnekler Şekil 3.3'deki gibi lambadan 11 cm uzaklığa yerleştirilmiştir. UV-C radyasyon kaynağı tavana 6 cm mesafe ile yerleştirilmiştir. Işınlama için 90 x 60 x 70 cm boyutlarındaki alüminyum ile kaplı tahta bir kabin kullanılmıştır. Lamba ile örnekler arası ışınlama mesafesi 11 cm'dir. Lambanın yüzeyinden 1 cm mesafede 15 w'lık bir güç var olduğundan dolayı 11 cm'deki uygulanan gücün değeri 0,124 watttır. 11cm 'lik mesafeden yapılan bu ışınlama 46 x 13 cm'lik bir yüzey alanını kapsamaktadır.



**Şekil 3.3.** Bakterilerin UV-C radyasyona maruz bırakılması

Canlı hücre sayımı için UV-C uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz miktarları aşağıdaki çizelgedeki gibidir.

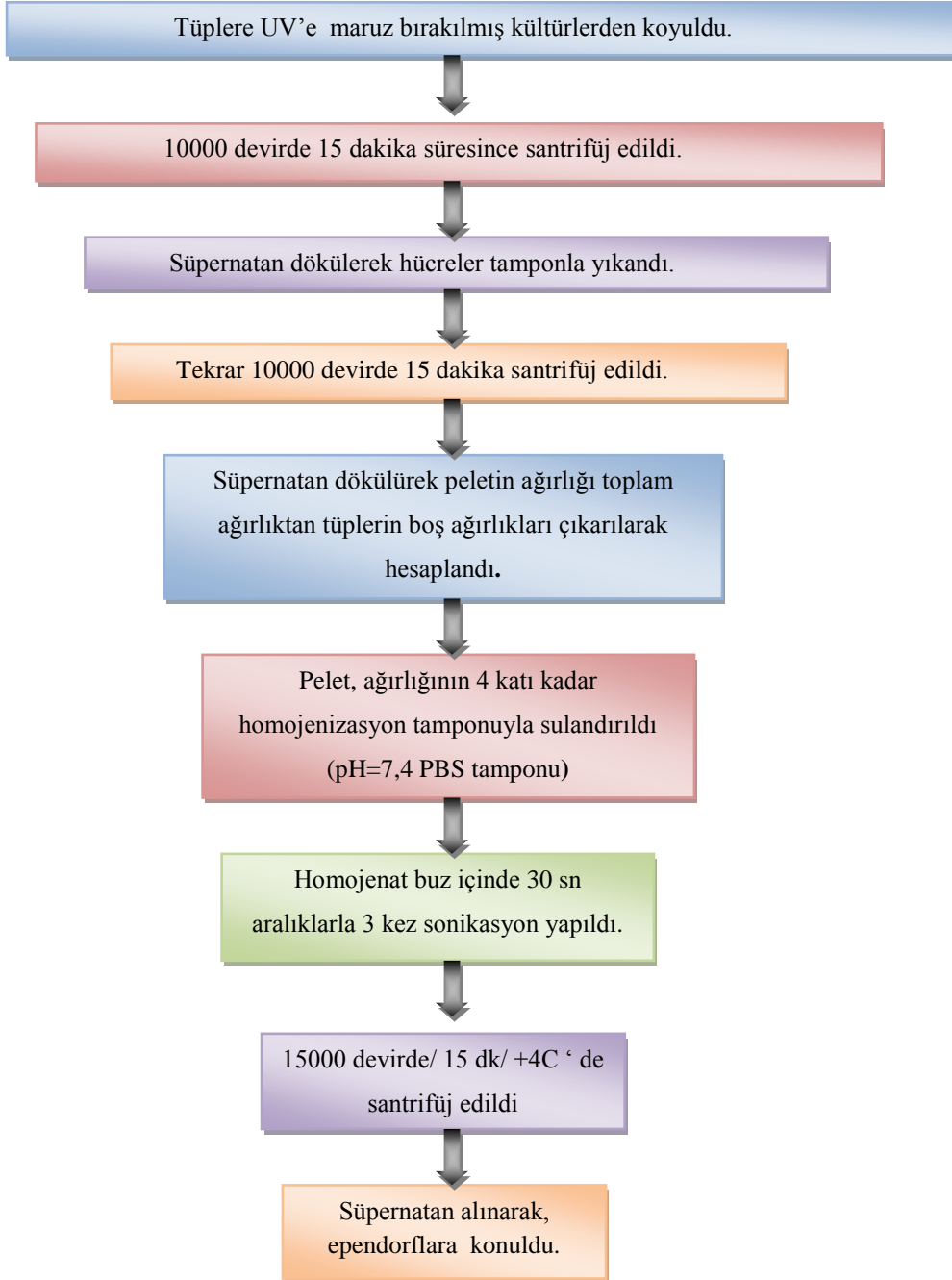
UV-Cuygulama süresi	Doz miktarı ( j/ cm <sup>2</sup> )
30 dk (1800 sn)	0,37
60 dk (3600 sn)	0,75
90 dk (5400 sn)	1,12
120 dk (7200 sn)	1,49
180 dk (10800 sn)	2,23
240 dk (14400 sn)	2,98
360 dk (21600 sn)	4,47
12 saat (43200 sn)	8,94
24 saat (86400 sn)	17,88
48 saat (172800 sn)	35,76

### **3.7.1 Bakterilerin UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması ve Enzim Aktivite Tayini İçin Uygulaması Sonrası İşlemler**

Bakterilerin belli sürelerdeki UV-C radyasyon uygulaması sonrası enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikleri saptamak amacıyla yine her üç bakteri için sıvı stok kültürler hazırlanmıştır. Bunların TGY broth içeren 20 ml/100 ml'lik TGY içeren erlenlere ekimi yapılarak süperoksit dismutaz ve katalaz enzim tayinleri için 6, 12, 24 ve 48 saat UV-C'e maruz bırakılmıştır.

Enzim aktivite tayini için UV-C uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz miktarları aşağıdaki çizelgedeki gibidir.

Süresi biten örneklere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.



### 3.8 Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi tayin işlemlerinde, spektrofotometre (SHİMADZU UV-visible Spectrophotometer UV-1601) kullanıldı. Bütün enzimlerin aktiviteyi her bakteri için üç tekrarlı olarak ölçüldü.

#### 3.8.1 Katalaz Enzimi Tayini

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck (1963) yöntemine göre yapıldı. Katalaz enziminin aktivite tayini için pH=7 olan 1/15 M'lık Sodyum–Potasyum (  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaHPO}_4$ ) tamponu hazırlandı. Tamponun 100 ml' sine 270  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendi. Katalaz aktivite tayininde kullanılacak olan kör için sadece tampon +  $\text{H}_2\text{O}_2$  karışımı kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü için yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan tampon +  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisine uygun miktarda örnek eklendi ve 240 nm' de 1 dakika boyunca absorbans değişimi belirlendi. Absorbans belirlendikten sonra ml' deki enzim ünite sayısı spektrofotometrik olarak hesaplandı. Elde edilen değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite tespit edildi ( Luck., 1963).

#### 3.8.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Tayini

Ksantin-Ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c' yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite tayini Mc Cord ve Fridovich 1969 yöntemine göre yapıldı. Enzim aktivite tayini için pH = 7,8'lik 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tamponu ( 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponu) , 0,2 U/ ml ksantin oksidaz, 10 mM Ksantin ve 1 mM sitokrom-c çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak A ve B çözeltileri hazırlandı.

A çözeltisi için; 0,76 mg (5 mol) ksantin'in 10 ml 0,001 N NaOH' daki çözeltisi ve 24,8 mg ( 2 mol) sitokrom c'nin 100 ml 50 mM pH = 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı.

B çözeltisi için, taze olarak hazırlanan ksantin oksidazın ( 0,2 u/ml) 0,1 mM EDTA 'daki çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler hazırlandıktan sonra kör hazırlaması ve örnek okuması şu şekilde yapıldı; 3 ml' lik spektrofotometre küvetine 2,9 ml A çözeltisi ve 50  $\mu\text{l}$  örnek ilave edildikten sonra tepkime 50  $\mu\text{l}$  B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı. B çözeltisi eklendikten ve hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 550 nm' de 1 dakikalık absorbans değişimi okundu. Kör okuması yapılırken örnek yerine 50  $\mu\text{l}$  distile

su kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyonlardaki ( $5 \cdot 10^{-7}M$ ) SOD çözeltilerinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl' deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem saf SOD enzimiyle yapılarak % inhibisyon hesaplandı.

### 3.9. Karotenoid Tayini

6, 12, 24 ve 48 saat UV-C radyasyon uygulanan örneklerin karoten tayini spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Bunun için, 1 ml kültürü 5000 rpm devirde 10 dk. santrifüj edilip, süpernatant döküldü. Bakteri peleti üzerine 1 ml % 9'luk NaCl ilave edilip tekrar 5000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilip, süpernatant döküldü. Daha sonra da pelet üzerine;

\* 1ml DMSO

\* 1 ml aseton

\* 1 ml petrol eteri ve % 20'lik NaCl çözeltisi ilave edildi.

Karıştırma sonunda üstte toplanan petrol eteri katmanı ayrı bir tüpe alınarak 452 nm'de ölçüm yapıldı.

$$\text{Toplam karotenoid } (\mu\text{g/ ml}) = \frac{A (452) * D * V}{0,268}$$

A (452 ) = Absorbans değeri

D = Spektrofotometre öncesi yapılan dilüsyon oranı

V = Petrol eter hacmi

0,268 = Spesifik absorpsiyon katsayısı

### 3.10. Total Protein Tayini

Total protein tayini Bradford vd. (1980) yöntemine göre yapılmıştır. 5 µl supernatan mikropalakalara pipetlenip ve üzerine 250 µl Bradfoard reaktifi eklenerek

reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu sistemi kullanılarak absorbanları ölçüldü. Protein miktarları saptanırken BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırma yapılarak örnekteki total protein değerleri hesaplandı (Bradford., 1980).

### **3.11 Bakterilere Ağır Metal Uygulaması.**

#### **3.11.1. Cd Uygulamasının Üreme potansiyeli Üzerine Etkisinin Saptanması**

*D. radiodurans* ve rekombinantlarının Cd varlığındaki üreme potansiyellerini saptamak amacıyla her üç bakteri için TGY sıvı besiyerleri ve Cd uygulaması için de 50000 ppm'lik Cd stoğu hazırlanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda Cd için doz aralığımız 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm ve 1500ppm olarak kararlaştırılmıştır. Hazırlanan besi yerlerine belirlenen dozu sağlamak amacıyla belli miktarlarda Cd eklenmiş (100 µl, 200 µl 400 µl, 600µl) ve stok kültürlerden bakteri ekimleri yapılarak 0.saatten itibaren 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 12. saat ve 24. saat'lerde spektrofotometrede absorbanları ölçülerek, üreme potansiyelleri saptanmıştır.

#### **3.11.2. Cr Uygulamasının Üreme potansiyeli Üzerine Etkisinin Saptanması**

*D. radiodurans* ve rekombinantlarının Cr varlığındaki üreme potansiyellerini saptamak amacıyla her üç bakteri için TGY sıvı besiyerleri ve Cr uygulaması için de 50000 ppm'lik Cr stoğu hazırlanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda Cr için doz aralığımız 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm ve 2000 ppm olarak kararlaştırılmıştır. Hazırlanan besi yerlerine belirlenen dozu sağlamak amacıyla belli miktarlarda Cr eklenmiş (100 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl ve 800 µl) ve stok kültürlerden bakteri ekimleri yapılarak 0.saatten itibaren 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 12. saat ve 24. saat' lerde spektrofotometrede absorbanları ölçülerek, üreme potansiyelleri saptanmıştır.

#### **3.11.3. Ağır Metal Biyosorpsiyonu**

Yabanıl ve rekombinat *D. radiodurans* suşlarının ağır metal giderim kapasitelerini belirlemek için; sulu ortamda başlangıçta ve biyosorpsiyon sonrası kalan metal derişimi Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorpsiyon spektrofotometresinde hava-asetilen alevinde tayin edildi.

Biyosorpsiyon, sulu ortamlardan metal iyonlarının biyokütle tarafından alınmasıdır. Biyosorbent yüzeyinde tutulacak çözünmüş maddelerin biyokütle etrafını saran çözücü sıvı film içerisinde geçmesi gerekmektedir. Biyosorpsiyon şartlarının gerçekleşebilmesi için bazı optimal koşulların oluşması gerekmektedir. Biyosorpsiyon yöntemi metal iyonu türü, biyokütle türü ve miktarı, konsantrasyon, sıcaklık, çözelti pH'sı gibi fizikokimyasal faktörlerden etkilenmektedir.

### **3.8.3.1. Optimum Doz ve Sürenin Belirlenmesi**

En iyi ağır metal biyosorpsiyonunun olduğu doz ve süreyi saptayabilmek amacıyla Cd (II) için 250 ppm , 500 ppm, 1000 ppm ve 1500 ppm, Cr (III) için 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm ve 5000 ppm aralığında metal dozları, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk ve 180 dk'lık sürelerde deneyler yapılmıştır. Bunun için, TGY besi ortamına belirlenen metal dozunu sağlamak amacıyla stok metal çözeltilerinden metal ilavesi ve 1 ml yabancı ve rekombinant suşları eklenerek belirlenen sürelerde etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süresi biten örnekler 4500 rpm' de santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant biyosorpsiyon kapasitesini tespit etmek amacıyla AAS' de tayin edilmiştir. Bu şekilde elde edilen besi yerinde kalan metal miktarı hesaplanarak bakterilerin biyosorpsiyon kapasiteleri tespit edilmiştir.

### **3.8.3.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi**

Sıcaklık biyosorpsiyonun gerçekleştiği reaksiyonlarda önemli bir parametredir. Yabancı ve rekombinant suşların en iyi doz ve süredeki biyosorpsiyon kapasiteleri saptandıktan sonra belirlenen doz ve sürede hazırlanan örnekler sıcaklık optimizasyonu için 10, 20, 30 ve 40 °C 'deki sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmış ve süresi biten örnekler 4500 rpm' de santrifüj edildikten sonra süpernatant AAS' de ölçülerek biyosorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır.

### **3.8.3.3. Optimum pH' nin Belirlenmesi**

pH optimizasyonu için örneklerin pH' sı 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlanmıştır. Bu pH derecelerini ayarlayabilmek amacıyla 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl kullanılmıştır. Çalışmada farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerine belirlenen metal konsantrasyonları



eklenerek diğer optimum koşullar da sağlandıktan sonra inkübasyona bırakılmış ve süresi biten örnekler alınarak 4500 rpm' de santrifüj edilip süpernatantlar AAS' de ölçülerek biyosorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır.

#### **3.8.3.4. Optimum Karıştırma Hızının Belirlenmesi**

Metal biyosorpsiyonuna etki eden faktörlerden birisi yöntemin gerçekteştiği ortamdaki karıştırma hızıdır. Bakterilerin biyosorpsiyon kapasitesinin en iyi olduğu çalkalama değerleri 50, 100, 150, 200 ve 250 rpm' lerde denenmiştir. Bunun için besi yerlerine belirlenen metal konsantrasyonları eklenerek diğer optimum koşullar da sağlandıktan sonra farklı çalkalama değerlerinde inkübasyona bırakılmış ve süresi biten örnekler 4500 rpm' de santrifüj edilip, süpernatant AAS' de ölçülerek biyosorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır.

### **3.9. Bakterilerin metal uygulaması öncesi ve sonrası SEM fotoğraflarının saptanması**

*D. radiodurans* ve rekombinantları, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimleri saptamak amacıyla İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Laboratuvarı, bünyesinde bulunan Leo evo 40 marka Scanning Elektron Mikroskobu kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu katı yüzeyler hakkında morfolojik ve topografik bilgi sağlayan, yüzeylerin davranışlarının anlaşılmasını kolaylaştıran bir yöntemdir (Newbury et al. 1990). Bir lam üzerine yayılıp kurutularak hazırlanan preparatların üzeri altın-paladyum ile kaplanarak SEM' de incelenmiştir.

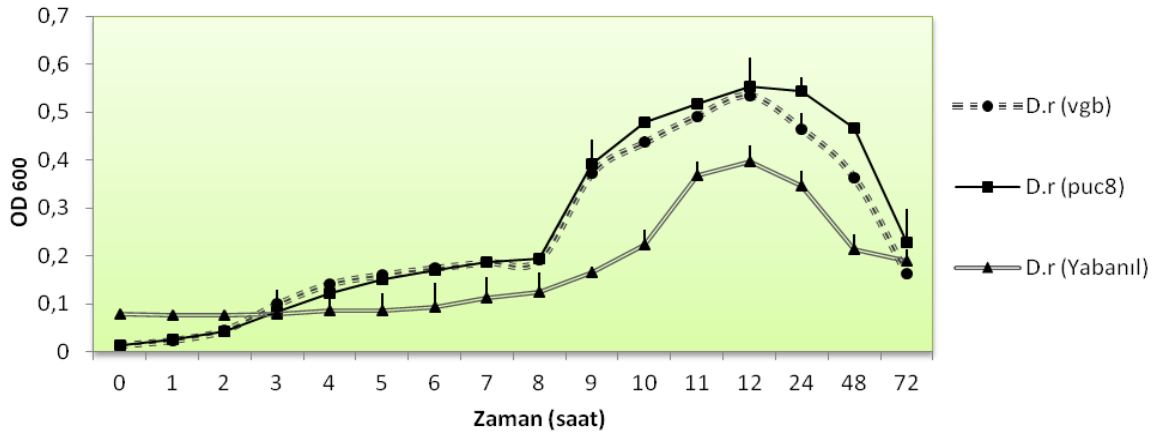
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. *D. radiodurans* ve Rekombinantlarının Üreme Eğrileri

*D. radiodurans*' ın yabancı ve *vgb*<sup>+</sup> ve *vgb*<sup>-</sup> rekombinant suşlarının üreme eğrileri hem OD<sub>600</sub>' de absorbansları alınarak hem de direkt canlı hücre sayımı yapılarak tespit edilmiştir.

#### 4.1.1. OD<sub>600</sub> ile Üreme Eğrilerinin Çıkartılması

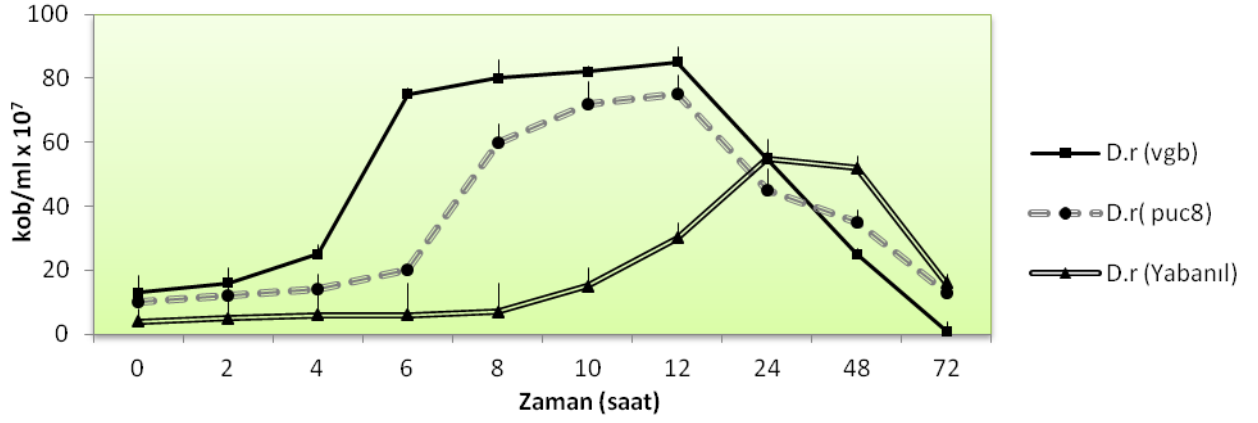
*D. radiodurans* ve rekombinantlarının absorbans değerlerine bağlı olarak elde edilen üreme eğrileri Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Buna göre rekombinant bakteriler birbirine yakın üreme potansiyellerine sahipken, yabancı bakteri jenerasyon süresinin daha uzun olması sebebiyle farklı üreme dilimlerine sahiptir.



Şekil 4.1. *D. radiodurans* yabanıl (W), *vgb*<sup>+</sup>(pUC 8:15) ve *vgb*<sup>-</sup>(pUC8) suşlarının zamana bağlı üreme grafikleri

#### 4.1.2. Canlı Hücre Sayımı ile Üreme Eğrilerinin Çıkartılması

*D. radiodurans* ve rekombinantlarının absorbans değerlerine paralel olarak yapılan canlı hücre sayımlarına göre elde edilen üreme eğrileri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** *D. radiodurans* yabanıl (W), vgb<sup>+</sup>(vgb) ve vgb<sup>-</sup>(pUC8) bakterilerinin canlı hücre sayılarına bağlı üreme grafikleri (Yabanıl bakteriye ait canlı hücre sayıları grafikte kıyaslanabilir olması için 1000 ile çarpılarak elde edilmiştir.)

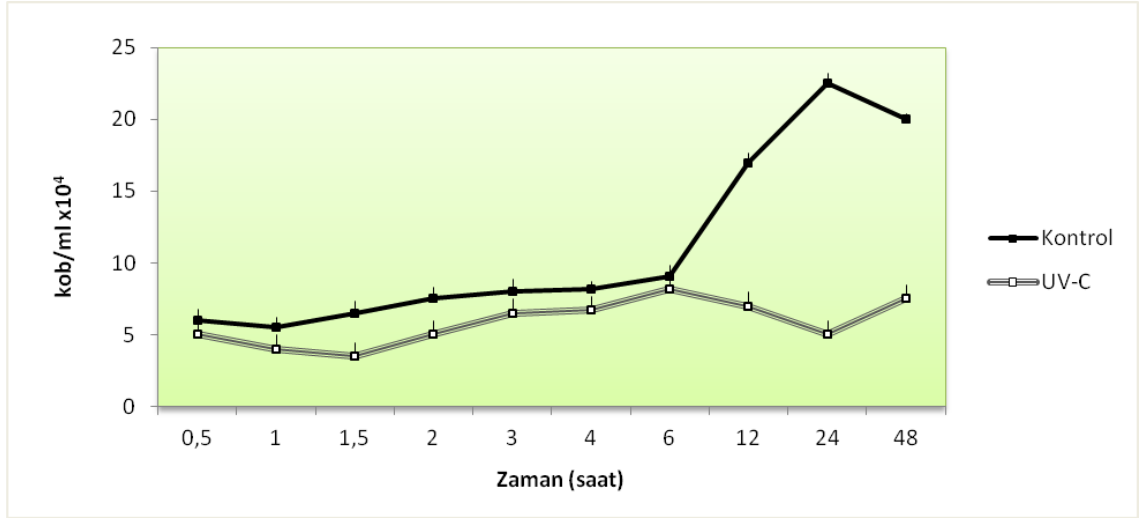
Buna göre OD<sub>600</sub> değerleriyle canlı hücre sayıları birbirine paralel olup bakterilerin üreme fazları aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

**Tablo 4.1.** Bakterilerin üreme fazları

	Lac fazı	Loc fazı	Sekonder faz	Litik faz
<i>D. radiodurans</i> (yabanıl)	0-8	10-12	24-48	48-72
<i>D. radiodurans</i> (vgb)	0-4	4-8	6-12	12-72
<i>D. radiodurans</i> (pUC8)	0-6	6-8	8-12	12-72

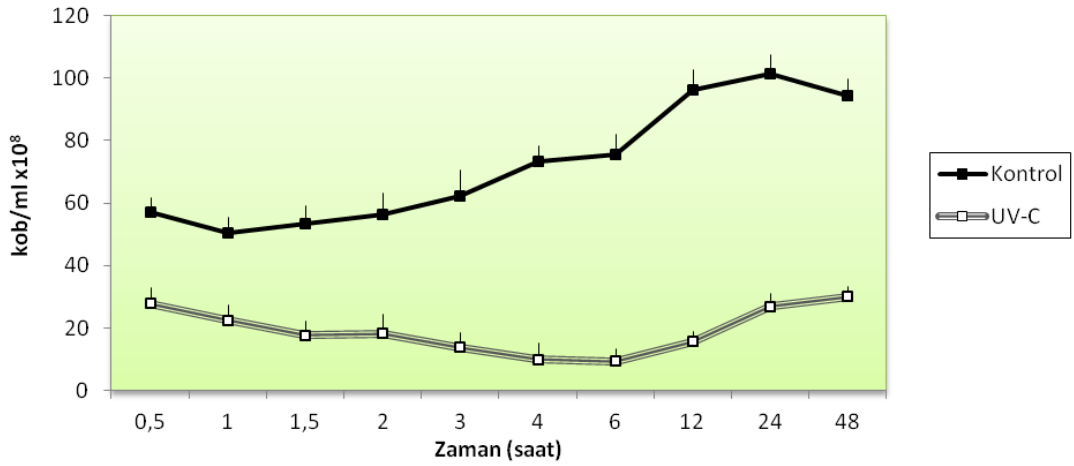
## 4.2. UV-C Uygulaması Sonrası Canlı Hücre Sayıları

Yabanıl ve rekombinant suşlar 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12, 24 ve 48 saat süresince UV-C radyasyona maruz bırakılmıştır ve buna bağlı olarak üreme potansiyellerindeki değişimler saptanmıştır. Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl)'ın 1,5 saat UV-C uygulamasına kadar radyasyondan etkilenip canlı hücre sayısında bir düşüşün meydana geldiği görülmüştür. Ancak 1.5 saatten 6. saatte kadar ki uygulamada bakteri, radyasyon uygulanmamış gruplarla paralel bir üreme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Ancak 6 saatlik uygulama sonrası bakterinin doz artışına bağlı olarak radyasyondan etkilenip canlı hücre sayısında bir azalma görülmüştür. Bu düşüş, 24 saatlik uygulama sonrası bakterinin sahip olduğu direnç ve tamir mekanizmaları sayesinde yeniden yükselişe geçmiştir.



**Şekil 4.3.** *D. radiodurans* (yabancı) ' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi

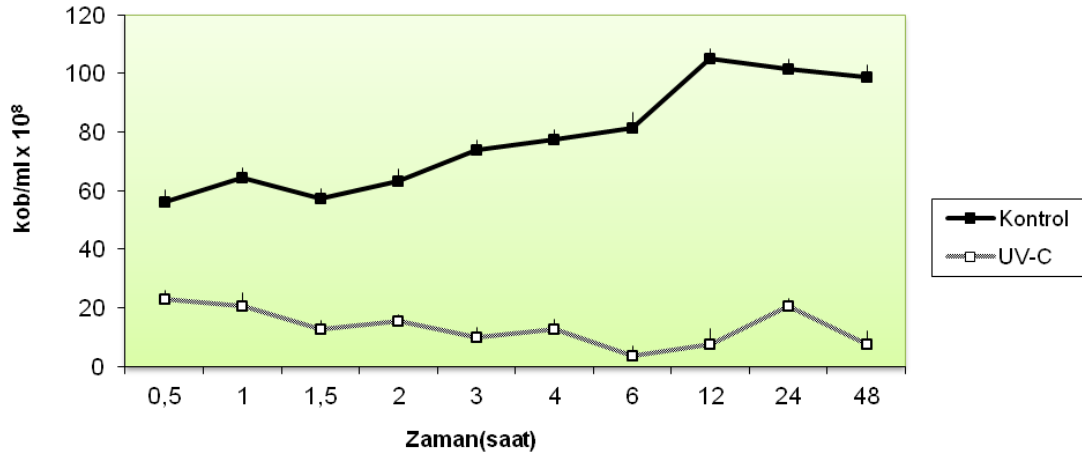
*D. radiodurans* (vgb)' i UV-C uygulanmış ve uygulanmamış gruplarla kıyasladığımızda bakterinin canlı hücre sayısında uygulama dozuna bağlı olarak bir düşüş meydana gelmiştir. En düşük canlı hücre sayısı 6 saatlik UV-C uygulanan örneklerde kaydedilmiştir.



**Şekil 4.4.** *D. radiodurans* (vgb) ' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi

*D. radiodurans* (pUC8)' in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda bakterinin uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak canlı hücre sayısında bir düşüşün olduğu ve radyasyondan (vgb<sup>+</sup>)' den daha fazla etkilendiği

görülmüştür. En düşük canlı hücre sayısı 6 saatlik radyasyon uygulanan örneklerde tespit edilmiştir.



**Şekil 4.5.** *D. radiodurans* (pUC8)' in UV-C uygulamasının üreme potansiyeli üzerine etkisi.

### 4.3. UV-C Uygulaması Sonrası Enzim Aktivitesi

*D. radiodurans* yabancı ve rekombinant bakterilerde ultraviyole radyasyonun bu bakterilerde önemli antioksidan sistem elemanları olan SOD ve KAT gibi enzimler üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla bakteriler 6, 12, 24 ve 48 saat UV-C uygulanmış ve elde edilen sonuçlar radyasyon uygulanmayan kontrol gruplarıyla kıyaslanmıştır.

#### 4.3.1. UV-C Uygulaması Sonrası SOD Aktivitesi

*D. radiodurans* (yabancı) ve rekombinant bakterilerinde UV-C radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre *D. radiodurans* (yabancı)' da ilk 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre düşmüş, 12 ve 24 saatlik uygulamalarda ise kontrole göre bir artış saptanmakla birlikte en yüksek enzim aktivitesi de 24 saat UV-C uygulanan örneklerde (939,04  $\mu\text{mol/ml/mg}$  protein) tespit edilmiştir. 48 saatlik yüksek UV-C doz uygulaması sonrasında ise en düşük enzim aktivitesi (19,2  $\mu\text{mol/ml/mg}$  protein) gözlenmiştir.

*D. radiodurans* (vgb)' de UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında SOD enzim aktivitesinde genel olarak bir artış gözlenmiştir. En

düşük enzim aktivitesi 12 saatlik UV-C uygulanan örneklerde 372,5 µmol/ml/mg protein, en yüksek enzim aktivitesi ise, 48 saat UV-C uygulanan örneklerde 1427,07 µmol/ml/mg protein olarak kaydedilmiştir.

*D. radiodurans (pUC8)*' in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda SOD enzim aktivitesinde bir artış olduğu gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesi 12 saat UV-C uygulanan örneklerde 370,13 2 µmol/ml/mg protein, en yüksek enzim aktivitesi ise 48 saat UV-C uygulanan örneklerde 579,19 2 µmol/ml/mg protein olarak kaydedilmiştir.

#### 4.3.2. UV-C Uygulaması Sonrası KAT Aktivitesi

*D. radiodurans* ve rekombinant suşlarında UV-C radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda katalaz (KAT) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Buna göre *D. radiodurans (yabanıl)*' da ilk 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası KAT enzim aktivitesi kontrol grubuna göre düşmüş, 12 ve 24 saatlik uygulamalarda ise kontrole göre bir artış saptanmakla birlikte en yüksek enzim aktivitesi de 24 saat UV-C uygulanan örneklerde (278,66 µmol/ml/mg protein) tespit edilmiştir. 48 saatlik yüksek UV-C doz uygulaması sonrasında ise en düşük enzim aktivitesi (1,77 µmol/ml/mg protein) gözlenmiştir.

*D. radiodurans (vgb)*' de UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla kıyaslandığında 24 saatlik UV-C uygulanan örneklerdeki KAT enzim aktivitesi kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen 6 saatlik ışın uygulanan örneklerden daha düşük tespit edilmiştir. Bunun dışında diğer örneklerde doza bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. En düşük enzim aktivitesi 6 saatlik UV-C uygulanan örneklerde 102,24 µmol/ml/mg protein, en yüksek enzim aktivitesi ise, 48 saat UV-C uygulanan örneklerde 237,4 µmol/ml/mg protein olarak kaydedilmiştir.

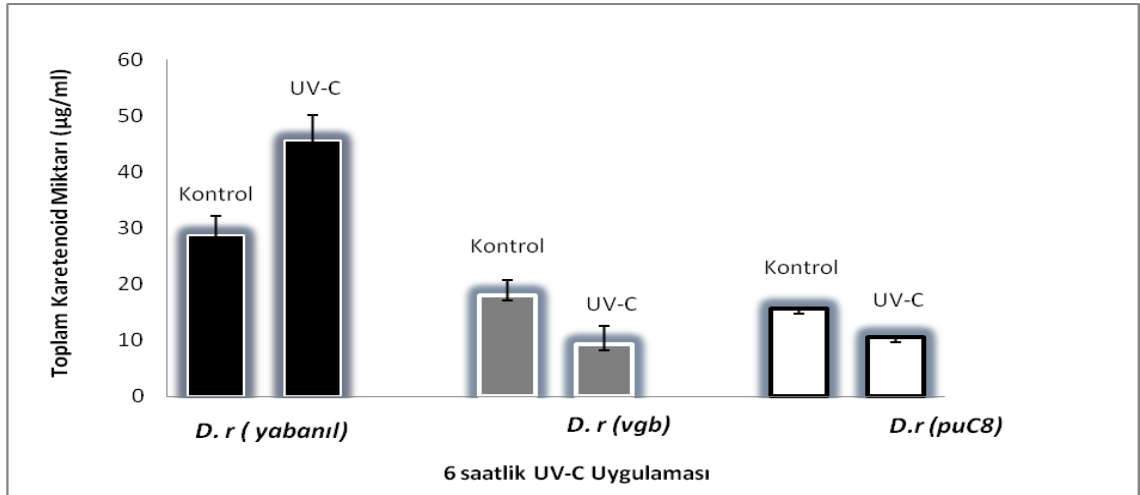
*D. radiodurans (pUC8)*' in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda 12 saatlik UV-C uygulanan örneklerdeki KAT enzim aktivitesi kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen 6 saatlik ışın uygulanan örneklerden daha düşük tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesi 12 saat UV-C uygulanan örneklerde 149,74 µmol/ml/mg protein, en yüksek enzim aktivitesi ise 48 saat UV-C uygulanan örneklerde 178,10 µmol/ml/mg protein olarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Farklı dozlarda UV-C radyasyon uygulanan *D. radiodurans* ve rekombinant suşlarda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitesi

Bakteri	UV-C Uygulama Süresi	SOD Aktivitesi ( $\mu\text{mol/ml/mg}$ protein)	KAT Aktivitesi ( $\mu\text{mol/ml/mg}$ protein)
<i>D. radiodurans</i> (yabanıl)	6 saat (kontrol)	124,3 $\pm$ 10,1	158,66 $\pm$ 8,5
	6 saat (UV-C)	79,06 $\pm$ 7,5	53,34 $\pm$ 6,4
	12 saat (kontrol)	229,4 $\pm$ 8,6	189,21 $\pm$ 10,4
	12 saat (UV-C)	235,06 $\pm$ 9,3	197,15 $\pm$ 8,6
	24 saat (kontrol)	252,93 $\pm$ 15,5	178,36 $\pm$ 9,4
	24 saat UV-C	939,04 $\pm$ 14,2	278,66 $\pm$ 11,2
	48 saat (kontrol)	216,07 $\pm$ 7,6	166,34 $\pm$ 9,3
	48 saat (UV-C)	19,2 $\pm$ 2,3	1,77 $\pm$ 0,9
<i>D. radiodurans</i> (vgb)	6 saat (kontrol)	139,27 $\pm$ 4,7	52,94 $\pm$ 4,2
	6 saat (UV-C)	534,8 $\pm$ 26,4	102,24 $\pm$ 5,3
	12 saat (kontrol)	265,1 $\pm$ 8,7	52,27 $\pm$ 4,5
	12 saat (UV-C)	372,5 $\pm$ 9,6	155,66 $\pm$ 8,7
	24 saat (kontrol)	201,5 $\pm$ 6,3	57,18 $\pm$ 5,6
	24 saat UV-C	1002,2 $\pm$ 18,5	118,06 $\pm$ 9,2
	48 saat (kontrol)	330,2 $\pm$ 12,4	60,81 $\pm$ 6,3
	48 saat (UV-C)	1427,07 $\pm$ 19,6	237,4 $\pm$ 12,3
<i>D. radiodurans</i> (pUC8)	6 saat (kontrol)	223,3 $\pm$ 11,3	38,58 $\pm$ 11,2
	6 saat (UV-C)	563,27 $\pm$ 10,4	165,27 $\pm$ 9,7
	12 saat (kontrol)	310,3 $\pm$ 9,6	41,74 $\pm$ 6,7
	12 saat (UV-C)	370,13 $\pm$ 11,2	149,74 $\pm$ 8,9
	24 saat (kontrol)	252,5 $\pm$ 8,9	60,57 $\pm$ 7,2
	24 saat UV-C	569,32 $\pm$ 11,2	172,11 $\pm$ 9,7
	48 saat (kontrol)	210,6 $\pm$ 7,8	65,90 $\pm$ 4,5
	48 saat (UV-C)	579,19 $\pm$ 13,2	178,10 $\pm$ 6,6

#### 4.5. . UV-C Uygulaması Sonrası Karotenoid Miktarındaki Değişimler

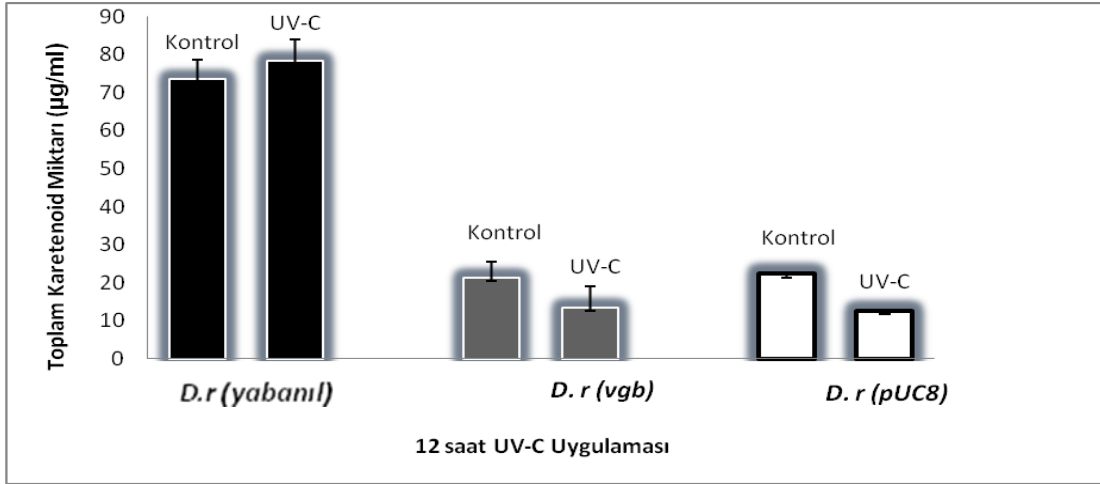
6, 12, 24 ve 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karotenoid miktarındaki değişimler, *D. radiodurans* (yabani) ve rekombinantları için tespit edilmiştir. Buna göre 6 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans* (yabani)'a turuncu rengini veren karotenin kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 4,5 kata çıkmıştır. 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.6 *D. radiodurans* (yabani) ve rekombinantlarının 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karotenoid miktarındaki değişimler

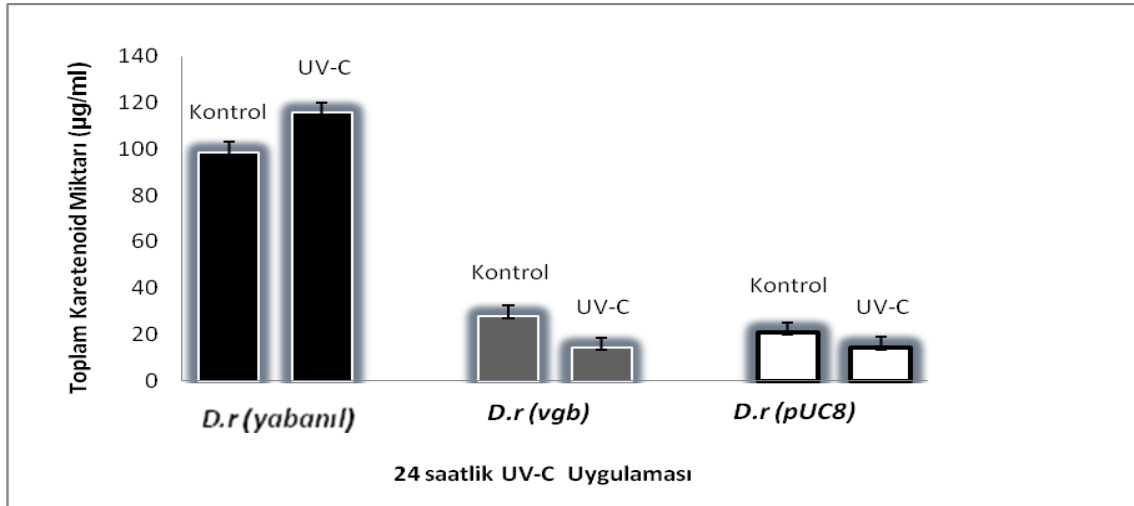
12 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans* (yabani)'ın kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 6 kata çıkmıştır. 12 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 4.7' de verilmiştir.





**Şekil 4.7** *D. radiodurans (yabanıl)* ve rekombinantlarının 12 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler

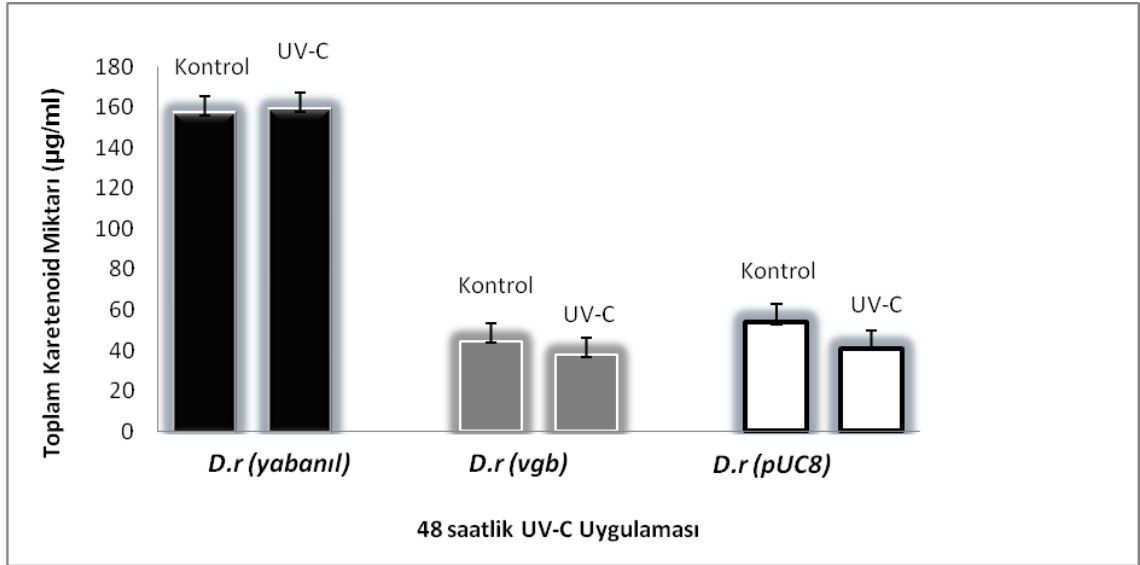
24 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans (yabanıl)*'in kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 8 kata çıkmıştır. 24 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 4.8' de verilmiştir.



**Şekil 4.8** *D. radiodurans (yabanıl)* ve rekombinantlarının 24 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karetenoid miktarındaki değişimler

48 saatlik UV-C uyguladığımız gruplarla kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans (yabanıl)*' in kontrol gruplarındaki karoten miktarının rekombinant

bakterilerden yaklaşık 3,5 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. UV-C uygulamasına bağlı olarak bu fark 4,2 kata çıkmıştır. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakterilerin karoten miktarındaki değişimler Şekil 4.9' de verilmiştir.

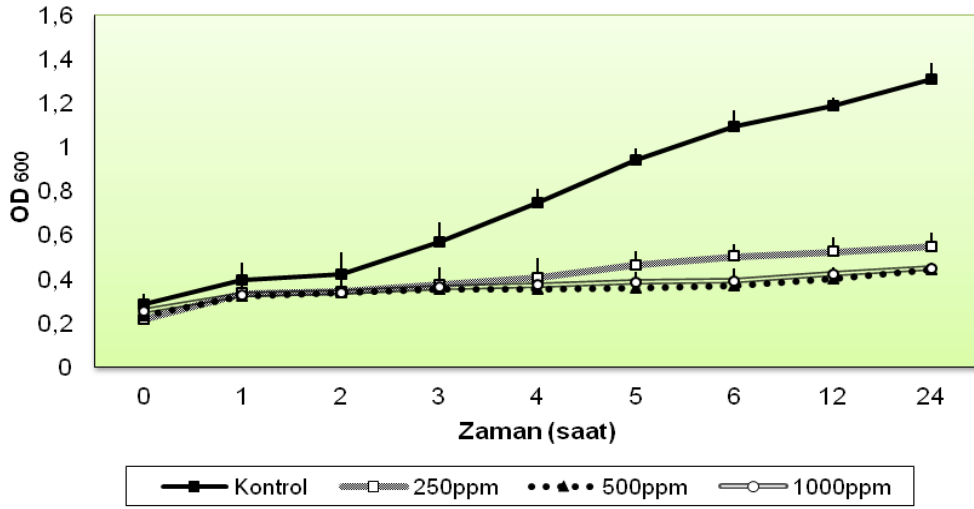


Şekil 4.9 *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası toplam karotenoid miktarındaki değişimler.

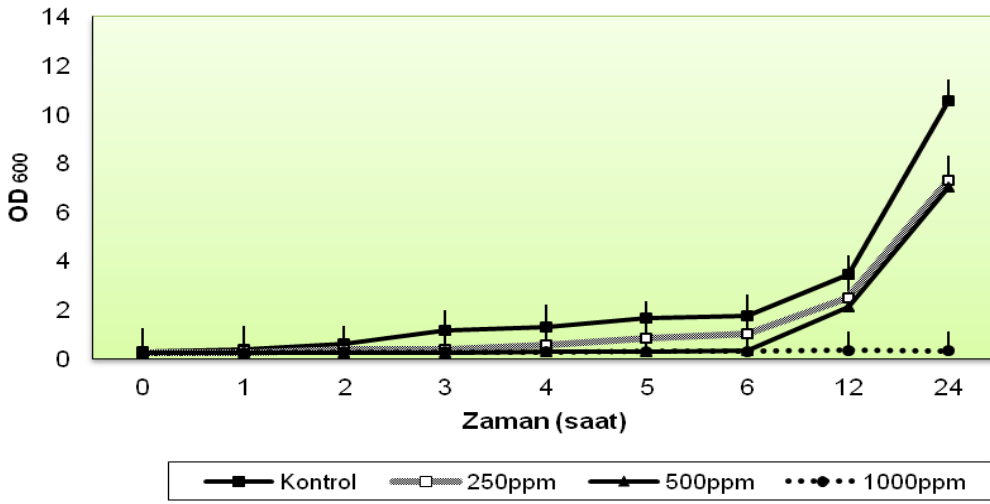
#### 4.6. Bakterilerin Cd (II) Varlığındaki Üreme Potansiyelleri

*D. radiodurans* ve rekombinantlarının üreme ortamlarına Cd (II) eklenmiş ve bakterilerin bu toksik metal varlığındaki üreme potansiyelleri Şekil 4.10' da verilmiştir.

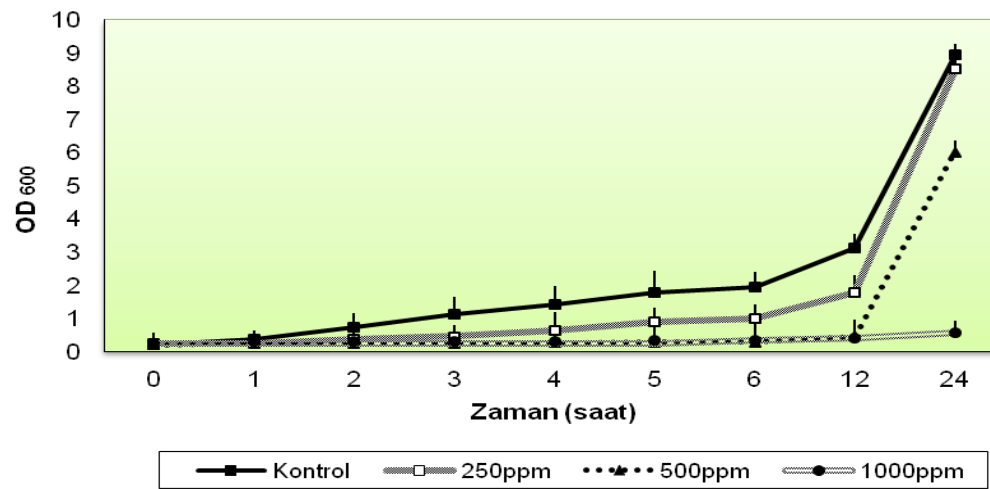
Bir mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese, farklı yanıtlar verebilir. Bakteriler zayıf stres olarak adlandırılan sublethal bir stres ile karşılaştıklarında, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Fakat üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır. *D. radiodurans* (yabanıl)' da Cd toksisitesine, Cd dozuna bağlı olarak üreme oranındaki düşüşle karşılık vermiştir. Buna göre 250 ppm Cd uygulanan örneklerle 1000 ppm Cd uygulanan örnekler neredeyse aynı derecede bu toksisiteden etkilenmiştir.



a)



b)



c)

Şekil 4.10. *D. radiodurans* ve rekombinantlarının Cd varlığında üreme potansiyelleri a) *D. radiodurans* (yabanıl), b) *D. radiodurans* (vgb), c) *D. radiodurans* (pUC8)

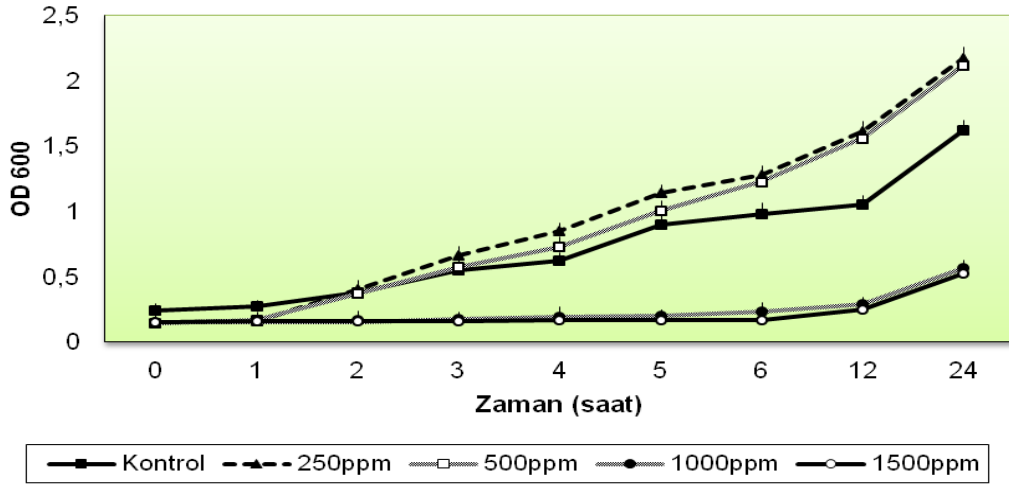
*D. radiodurans* vgb<sup>+</sup> ve vgb<sup>-</sup> bakterilerinde ise, besi ortamındaki Cd toksisitesine benzer cevaplar vermişlerdir. Her iki bakterisinde uygulanan Cd dozuna bağlı olarak üreme potansiyellerinde meydana gelen azalma 1000 ppm' lik Cd uygulamasının yapıldığı örneklerde daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. 250 ve 500 ppm Cd uygulanan örnekler, kontrol gruplarına daha yakın bir üreme yoğunluğu tespit edilmiştir.

#### **4.7. Bakterilerin Cr (III) Varlığındaki Üreme Potansiyelleri**

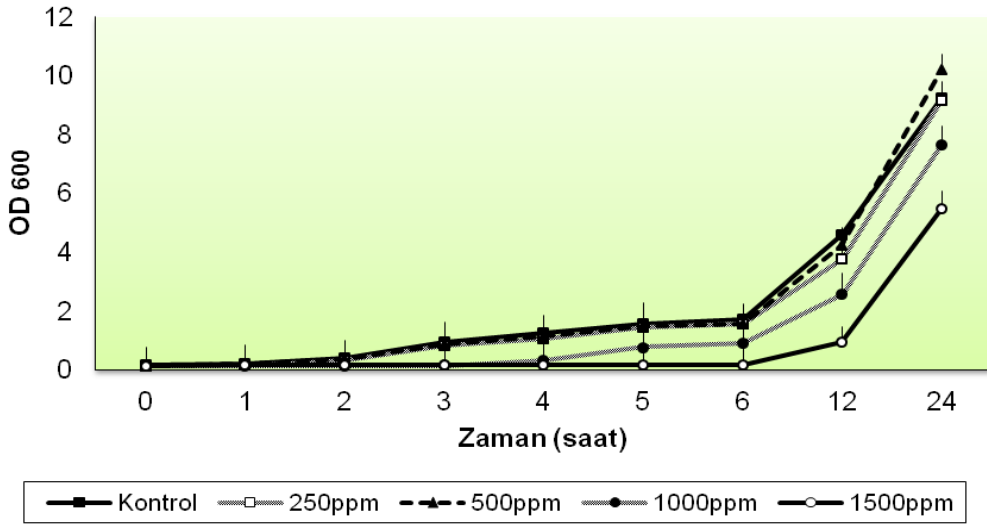
*D. radiodurans* (yabani) ve vgb<sup>+</sup> vgb<sup>-</sup> rekombinantlarının besi ortamına farklı dozlarda eklenen Cr varlığındaki üreme yoğunlukları Şekil 4.11' de verilmiştir. Buna göre *D. radiodurans* (yabani)' in 250 ve 500 ppm gibi daha düşük Cr uygulamasının yapıldığı örneklerde kontrol grupları da dahil daha iyi bir üreme potansiyeli sergilediği gözlenmiştir. 1000 ve 1500 ppm' lik Cr uygulamasının yapıldığı örnekler ise benzer üreme eğrilerine sahip olup diğer gruplardan daha düşük bir üreme potansiyeline sahiptirler.

*D. radiodurans* (vgb) rekombinantı, besi ortamına farklı dozlarda eklenen Cr varlığında kontrol gruplarına yakın üreme yoğunlukları sergilemiştir. Bakteride doz artışına paralel olarak üremelerinde de bir gerileme tespit edilmiştir. En düşük üreme potansiyeli 1500 ppm ' lik Cr uygulanan örneklerde görülmüştür

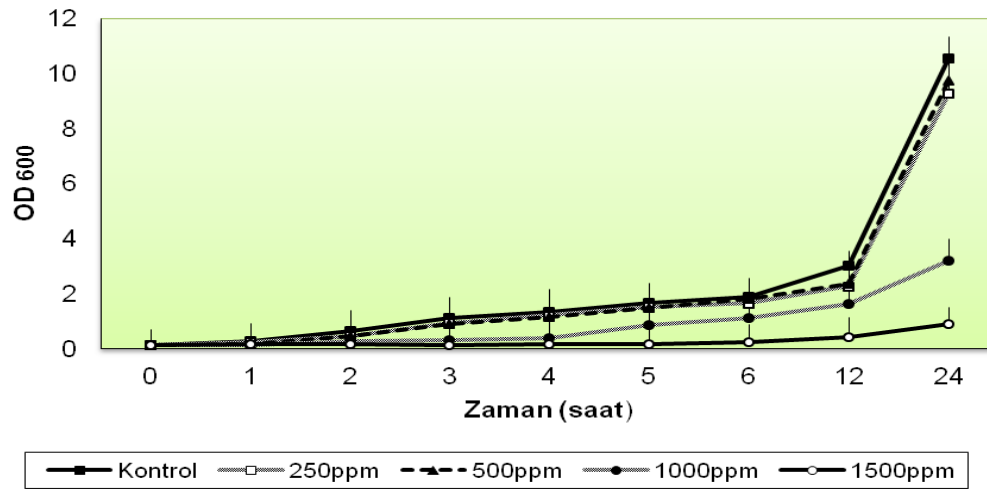
*D. radiodurans* (pUC8), uygulanan Cr dozuna bağlı olarak kontrol grubuyla benzer üreme yoğunluğuna sahiptir. En iyi ürediği doz 250 ppm ve Cr' un toksisitesinden en çok etkilendiği doz ise 1500ppm' dir.



a)



b)



c)

**Şekil 4.11.** *D. radiodurans* ve rekombinantlarının Cr varlığında üreme potansiyelleri a) *D. radiodurans* (yabanıl), b) *D. radiodurans* (vgb), c) *D. radiodurans* (pUC8)

## 4.8. Bakterilerin Cd (II) Biyosorpsiyonu

*D. radiodurans* ve rekombinantları ile en uygun  $Cd^{+2}$  iyonu giderim koşullarının belirlenmesi amacıyla, doz ve süre, sıcaklık, pH, çalkalama hızı gibi biyosorpsiyon parametreleri incelenmiştir. pH çalışması için 4.0-9.0 aralığında, başlangıç  $Cd^{+2}$  iyon konsantrasyonu için 250-1500 mg/l aralığında ve 0-180dakika süre ile değişen aralıklarda örnekler alınarak  $Cd^{+2}$  biyosorpsiyon kapasiteleri ölçülmüştür. Bütün çalışmalar 250 ml'lik erlenlerde 50 ml çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir

### 4.8.1. Doz- Süre Optimizasyonu

Biyosorpsiyon çalışmalarında en iyi Cd gideriminin olduğu doz ve süreyi tespit etmek için, her üç bakteri 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm ve 1500 ppm' lik Cd dozlarında 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 saat boyunca 32 °C' de muamele edilmiştir. Buna göre bakterilerin Cd biyosorpsiyon yetenekleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

*D. radiodurans* (yabanıl)' in belli doz ve sürelerdeki biyosorpsiyon kapasitelerini incelediğimizde bakterinin en iyi Cd biyosorbe ettiği doz ve sürenin 250 ppm ve 60 dk. olduğu tespit edilmiştir (% 86,4). En düşük biyosorpsiyon kapasitesi ise 500 ppm' de 15.dk'da tespit edilmiştir ( % 28,82)

*D. radiodurans* (vgb)' nin belli doz ve sürelerdeki biyosorpsiyon kapasitelerini incelediğimizde en iyi Cd biyosorpsiyonunun olduğu doz ve süre 250 ppm ve 60 dk. olarak tespit edilmiştir (% 76,5). En düşük biyosorpsiyon kapasitesi ise 1000 ppm ve 60 dk' da gözlenmiştir (% 39,23)

*D. radiodurans* (pUC8)' in belli doz ve sürelerdeki biyosorpsiyon kapasitelerini incelediğimizde bakterinin Cd biyosorpsiyon yeteneğinin diğer bakterilere oranla çok daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Değerlerin birbirinden çok farklı olmamasından dolayı bakterinin en iyi Cd biyosorbe edebildiği doz ve süre yine 250 ppm ve 60 dk. olarak kabul edilmiştir (% 30,4). En düşük biyosorpsiyon kapasitesi ise 500 ppm ve 90 dk' da gözlenmiştir (% 9,22)

**Çizelge 4.3.** *D. radiodurans* yabanıl ve rekombinant bakterilerin Cd(II)' i belli doz ve sürelerde biyosorbe etme %' leri a) *D.radiodurans* (yabanıl) b) *D.radiodurans* (vgb) ve c) *D.radiodurans* (pUC8)

a)

Zaman(dk)	Cd doz miktarı (ppm)			
	250	500	1000	1500
15	45,92	28,82	38,48	47,96
30	61,65	37,14	37,13	50,99
60	86,4	40,6	41,34	51,3
90	79,9	40,06	40,48	47,09
120	76,1	40	39,13	47,7
180	75,25	39,82	41,34	50,9

b)

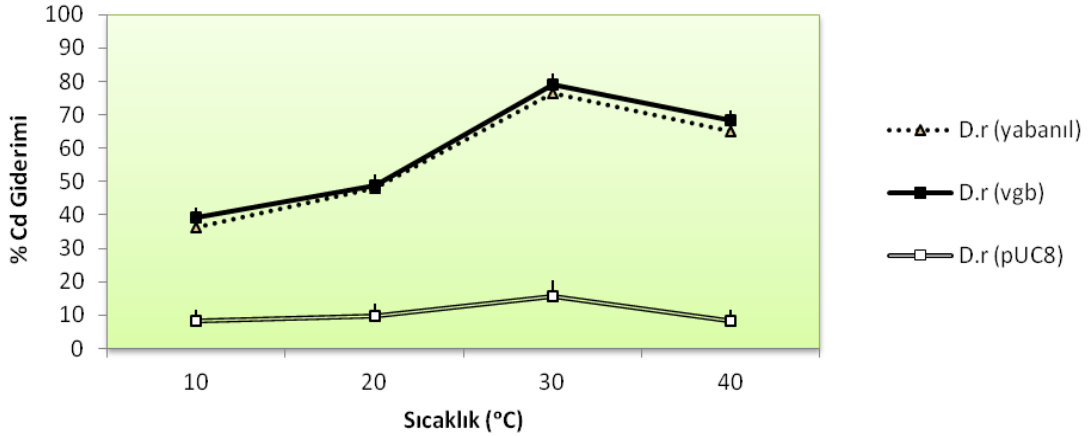
Zaman(dk)	Cd doz miktarı (ppm)			
	250	500	1000	1500
15	49,56	41,6	42,35	53,6
30	48,72	54,32	41,35	52,9
60	76,5	48,4	39,23	56
90	66,44	47,46	46,31	54,77
120	69,75	41,98	40,67	55,9
180	63,04	40,14	39,53	55,7

c)

Zaman(dk)	Cd doz miktarı (ppm)			
	250	500	1000	1500
15	11,36	9,76	32,59	28,7
30	11,72	9,44	32,73	28,86
60	30,4	9,26	33,68	28,06
90	10,04	9,22	34,92	24,73
120	10	14,86	33,51	27,1
180	9,28	13,98	32,88	27,93

#### 4.8.2.. Sıcaklık Optimizasyonu

Biyosorpsiyonun gerçekleşmesi için ısıya ihtiyacı olup olmadığını belirlemek ve ortam sıcaklığının biyosorpsiyon üzerine etkisini tespit etmek amacıyla *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin farklı sıcaklıklardaki biyosorpsiyon kapasiteleri araştırılmış ve Şekil 4.12' deki gibi bulunmuştur.



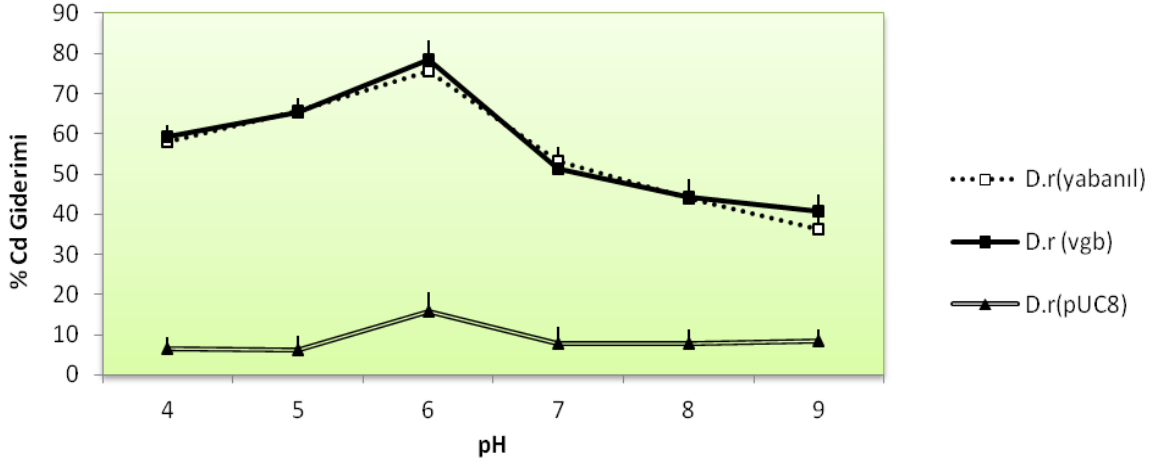
Şekil 4.12 *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant suşların farklı sıcaklıklardaki Cd biyosorpsiyon %' leri

Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl) ve *D. radiodurans* (vgb) 'nin farklı sıcaklıklardaki biyosorpsiyon kapasitesinin birbirine çok yakın olduğu ve en iyi Cd biyosorpsiyonunun gerçekleştiği sıcaklığın 30 °C olduğu tespit edilmiştir. *D. radiodurans* (pUC8) ise diğer bakterilere oranla daha düşük biyosorpsiyon kapasitesine sahip olmakla birlikte en iyi Cd biyosorpsiyonunun 30 °C' de gerçekleştiği saptanmıştır.

#### 4.8.3. pH Optimizasyonu

Çözeltinin pH' ısı solüsyondaki metal iyonlarının çözünürlüğünü ve hücre duvarındaki fonksiyonel grupların iyonizasyon durumunu etkilediği için önem taşımaktadır. Bu pH değişimlerinin *D. radiodurans* ve rekombinant bakterilerdeki biyosorpsiyon yeteneği üzerine etkisini tespit etmek amacıyla bakterilerin farklı pH' lardaki biyosorpsiyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.13' da verilmiştir.



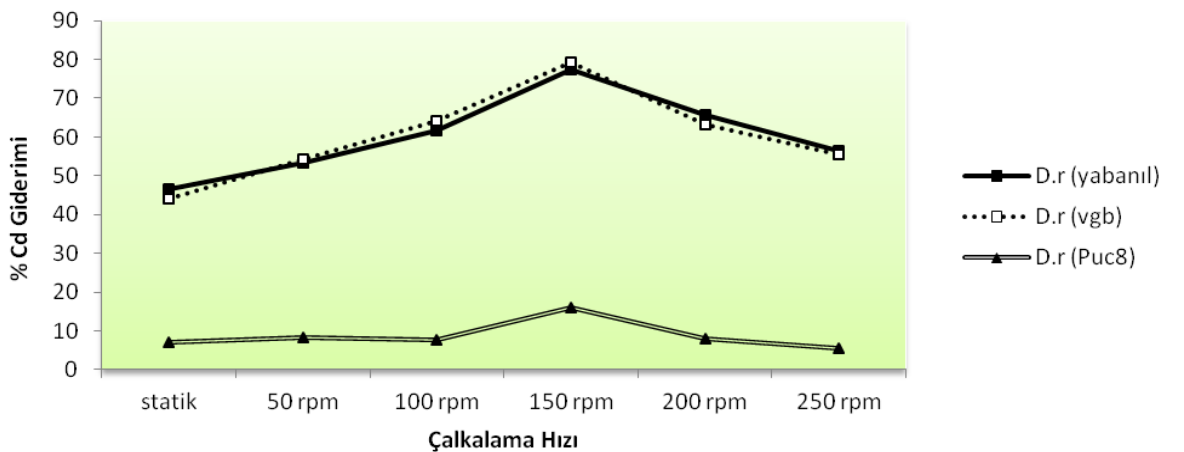


**Şekil 4.13** *D. radiodurans* ve rekombinant suşların farklı pH' lardaki Cd biyosorpsiyon kapasiteleri

Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl) ve *D. radiodurans* (vgb) 'nin farklı pH' lardaki biyosorpsiyon kapasitesinin birbirine çok yakın olduğu ve en iyi Cd biyosorpsiyonunun pH=6' da gerçekleştiği tespit edilmiştir. *D. radiodurans* (pUC8) ise diğer bakterilere oranla daha düşük biyosorpsiyon kapasitesine sahip olmakla birlikte en iyi Cd biyosorpsiyonu yine pH= 6'da tespit edilmiştir.

#### 4.8.4. Karıştırma Hızı Optimizasyonu

Metal biyosorpsiyonuna etki eden faktörlerden biri olan ortamın karıştırma hızının *D. radiodurans* ve rekombinantlarının biyosorpsiyon yeteneğine etkisini tespit etmek amacıyla bakteriler farklı karıştırma hızlarında ve diğer optimum şartlarda bırakılarak biyosorpsiyon kapasiteleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4. 14' da verilmiştir.



**Şekil 4.14** *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının farklı karıştırma hızlarındaki biyosorpsiyon kapasiteleri

Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl) ve *D. radiodurans* (vgb) 'nin farklı karıştırma hızlarındaki biyosorpsiyon kapasitesinin birbirine çok yakın olduğu ve en iyi Cd biyosorpsiyonunun 150 rpm' lik karıştırma hızında görüldüğü tespit edilmiştir. *D. radiodurans* (pUC8) ise daha düşük bir biyosorpsiyon kapasitesine sahip olup yine en iyi giderim 150 rpm' lik örneklerde kaydedilmiştir.

#### **4.9. Bakterilerin Cr (III) Biyosorpsiyonu**

*D. radiodurans* ve rekombinantları ile en uygun Cr(III) iyonu giderim koşullarının belirlenmesi amacıyla, doz ve süre, sıcaklık, pH, çalkalama hızı gibi biyosorpsiyon parametreleri incelenmiştir.

##### **4.9.1. Doz- Süre Optimizasyonu**

Biyosorpsiyon çalışmalarında en iyi Cr gideriminin olduğu doz ve süreyi tespit etmek için, her üç bakteri 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm ve 2000 ppm' lik Cr dozlarında 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 saat boyunca 32 °C' de muamele edilmiştir. Buna göre bakterilerin Cr biyosorpsiyon yetenekleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** *D. radiodurans* yabancı ve rekombinant suşların Cr (III)' i belli doz ve sürelerde biyosorbe etme %' leri a) *D.radiodurans* (yabancı) b) *D.radiodurans* (vgb) ve c) *D.radiodurans* (pUC8)

a)

Zaman(dk)	Cr Doz Miktarı				
	250ppm	500ppm	1000ppm	1500ppm	2000ppm
15	56,96	78,04	89,09	92,77	94,58
30	57,12	77,94	88,95	92,21	94,55
60	56,52	77,76	88,92	92,68	94,53
90	56,12	77,58	88,82	92,63	94,46
120	57,24	78,08	89,09	92,8	94,63
180	57,6	78,28	89,23	92,83	94,65

b)

Zaman(dk)	Cr Doz Miktarı				
	250ppm	500ppm	1000ppm	1500ppm	2000ppm
15	57,16	78,04	89,06	92,72	94,59
30	57,04	77,9	88,99	92,69	94,35
60	56,64	77,8	88,95	92,65	94,51
90	56,4	77,54	88,92	92,6	94,49
120	57,36	78,18	89,11	92,78	94,63
180	57,76	78,3	89,21	92,8	94,64

c)

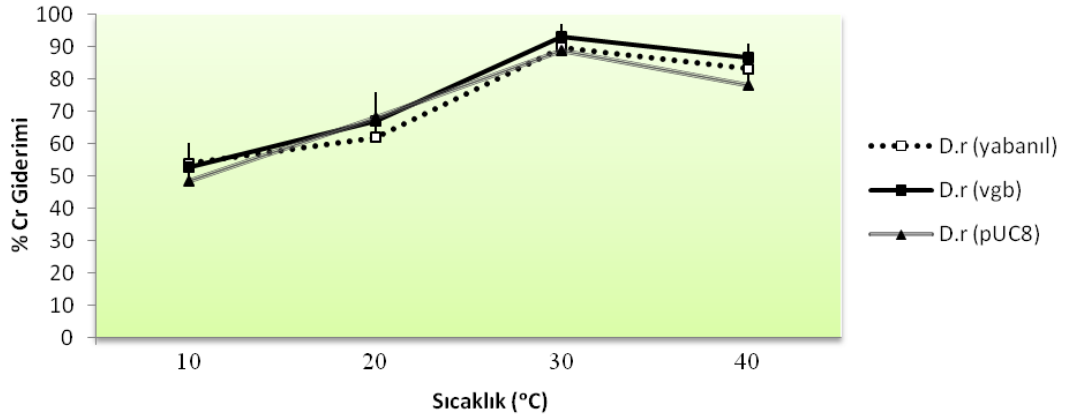
Zaman(dk)	Cr Doz Miktarı				
	250ppm	500ppm	1000ppm	1500ppm	2000ppm
15	57,36	78	89,1	92,8	94,6
30	56,96	77,94	89	92,71	94,55
60	56,68	77,72	88,93	92,65	94,52
90	56,04	77,66	88,88	92,64	94,51
120	57,76	78,14	89,14	92,8	94,62
180	57,6	78,3	89,2	92,82	94,67

*D. radiodurans* (yabancı), (vgb) ve (pUC8)' in belli doz ve sürelerdeki Cr biyosorpsiyon kapasitelerini incelediğimizde bakterilerin doz ve süre artışına paralel olarak Cr biyosorpsiyon oranında arttığı ve birbirine yakın sonuçlar verdikleri tespit edilmiştir. Buna göre her üç bakteri için de en iyi Cr biyosorpsiyonunun gerçekleştiği

doz ve süre yaklaşık olarak 2000 ppm ve 15 dk. olarak kaydedilmiştir. *Yabanıl* için % 94,58, *vgb* için % 94,59 ve *pUC8* için % 94,6).

#### 4.9.2.. Sıcaklık Optimizasyonu

Ortam sıcaklığının biyosorpsiyon üzerine etkisini tespit etmek amacıyla *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin farklı sıcaklıklardaki biyosorpsiyon kapasiteleri araştırılmış ve elde edilen veriler Şekil 4.15' deki gibi şematize edilmiştir.

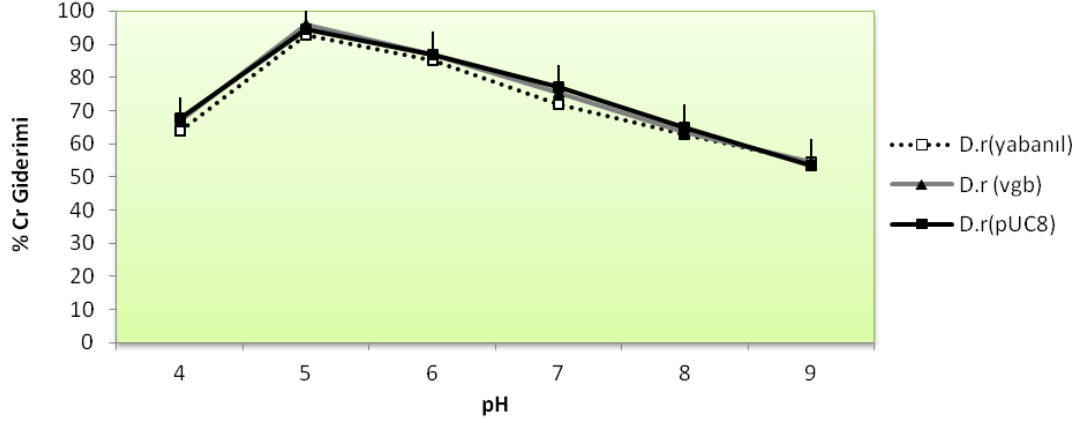


Şekil 4.15 *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant suşların farklı sıcaklıklardaki Cr biyosorpsiyon %' leri

Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin 30 °C' ye kadar sıcaklık artışına paralel olarak Cr biyosorpsiyon kapasitelerinin de arttığını, 30 °C'den sonra ise azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle her üç bakteri için de optimum sıcaklık aralığımız 30 °C olarak kaydedilmiştir.

#### 4.9.3. pH Optimizasyonu

pH değişimlerinin *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakterilerdeki biyosorpsiyon yeteneği üzerine etkisini tespit etmek amacıyla bakterilerin farklı pH' lardaki biyosorpsiyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.16' de verilmiştir.

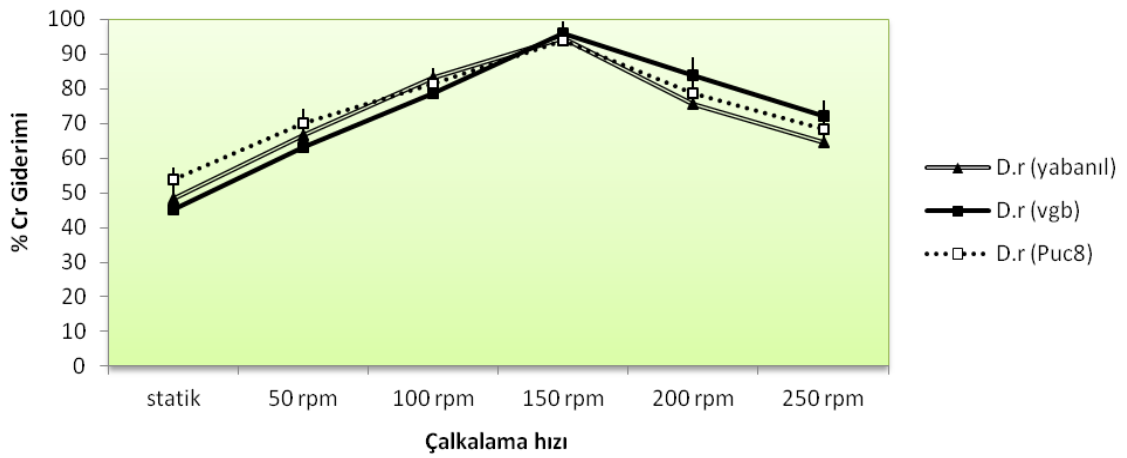


**Şekil 4.16** Yabanıl ve rekombinant suşların farklı pH' lardaki Cr biyosorpsiyon kapasiteleri

Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinant bakterilerin pH= 5' e kadar pH artışına paralel olarak Cr biyosorpsiyon kapasitelerinin de arttığını, pH= 5'den sonra ise azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle her üç bakteri için de optimum pH aralığımız pH= 5 olarak kaydedilmiştir.

#### 4.9.4. Karıştırma Hızı Optimizasyonu

Karıştırma hızının *D. radiodurans* ve rekombinantlarının biyosorpsiyon yeteneğine etkisini tespit etmek amacıyla bakteriler farklı karıştırma hızlarında ve diğer optimum şartlarda bırakılarak biyosorpsiyon kapasiteleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4. 17' de verilmiştir.



**Şekil 4.17.** Yabanıl ve rekombinant suşların farklı karıştırma hızlardaki Cr biyosorpsiyon kapasiteleri

Buna göre *D. radiodurans* (yabani) ve rekombinant bakterilerin 150 rpm' e kadar karıştırma hızındaki artışına paralel olarak Cr biyosorpsiyon kapasitelerinin de arttığını, 150 rpm'den sonra ise bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle her üç bakteri için de optimum karıştırma hızımız 150 rpm olarak kaydedilmiştir.

Elde ettiğimiz bu verilere göre *D. radiodurans* (yabani) ve rekombinant bakterilerin Cd ve Cr metalleri için optimizasyon çalışmamızın özeti aşağıdaki Çizelge 4.3' de verilmiştir.

**Çizelge 4.5** *D. radiodurans*(yabani) ve rekombinantlarının Cd ve Cr için optimizasyon koşulları

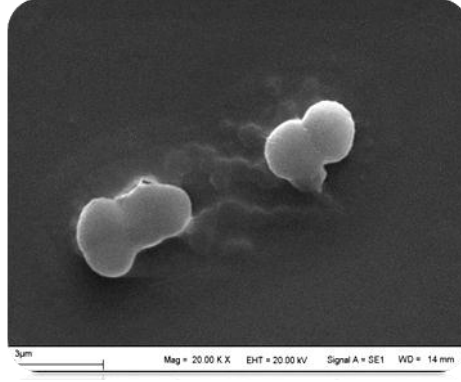
Suş Tipi	Cd					Cr				
	Doz	Süre	Sıcaklık	pH	Karıştırma H.	Doz	Süre	Sıcaklık	pH	Karıştırma H.
<i>D.radiodurans</i> (yabani)	250ppm	60 dk.	30 °C	6	150 rpm	2000ppm	15 dk.	30 °C	5	150 rpm
<i>D.radiodurans</i> (vgb)	250ppm	60 dk.	30 °C	6	150 rpm	2000ppm	15 dk.	30 °C	5	150 rpm
<i>D.radiodurans</i> (pUC8)	250ppm	60 dk.	30 °C	6	150 rpm	2000ppm	15 dk.	30 °C	5	150 rpm

#### 4.10. Bakterilerin Metal Uygulaması Öncesi ve Sonrası SEM Resimleri

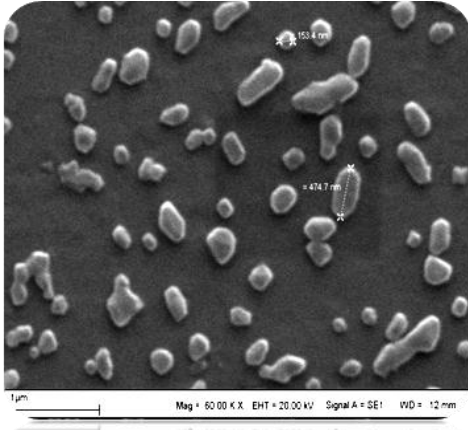
*D.radiodurans*(yabani) ve rekombinantlarının, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimler Scanning Elektron Mikroskopunda yaptığımız incelemeler sonucunda tespit edilmiştir.

*D. radiodurans* (yabani), kok şeklinde ve genel olarak ikili veya dörtlü hücre kümeleri şeklinde bulunurlar. 1500 ppm Cd ve Cr uygulaması sonrası SEM resimlerini kıyasladığımızda bakterinin normal 1,5-3 µm civarındaki hücre boyutu Cd uygulamasından sonra yaklaşık olarak 4 kat daha büyümüştür. Aynı zamanda hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı kaybolarak deformasyonlar gözlenmiştir. Cr uygulamasında ise bakteride sadece ikili hücre yapılarında bozulmalar tespit edilmiştir.

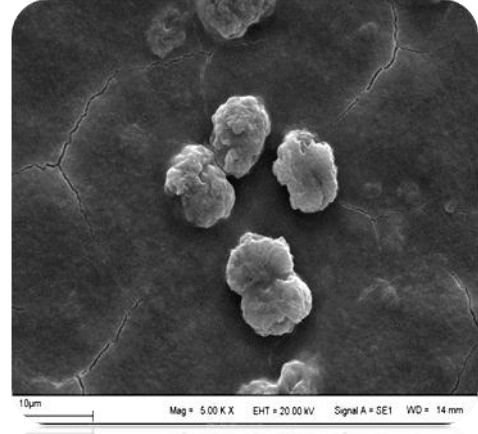
a)



b)



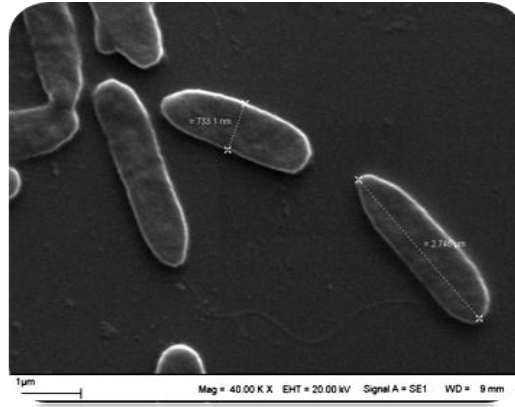
c)



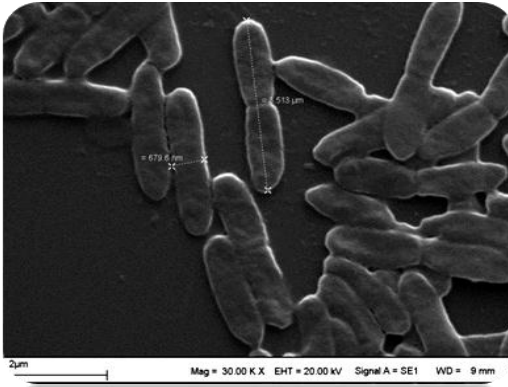
**Şekil 4.18.** *D. radiodurans* (yabanıl)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (yabanıl)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi

*D. radiodurans* (vgb) rekombinantı, yabanılından farklı olarak uzun basil şeklindedir. Cd uygulamasından sonra normal hücre boyutunda bir değişiklik gözlenmezken (2,5-3,8 μm) hücresel yapıda bozulmalar gözlenmiştir. Yine Cr uygulamasından sonra hücre yapısında ve boyutunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

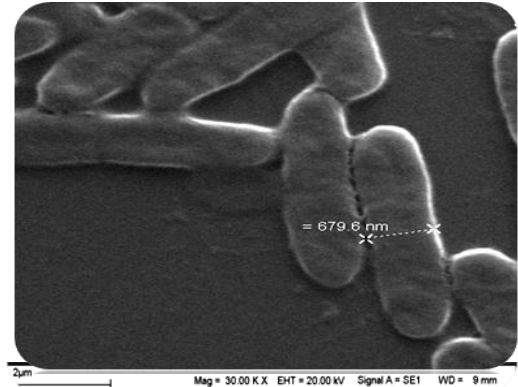
a)



b)



c)

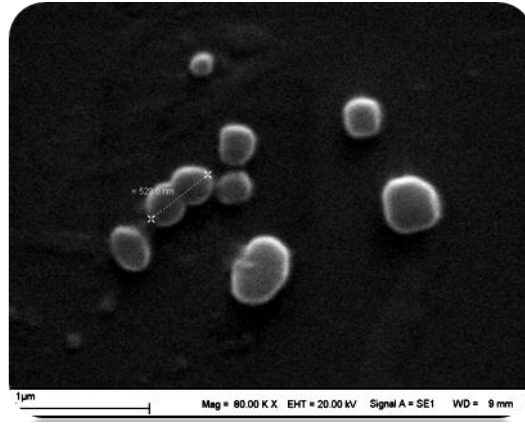


**Şekil 4.19** *D. radiodurans* (vgb)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (vgb)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi

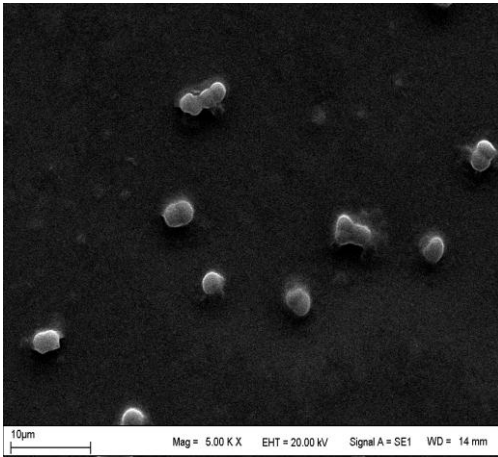
*D. radiodurans* (*pUC8*), yapı olarak yabancıla benzemekle birlikte boyut olarak çok daha küçüktür. Ortalama bir hücre 500 nm ile 1,2 µm arasında değişmektedir. 1500 ppm'lik Cd uygulamasından sonra rekombinant bakterinin boyutu yaklaşık 4 kat artmış ve hücrede deformasyonlar gözlenmiştir. 1500 ppm'lik Cr uygulamasından sonra ise hücre yapısında ve boyutunda herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.



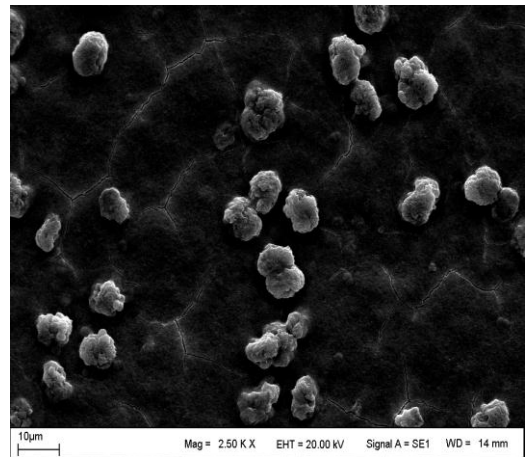
a)



b)



c)



**Şekil 4.20** *D. radiodurans* (pUC8)' in 1500 ppm Cd ve Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (pUC8)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi, c) Cd varlığındaki hücre morfolojisi

#### 4.11. Bakterilerin UV-C Uygulaması Öncesi ve Sonrası SEM Resimleri

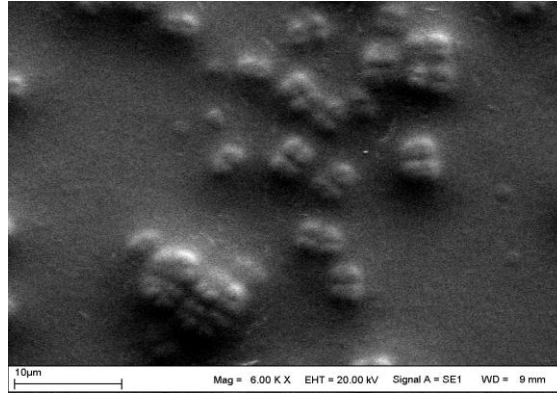
*D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının, UV-C uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimler Scanning Elektron Mikroskopunda yaptığımız incelemeler sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

*D. radiodurans* (yabanıl), kok şeklinde ve genel olarak ikili veya dörtlü hücre kümeleri şeklinde bulunurlar. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası SEM resimlerini kıyasladığımızda bakteri UV-C uygulamasından sonra boyut olarak büyümüş ve daha

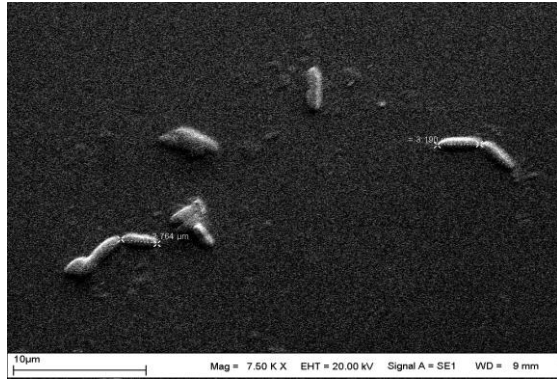
çok dörütlü hücre kümeleri halinde görülmüştür. Aynı zamanda hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar gözlenmiştir.

*D. radiodurans* (*vgb*) rekombinantının yabanılından farklı olarak uzun basil yapısında olan şekli, 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası boyut olarak oldukça küçülmüş ve hücre yapısında bozulmalar gözlenmiştir.

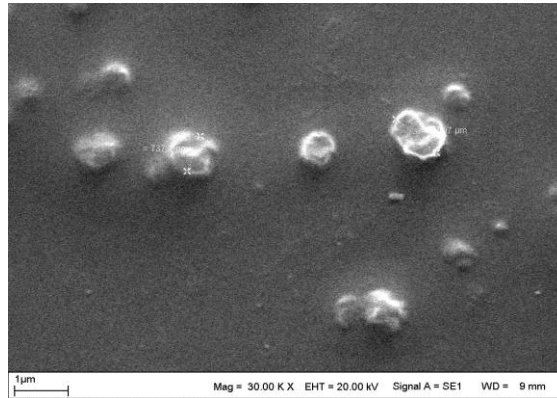
*D. radiodurans* (*pUC8*), yabanıl tipteki bakteri gibi kok şelindedir. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakteri boyut olarak büyümüş ve hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar gözlenmiştir.



a)



b)



c)

**Şekil 4.21** *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantlarının 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası Hücre yapılarında meydana gelen değişimler. a) *D. radiodurans* (yabanıl), b) *D. radiodurans* (vgb), c) *D. radiodurans* (pUC8)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Ağır Metal Uygulamasının Bakterilerin Üreme Potansiyelleri Üzerine Etkisi

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu endüstrilerden gelen atık sular kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler (Gadd ve Griffiths 1978, Ting vd., 1991, Wong ve Kwok 1992). Özellikle atık sulardaki kimyasal kirleticilerin biyolojik olarak arıtılması konusunda yoğunlaşan çalışmalarda, farklı türlerden mikroorganizmaların, toksik olduğu bilinen ağır metal çeşitlerini gerek biyosorbsiyon gerekse biyobirikim yoluyla zararsız veya daha az toksik formlarına dönüştürebildikleri, hücre duvarlarındaki fonksiyonel gruplarla veya salgılarıyla tutabildikleri, hücre içi sistemleriyle biriktirebildikleri ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada, bir çok stres faktörüne karşı direnç gösterebilen *D. radiodurans* ve bu bakterinin pUC8 plazmitini taşıyan rekombinantı ile aynı plazmitin vgb genini taşıyan formu olan pUC8:15 plazmitini taşıyan rekombinantı kullanılmıştır. Cd<sup>+2</sup> ve Cr<sup>+3</sup> gibi ağır metallerin bu bakterilerin hem üreme potansiyelleri üzerine etkisi tespit edilerek aynı zamanda vgb geninin bu stres koşulları altında organizmaya sağlayacağı katkı araştırılmak istenmiştir.

VHb/vgb sisteminin ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktarılarak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağlaması önemli bir avantajdır (Qazi vd., 1993). Bakterinin bu avantajı kullanabilmesi onun herhangi bir stres faktörüne karşı adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır. Çünkü vgb geninin ifade edildiği bakterilerin üreme hızlarında bir artışın olduğu saptanmıştır (Liu vd.,1995). Bakterilerin bilinen jenerasyon sürelerini kıyasladığımızda (110 dk /20 dk) ortalama 5,5 katlık bir fark bulunmaktadır. Bizde yaptığımız çalışmada 24 saatlik vgb<sup>-</sup> ve vgb<sup>+</sup> suşlarının yabanıl suş ile karşılaştırıldığında üreme hızının yaklaşık 5,46 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bakteri hücresi bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Uygulanan stres neticesinde bakteri DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve bu mRNA

ribozomlarda translasyon sonucunda ilgili stresi düzenleyici şok proteinini sentezlemiş olmaktadır. Sentezlenen düzenleyici şok proteini bakterinin fizyolojisini etkileyerek, uygulanan stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşıda etkili olabilmektedir. Ayrıca her bakterinin bir strese karşı aktive ettiği direnç mekanizmaları aynı olabildiği gibi farklı da olabilmektedir. Hatta aynı bakterinin farklı gelişim evrelerindeki (lag faz, log faz, statik faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (Neidhardt ve VanBogelen, 2009, Yousef ve Courtney 2003, Arsene vd., 2000, Cronan 2002). *E. coli*'de hidrojen peroksit ve süper oksit ile uyarılan en önemli düzenleyici genler *oxyR* ve *soxRS* dir. Ayrıca  $\sigma^S$  de ozmotik stres hasarının onarılmasında kullanılan proteinlerin düzenlenmesinde sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Dikici., 2009)

Yabani ve rekombinant *D. radiodurans* bakterilerinin farklı dozlardaki Cd ve Cr gibi toksik metallerin üreme ortamına eklenip bunların üreme potansiyellerindeki değişimini incelediğimiz deneyimizde,  $Cd^{+2}$ 'nin her üç bakteriyi de  $Cr^{+3}$ 'den daha fazla etkilediğini gördük. Çünkü Cd, çeşitli hücre sel zararlar neden olan ve biyolojik olarak elzem olmayan iki değerlikli tehlikeli bir metaldir. Cd toksisitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar çok çeşitli ve komplekstir. Diğer iz elementlerin (örneğin Cr, Fe ve Cu) aksine Cd, aktif bir redoks metali değildir ve bu yüzden de reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi için elektron transfer reaksiyonlarını direkt olarak katalizlemez. Fakat Cd' nin indirekt olarak, glutatyon, metalotiyoninler ve protein bağlı sülfidril grupları gibi serbest radikal temizleyicilerin miktarındaki azalma ile protein ve membran lipitlerinin oksidasyonuna ve DNA hasarına yol açmaktadır. Hücre içi Cd'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 bilinmektedir.

$Cd^{+2}$  uyguladığımız bakterilerden *D. radiodurans* (yabani), 250 ppm 'den 1500 ppm' lik uygulamaya kadar bu metalin toksisitesinden hemen hemen aynı düzeyde etkilenmiştir. Rekombinantlar ise genel olarak 1500 ppm' in üzerine çıktığında metalin toksisitesinden etkilenerek üremenin sınırlandığı görülmüştür. *D. radiodurans*, DNA hasarı, yüksek seviyede iyonize radyasyon, kuraklık ve DNA' ya zarar veren kimyasallar gibi bir çok ajan ve koşula olan direnciyle iyi bilinen bir ekstremofildir. Güçlü DNA tamir işlemleri, bu dirençte anahtar element olan hasar gören DNA fragmentlerinden, fonksiyonel bir genoma yeniden yapılandırılmaktadır. Cd, çeşitli

DNA tamir işlemlerini bloke ederek gonotoksik ve mutajenik olaylara neden olabilen en toksik ağır metallere biridir. Fakat *D. radiodurans*'ın bu etkili mutajene cevabı, henüz tam olarak bilinmemekle birlikte yaptığımız çalışma ile bakterinin uygulanan doz miktarı arttıkça etkin savunma mekanizması sayesinde metalin toksisitesinden daha az etkilendiğini söyleyebiliriz. Cd stresi boyunca gen sentez kalıplarındaki değişimler ve proteom içeriği bir çok organizma için tanımlanmıştır. Örneğin *Escherichia coli* 'nin Cd' ye maruz bırakılması, sıcak şoku, oksidatif stres, acil cevap, soğuk şoku ve SOS gibi çeşitli stres cevap sistemlerinin uyarılmasına neden olmaktadır. Cd maruziyetinde meydana gelen genel değişimler, ribozomal proteinlerin ve çinko bağlayan proteinlerin sentezi, anaerobik metabolizmadaki değişimler ve hasar tamir sistemiyle ilgili genlerin düzenlenmesi, Fe-S gruplarının biyosentezi, Cd detoksifikasyonu ve demirin depo edilmesi gibi olayları içermektedir. *E. coli*'de Cd toksisitesinin Cd direncinde gerekli olan glutatyon gibi sülfür bileşiklerine olan affiniteyi arttırdığı tespit edilmiştir.

*Saccharomyces cerevisiae* Cd'ye maruz kaldığında transkriptomları ve çeşitli biyolojik yolları yönlendirmek için proteomlar yeniden programlanmaktadır. Cd cevabında fonksiyonel kategoriler;

- \* Sülfür ve glutatyon biyosentezi
- \* Transkripsiyon
- \* Hücrelerarası madde taşıma ve sıralama
- \* Karbon metabolizmasının düzenlenmesi
- \* Metal-Fe homeostasisi ve transportu'nu içermektedir.

Cd aynı zamanda mutasyona uğramış hücrelerin apoptozisine neden olan protein glutatyonilasyonunu indüklemektedir.

Kromun biyolojik etkileri, oksidasyon basamaklarına göre değişmektedir;  $Cr^{6+}$  çoğu organizmalar için oldukça toksikken  $Cr^{3+}$  in toksisitesi maruz kalma potansiyeline bağlı olarak değişmektedir. (Wong ve Trevors, 1988; Katz ve Salem, 1993). Krom toksisitesi  $Cr^{6+}$ 'nın daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesi ile ilişkilidir. Kromun DNA üzerindeki hasarı özellikle gen üzerinde toksik etki göstermesidir.  $Cr^{3+}$  enzimlerin karboksil ve sülfidril grupları ile reaksiyona girerek yapı ve aktivitelerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Levis ve Bianchi, 1982). DNA polimeraz ve diğer enzimlerin aktivitelerinin modifikasyonu sonucunda magnezyum iyonları ile  $Cr^{3+}$  yer değiştirebilir (Snow, 1994; Carlos vd.,2001).

$Cr^{+3}$  uyguladığımız yabancı ve rekombinant bakteriler uygulama dozuna bağlı olarak metalin toksisitesinden etkilenmiş fakat bu durum bakterilerin normal üreme potansiyellerini çok değiştirmemiştir. Çünkü  $Cr^{+3}$   $Cd^{+2}$  e nazaran daha az toksik bir metaldir ve bu yüzden de hem yabancı hemde rekombinant bakterilerimiz bu metalin toksisitesinden oldukça az etkilenerek normal üreme döngülerine devam etmişlerdir.

Aynı zamanda *D. radiodurans* (yabancı) ve rekombinantlarının, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimleri tespit ettiğimiz Scanning Elektron Mikroskopunda yaptığımız incelemeler sonucunda,  $Cr^{+3}$  uygulamasının bakterilerin hücre yapılarında, yüksek dozlarda dahi kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık  $Cd^{+2}$  'nin özellikle yüksek dozlarda bakterilerin hücre boyutunda artış ve deformasyonlar yarattığı gözlenmiştir.

*Chlorella vulgaris*, gelişmesi 45-100 ppm Cr (III) veya  $Cr^{6+}$  dan etkilenmezken, 15ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarda *Scenedesmus acutus*'da hiçbir gelişme meydana gelmemektedir (Traviesco vd., 1999). Bununla birlikte Brady ve arkadaşları (1994) *Scenedesmus* ve *Selenastrum* alg kolonisi büyümesinin, 100 ppm Cr (III)'den etkilenmediğini ancak 100 ppm  $Cr^{6+}$  da büyümenin gerçekleşmediğini kaydetmişlerdir. Bu mekanizma alglerin kroma karşı farklı hassasiyetleri olduğunu açığa çıkarmaktadır. *Euglena gracilis*'te  $Cr^{6+}$  varlığında lag büyüme safhası uzamış, Cr (III) varlığında büyüme hızı azalmıştır (Brochiero vd., 1984). Krom tarafından *Chlorella* (Wong ve Trevors, 1988) ve *Scenedesmus*'da (Corradi vd., 1995) fotosentezin engellendiği kaydedilmiştir (Carlos vd., 2001).

## 5.2. Ağır Metal Biyosorpsiyonu

Biyosorpsiyon, biyolojik materyaller kullanılarak adsorpsiyon yoluyla solüsyonlardan metallerin uzaklaştırılmasını sağlayan bir teknolojidir. Biyosorpsiyon sadece tek sorpsiyon mekanizmasıyla sınırlandırılmamıştır, iyon değişimi, şelasyon, çökelme vb. gibi birçok mekanizmadan oluşmaktadır (Sağ vd., 1998). Biyosorpsiyon, endüstriyel atıkların giderimi için umut verici alternatif bir yöntemdir, bunun başlıca nedeni düşük maliyetinin olması ve yüksek metal bağlama kapasitesidir (Sternberg ve Dorn 2002). Biyosorpsiyonda metal iyonları ve canlı ya da cansız materyal arasında fizikokimyasal bir durum gerçekleşir. Bu bağlamda, çevre dostu, ekonomik ve etkili metal adsorbenti için araştırmalar bakteriyel ve algal biyomas gibi biyomateryaller üzerinde odaklanmıştır (Tsezos ve Volesky 1981).

Canlı hücrelerin, sulu çevrelerinden metal katyonlarını toplayarak hücre içinde biriktirmeleri bilinen bir özellik olmasına rağmen, son zamanlarda mikroorganizmaların ağır metal iyonlarını seçici olarak alıkoyma özelliği üzerindeki çalışmalara odaklanılmıştır (Sağ vd, 1998). Ağır metal gideriminde kullanılacak olan mikroorganizmanın iyi bir biyosorbent olmasının yanı sıra ekonomik olarak üretilmesi de önemlidir. Pek çok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan bakteriler ekonomik olarak üretilmeleri, kolay elde edilebilir olmaları, çevresel değişimlere karşı hassas olmamaları gibi nedenlerle ağır metal giderim amacıyla kullanılacak önemli bir kaynaktır (Jianlong., 2002, Gupta vd., 2006). Biyokütlelerin sahip oldukları biyosorpsiyon yetenekleri ile metal iyonlarına karşı gösterdikleri direnç arasında bir korelasyon olup olmadığı yönünde literatürde farklı yaklaşımlar vardır (Rho vd, 2002, Chang vd., 1997).

Metal gideriminde biyosorpsiyon kinetiğini birçok faktör etkilemektedir. Biyosorpsiyon sürecinin gerçekleşebilmesi için bazı optimal koşulların oluşması gerekmektedir. Bu faktörler mikroorganizmanın yüzey özellikleri, film difüzyonu, film kalınlığı, çözeltinin sıcaklığı, pH, başlangıç metal iyon derişimi, karıştırma hızı, mikroorganizma derişimi gibi parametreleri içermektedir. Biyosorpsiyon olayında özellikle pH kritik bir parametredir (İleri., 2000). Hemen bütün organizmaların yüzeyi negatif yüklü olduğundan pozitif yüklü metal iyonları ( $Cu^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Cr^{+6}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  vs.) adsorbe etme yeteneğine sahiptirler. Bazı canlı organizmalar metal iyonlarını hücre içine alarak vakullerde biriktirirler (Ting vd 1989).

Bakterilerin farklı koşullardaki  $Cd^{+2}$  ve  $Cr^{+3}$  gibi metalleri biyosorbe etme kapasitelerini araştırdığımız çalışmamızda her iki metal için de *D. radiodurans* (yabanıl) ve rekombinantları biyosorbent olarak kullanılarak bu metallerin sulu çözeltilerden giderim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bakterilerin  $Cd^{+2}$  ve  $Cr^{+3}$  metallerini en iyi biyosorbe ettiği optimum koşulları tespit ettiğimiz çalışmamızda ilk olarak doz ve süre optimizasyonu yapılmıştır. Buna göre  $Cd^{+2}$  için; *D. radiodurans* (yabanıl), (vgb) ve (pUC8) bakterilerine ait en iyi giderimin olduğu doz ve süre 250 ppm ve 60 dk,  $Cr^{+3}$  için ise 2000 ppm ve 15 dk. olarak tespit edilmiştir. Adsorblama çalışmalarında adsorblama hızına ve miktarına etki eden en önemli etkenlerden birisi de temas süresidir. 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 adsorbat miktarı değişeceği için buna bağlı olarak, adsorbant tarafından adsorblanan molekül miktarı da değişecektir. Adsorblama ilerledikçe çözelti içerisindeki adsorbat 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 çözültide metal iyonu derişimi arttıkça azalmaktadır (Erdem vd., 2004).

Belirlenen optimum metal gideriminin olduğu doz ve temas süreleri sabit tutularak *D. radiodurans* (*yabanıl*) ve rekombinantları için sıcaklığın biyosorpsiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre her iki metal ve her üç bakteri için de optimum sıcaklık 30 °C olarak kaydedilmiştir. Sıcaklık biyosorpsiyonu etkileyen bir diğer faktördür ve biyosorpsiyonun gerçekleştiği reaksiyonlarda önemli bir parametredir. Teorik olarak sıcaklık arttıkça biyosorpsiyon azalmaktadır. Biyosorpsiyonunun ilk anlarında biyokütleyle bağlanan iyonlar artan sıcaklık nedeniyle tekrar biyokütleden salınma eğilimindedirler (Horsfall ve Spiff, 2005, Mungasavalli., 2007). Deng ve ark. benzer sıcaklık aralıklarında gerçekleştirdiği çalışmada sıcaklık artışı ile biyosorpsiyonun arttığını ve gerçekleşen reaksiyonun endotermik olduğunu belirtmişlerdir (Deng vd., 2007). Bu sonuçların yanı sıra Kuyucak ve Volesky *Ascophyllum nodosum* biyokütlesi ile Co giderimi çalışmasında, sıcaklığın 4 °C'den 23 °C'ye yükselmesi sonucu iyonların giderim yüzdesinin % 50-70 arttığını göstermişlerdir. Sıcaklık 40 °C'ye çıktığında ise az miktarda tutunmanın gerçekleştiğini ve 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda biyosorbent in yapısında meydana gelen değişimden dolayı bir değişiklik olduğunu ve biyosorpsiyon kapasitesinde biyokütlenin bozulmasından dolayı azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir (Kuyucak ve Volesky, 1989). Biyosorpsiyon, sıcaklık artışıyla artarken, sıcaklığın düşmesiyle azalır. Bununla birlikte biyosorpsiyon yönteminde ekzotermik parametreler araştırılmış ise sıcaklık azalınca biyosorpsiyon kapasitesi artacaktır (Benefield., 1982).

Bayramoğlu ve diğ. (2004) 5-40° C arasındaki çalışma şartlarında *Lentinus sajor-caju* misellerinin Cr (VI) biyosorpsiyonunu değerlendirmişler ve sıcaklığın artışıyla biyosorpsiyon kapasitesininin 1.4-1.5 kat arasında arttığını gözlemlemişlerdir



(Bayramoglu vd., 2005). Tewari ve diğ. (2005) sıcaklığın artışıyla *Mucor hiemalis* türlerinin biyosorpsiyon kapasitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Maksimum biyosorpsiyon kapasitesi 50 °C'de görülmüştür (Tewari vd., 2005) Zouboulis ve diğ. (2003) metallere kirlenmiş topraklardan elde ettikleri bakteri türleriyle yaptıkları çalışmada sıcaklığın artışıyla metal alımının arttığını belirtmişlerdir. Metal alım kapasitesinin sıcaklıkla artışı; biyokütle üzerindeki metalle ilgili çekim gücünün artışıyla açıklanmıştır. Ancak sıcaklığın aşırı yükselmesiyle hücrenin yüzeyi zarar göreceğinden metal sorpsiyonu düşmektedir (Zouboulis vd., 2004)

Belirlenen optimum metal gideriminin olduğu doz, temas süresi ve sıcaklığın sabit tutularak *D. radiodurans*(yabani) ve rekombinantları için pH' nin biyosorpsiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre her üç bakterinin Cd<sup>+2</sup> için yapılan optimizasyonunda en iyi giderimin olduğu pH= 6, Cr<sup>+3</sup> için yapılan optimizasyon çalışmamızda ise en iyi giderimin olduğu pH= 5 olarak tespit edilmiştir. Metal-mikroorganizma etkileşimlerinde ortamın pH değeri, metalin formunu ve hücrede bulunan, metal ilgisine sahip olan fonksiyonel grupları önemli derecede etkilemesi nedeniyle biyosorpsiyon süreçlerinde önemli bir parametredir (Gadd., 1990). Düşük pH değerine sahip çözeltilerde ortamda bulunan yüksek orandaki protonlar ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara bağlanmak için yarışmakta ve bu da hücre-metal arasındaki etkileşim potansiyelini azaltmaktadır. Ancak çözeltinin pH değeri arttıkça protonların azalması ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara daha fazla bağlanabileceklerdir. pH= 5.0 değerinden itibaren pH değeri arttıkça ortamdaki OH<sup>-</sup> iyon konsantrasyonu da artmakta ve dolayısıyla metal iyonlarını çöktürmektedir. Bu durum bizim tespit ettiğimiz pH=5 ve pH= 6 değerlerine kadar pH arttıkça biyosorpsiyon kapasitesinin de artmasını açıklamaktadır.

Guibal vd. (1992) tarafından yapılan *Mucor miehei* ile uranyum biyosorpsiyonu çalışmasında pH'nın hücre duvarları veya metallere kimyasal yapıları üzerinde etkili olduğunu gözlemişlerdir. Tsezos ve Volesky (1981), çözeltinin pH'sının metal iyonları ve hidronyum iyonları arasında bağlanma bölgelerinde rekabet etmelerinden dolayı metal tutulmasının azaltacağını ifade etmişlerdir. Kiff ve Little (1986), pH'daki artış ile *A. oryzae* üzerinde kadmiyumun biyosorpsiyonunun arttığını ortaya çıkarmışlardır. Lewis ve Kiff (1988)'in *Rhizopus arrhizus* kullanarak yapmış oldukları deneysel çalışmada asidik pH değerinde, düşük sıcaklık ve rekabet eden iyonların varlığında biyomasın biyosorpsiyon kapasitesinin azaldığını saptamışlardır. Çalışma sonucunda optimum pH değerinin 6 ila 9 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

*Penicillium digitatum* ile Pb, Cd, Zn ve Ni biyosorpsiyonunda pH'a duyarlılığın yüksek olduğu gözlenmiş ve pH 3'ün altına düştüğü zaman biyosorpsiyon süreci şiddetli bir şekilde inhibisyona uğramıştır (Galun vd., 1987). Brady vd., (1994), *Saccharomyces cerevisiae* ile çinkonun biyosorpsiyonunda optimum pH değerini 7.5 olarak bulmuşlardır. Bunun yanı sıra pH= 4'ün üzerinde de biyosorpsiyonun gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Ross ve Townsley (1986), *P. spinulosum* ile bakır gideriminin düşük pH değerlerinde azaldığını belirtmiştir. Zhang vd. (1998) 'de yaptıkları çalışmada, *Rhizopus nigricans* ın kurşun biyosorpsiyon kapasitesinin pH 3'ün altında önemli derecede azaldığını saptamışlardır. Bunu yanı sıra pH= 6'nın üzerinde kurşunu tutma kapasitesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir, ancak yüksek pH değerlerinde kurşun hidroksit oluşur ve böylelikle kurşun suda hidroksitler ile bileşik yaparak çökelmeye başlamaktadır. Bu süreç biyosorpsiyonu olumsuz yönde etkilemektedir (Zhang vd., 1998). Tobin ve Roux (1998), *Mucor meihi* ile kromu giderme sırasında başlangıç pH değerinin 5.5 ve 7 değerlerinde çökelmenin etkin olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan literatür incelemesinde biyomasın ve metallerin kimyasal farklılığından dolayı farklı metallerin biyosorpsiyon için farklı optimum pH değerlerine gereksinimleri olduğu görülmüştür.

Belirlenen optimum metal gideriminin olduğu doz, temas süresi, sıcaklık ve pH sabit tutularak *D. radiodurans* (*yabanıl*) ve rekombinantları için karıştırma hızının biyosorpsiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre her iki metal ve üç bakteri için yaptığımız optimizasyon çalışmamızda en yüksek biyosorpsiyon kapasitesini 150 rpm'lik karıştırma hızında kaydettik. Metal biyosorpsiyonuna etki eden faktörlerden birisi yöntemin gerçekleştiği ortamdaki karıştırma hızıdır. Biyosorpsiyon hızı, sistemin karıştırma hızına bağlı olarak ya film difüzyonu ya da por difüzyonu ile kontrol edilmektedir. Eğer karıştırma işlemi yapılırsa tanecik etrafındaki sıvı film kalınlığı fazla olacak ve film difüzyonu, hızı sınırlandıran etmen olacaktır. Yeterli bir karışım sağlanırsa film difüzyon hızı, hızı sınırlandıran etmen olan por difüzyon noktası doğru artar. Genelde por difüzyonu, yüksek derecede karıştırılan kesikli sistemlerde hızı sınırlandıran faktördür (Benefield vd., 1982, Ahmad vd., 2005). Yüksek hızda ve devamlı olarak karıştırılan çözeltinin içerisindeki moleküllerin adsorbantın yüzeyine temas etme oranı daha fazla ve gözeneklerine girme olasılığı daha yüksektir (Paul., 1999). Bu nedenle bizim çalışmamızda da 150 rpm'lik karıştırma hızına kadar metal giderimi artmaya devam etmiş ancak 200 ve 250 rpm gibi yüksek karıştırma hızlarında metallerin adsorpsiyonu zorlaşmıştır.

Ekmekyapar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada,  $Cu^{+2}$  iyonu için, *Cladonia rangiformis* liken biyokütlesinin adsorpsiyon özelliklerini, kesikli adsorpsiyon tekniği kullanarak araştırmışlardır. Başlangıç metal iyon derişimi, başlangıç pH'ı, biyosorbent derişimi, karıştırma hızı ve etkileşim süresinin biyosorpsiyon etkinliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneyler sonunda 10mg/L başlangıç metal iyon derişimi, pH= 5 ve 150 rpm karıştırma hızı, 5 g/L liken biyokütle derişimi ve 60 dk etkileşim süresi koşulları altında, en yüksek biyosorpsiyon etkinliği % 76,5 olarak belirlenmiştir (Ekmekyapar vd., 2006).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre;  $Cd^{+2}$  için her üç bakteri, 250 ppm'lik metal konsantrasyonunda, pH 6.0 değerinde, 150 rpm karıştırma hızında ve 60 dakika gibi bir sürede en yüksek biyosorpsiyon kapasite değerine ulaşmıştır.  $Cr^{+3}$  için ise, her üç bakteri 2000 ppm'lik metal konsantrasyonunda, pH 5.0 değerinde, 150 rpm karıştırma hızında ve 15 dakika gibi kısa bir sürede en yüksek biyosorpsiyon kapasite değerine ulaşmıştır. Belirlenen optimum koşullarda ulaşılan en yüksek biyosorpsiyon kapasitesi değerlerinin literatür ile kıyaslanabilir olduğu düşünülmektedir.

### 5.3. UV-C Uygulaması, Enzim ve Karoten Tayini

UV-C radyasyon, çok enerjik olduğundan canlılar üzerinde potansiyel olarak bilinen en zararlı iyonize olmayan ışıdır. *D. radiodurans*, UV-C radyasyona (100-295 nm) son derece dirençli bir organizmadır ve UV-C' nin tetiklediği siklobütan, primidin dimerleri ve primidin-(6-4) primidon gibi biprimidin ışık ürünlerini (BPPs) etkili bir şekilde tamir edebilmektedir (Setlow ve Duggan, 1964).

Yabanıl ve rekombinant bakteriler 0,5-48 saat süresince UV-C radyasyona maruz bırakılmıştır ve buna bağlı olarak üreme potansiyellerindeki değişimler saptanmıştır. Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl)' ın 6 saatlik UV-C uygulamasına kadar kontrol grubuna yakın bir eğri ortaya koysada 12 saatlik UV-C dozundan etkilenecek canlı hücre sayısında bir düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüş, 24 saatlik uygulama sonrası bakterinin sahip olduğu direnç ve tamir mekanizmaları sayesinde yeniden yükselişe geçmiştir.

*D. radiodurans* (vgb)'i UV-C uygulanmış ve uygulanmamış gruplarla kıyasladığımızda bakterinin 6 saatlik UV-C uygulanan örneklerde radyasyonun yıkıcı etkisi canlı hücre sayısındaki düşüşle kendini göstermiştir. Sonraki uygulamalarda bakterinin sahip olduğu vgb geninin bakteriye kazandırdığı daha fazla oksijenli ortam

ve daha fazla büyüme ile bakterinin radyasyondan daha az etkilenecek canlı hücre sayısında artışlar kaydedilmiştir.

*D. radiodurans* (pUC8)' in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda bakterinin uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak canlı hücre sayısında bir düşüşün meydana geldiği ve radyasyona (vgb<sup>+</sup>) rekombinantından daha duyarlı olduğu görülmüştür. En düşük canlı hücre sayısı 6 saatlik radyasyon uygulanan örneklerde tespit edilmiştir.

Genel olarak incelediğimizde UV-C radyasyon bakterilerin log fazına geçiş sürelerini uzatarak etkisini göstermiştir ve radyasyondan en fazla etkilenen bakteri *D. radiodurans* (pUC8) olmuştur. Yapılan bir çalışmada UV' e maruz kalmış *E.coli*' de eksponensiyel canlılık kayıpları tespit edilmiştir. *D. radiodurans*, 500 J/m<sup>2</sup>'lik radyasyon dozuna dayanabilmektedir (Battista, 1997). *D. radiodurans* 'ın *E. coli*' e göre 20 kat daha dayanıklı olması hem DNA' sını BPPs' lere koruyabilmesinden hem de UV nin tetiklediği oksidatif zarara karşı proteinlerini koruyabilmesinden ileri gelmektedir (Krisko ve Radman, 2010).

UV-C'nin neden olduğu oksidatif stresi belirlemek amacıyla kullanılan biyobelirteçlerden biri de antioksidan savunma sisteminde yer alan parametrelerdeki değişimlerin saptanmasıdır. UV-C uygulamasının antioksidan sistem üzerine etkisinin karoten pigmenti ile ilişkilendirilerek araştırdığımız bu çalışmada aynı zamanda vgb geninin de antioksidan savunmaya katacağı katkı araştırılmak istenmiştir. Çünkü UV'nin hücresel zararına karşı antioksidan savunma mekanizmalarında, oksijen gerektiren çeşitli oksijenaz ve deoksijenazlarla katalizlenen, etkin bir oksijen alım ve kullanımını sağlayan sistemle (vgb) daha etkin olacağı düşünülmektedir (Liu vd., 1995).

Radyasyon serbest radikal oluşumunu tetikleyerek organizmada oksidatif stres oluşturmakta ve canlının biyomoleküllerinden genetik materyaline kadar pek çok bileşenine zarar vererek canlılığın sona ermesine doğru giden bir süreci başlatmaktadır.

*D. radiodurans* (*yabanıl*) ve rekombinant bakterilerinde 6, 12, 24 ve 48 saat UV-C radyasyon uygulaması sonrası süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktiviteleri saptanmıştır. Buna göre *D. radiodurans* (*yabanıl*)' da ilk 6 saatlik UV-C uygulaması sonrası SOD ve KAT enzim aktivitesi, kontrol grubuna göre düşmüş, 12 ve 24 saatlik uygulamalarda ise kontrole göre bir artış olmakla birlikte en yüksek enzim aktivitesi de 24 saat UV-C uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. 48 saatlik yüksek UV-C uygulaması sonrasında ise en düşük enzim aktivitesi gözlenmiştir. Uygulama dozuna bağlı olarak yabanıl bakterimiz radyasyonun neden olduğu oksidatif zarardan ilk

6 saat içinde oldukça fazla etkilenmiş ve bu etki bakterinin antioksidan savunma sistem elemanları olan SOD ve KAT gibi enzimlerin seviyelerinde düşüşe neden olmuştur. 12 ve 24 saatlik UV-C radyasyon uygulanan örneklerde bakteri içinde bulunduğu bu stres ortamıyla başa çıkabilmek için ilgili genlerin ifadesi yapılarak SOD ve KAT gibi enzimlerin sentezinde artışlar gözlenmiştir. 48 saatlik UV-C radyasyon uygulanmış örneklerde ise en düşük enzim aktivitesinin görülmesi, bakterinin yüksek dozdaki radyasyonun neden olduğu oksidatif hasarın onarımının daha zor olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

*D. radiodurans (vgb)*' de UV-C uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, SOD ve KAT enzim aktivitesinde genel olarak bir artış gözlenmiştir. Her iki enzim için de en düşük enzim aktivitesi 6-12 saatlik UV-C uygulanan örneklerde, en yüksek enzim aktivitesi ise, 48 saat UV-C uygulanan örneklerde kaydedilmiştir. Bunun sebebi, *vgb*' nin oksijene bağımlı bir promotora sahip olması ve bu promoturun stresin organizmada neden olduğu düşük oksijen koşullarında aktive olarak organizmayı koruyucu etkisini daha uzun vadede göstermiş olmasından kaynaklanmaktadır. Vhb' nin hem endojen hem de eksojen hidrojen peroksite karşı savunmada rol aldığı aynı zamanda stres altında SOD ve KAT gibi enzimlerin aktive olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Vhb' nin oksidatif strese karşı bu koruyucu etkisinin heterolog hücrelerdeki üretkenliğin artırma yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Akbas vd., 2011)

*D. radiodurans (pUC8)*' in UV-C uygulanan örneklerini kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda SOD ve KAT enzim aktivitesinin yabancı ve *vgb* genini taşıyan rekombinantına oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesi 12 saat UV-C uygulanan örneklerde, en yüksek enzim aktivitesi ise 48 saat UV-C uygulanan örneklerde kaydedilmiştir. Enzim aktivitelerinin yüksek olduğu yabancı ve *vgb* genini taşıyan bakterilerde, radyasyonun zararlı etkisi yabancı için 48. saatte kendini gösterirken, *vgb* rekombinantı Vhb/*vgb* gen sisteminin vermiş olduğu avantajlar sayesinde 48. saatte en yüksek enzim aktivitesine sahiptir. 48 saatlik UV-C uygulanan örneklerin SOD enzim aktivitelerini kıyasladığımızda *vgb* rekombinantı yabancılarından yaklaşık 74 kat, pUC8 rekombinantından da yaklaşık 2,5 kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik UV-C uygulanan örneklerin KAT enzim aktivitelerini kıyasladığımızda *vgb* rekombinantı yabancılarından yaklaşık 133 kat, pUC8 rekombinantından da yaklaşık 1,3 kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit

edilmiştir. Yapılan bir çalışmada da *D. radiodurans*' in KAT aktivitesinin *E.coli*' den yaklaşık 7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tian, 2004).

Genel olarak *D. radiodurans*' daki oksidatif protein zararı, radyasyona maruz kalmış veya kalmamış organizmada bulunan karbonilasyon düzeyi ile belirlenmektedir (Daly, 2007). Radyasyona dirençli *D. radiodurans* ve radyasyona duyarlı *E. coli* bakterilerinin her ikisinde de UV radyasyon dozuna bağlı olarak karbonillenmiş proteinlerin miktarı artış göstermekte ve canlı kalma oranları azalmaktadır (Krisko ve Radman, 2010). Karbonilasyon, oksidatif strese bir biyolojik belirteç olarak kullanılan proteinlerin en yaygın oksidatif modifikasyonudur.

Reaktif oksijen türleri ve oluşan ROT'ları temizleyen enzimler arasındaki denge birçok stres faktörü nedeniyle bozulabilmektedir. Bu faktörlerden biri olan UV radyasyon bu hassas dengeyi bozarak hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Organizmalar, maruz kaldıkları çeşitli stres faktörlerine rağmen canlılığını sürdürebilmek için birçok adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan biri de pigment oluşumudur.

Karotenoidler bakteri, alg, fungus ve bitkilerin büyük kısmında bulunmaktadırlar. Çok sayıda Antartik bakterinin membranlarında karotenoid tipi pigmentler içerdikleri bulunmuştur. Bu pigmentlerin membranda yerleşerek membran akışkanlığında tampon rolü oynadıkları ileri sürülmektedir. Çalışmalarda membrandaki stabilitenin polar, akışkanlığın ise non polar karotenoidlerle sağlandığı bulunmuştur. *Sphingobacterium antarcticus* ve *Micrococcus poseus* gibi Antartik bakterilerde karotenoid sentezinin üreme sıcaklığına bağlı olduğu, düşük sıcaklıklarda polar karotenoid sentezinin arttığı ve bu nedenle membran stabilitesinde artış meydana gelirken non polar karotenoid sentezinde düşme olduğu saptanmıştır (Jagannatham vd., 2000). Karotenoid pigmentinin aynı zamanda iyonize ve iyonize olmayan radyasyona karşı canlıları koruduğu da bilinmektedir.

6, 12, 24 ve 48 saatlik UV-C uygulanan *D. radiodurans* (*yabanıl*) ve rekombinant bakteriler için toplam karoten miktarını ölçtüğümüz çalışmamızda, *D. radiodurans* (*yabanıl*)'a turuncu rengini veren karotenin kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 4,5 kata çıkmıştır. 12 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans* (*yabanıl*)'ın kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 6 kata

çıkıştır. 24 saatlik UV-C uygulanan örneklerle kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans* (yabanıl)'ın kontrol gruplarında, rekombinant bakterilerden yaklaşık olarak 3,5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda UV-C uygulaması sonrası bu fark yaklaşık 8 kata çıkmıştır 48 saatlik UV-C uyguladığımız gruplarla kontrol gruplarını kıyasladığımızda *D. radiodurans* (yabanıl)'ın kontrol gruplarındaki karoten miktarının rekombinant bakterilerden yaklaşık 3,5 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. UV-C uygulamasına bağlı olarak bu fark 4,2 kata çıkmıştır.

Aynı zamanda bakterilerin UV-C öncesi ve sonrası elde ettiğimiz SEM resimlerinde *D. radiodurans* (yabanıl)'ın 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası boyut olarak büyüdüğü ve daha çok dörtlü hücre kümeleri halinde görüldüğü tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar gözlenmiştir. *D. radiodurans* (v<sub>gb</sub>) rekombinantının yabanılından farklı olarak uzun basil yapısında olan şekli, 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası boyut olarak oldukça küçülmüş ve hücre yapısında bozulmalar gözlenmiştir. *D. radiodurans* (pUC8), yabanıl tipteki bakteri gibi kok şelindedir. 48 saatlik UV-C uygulaması sonrası bakteri boyut olarak büyümüş ve hücre örtülerinin pürüzsüz yapısı bozularak deformasyonlar gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada reaktif oksijen türlerine yüksek direnç gösteren *D. radiodurans*' da karotenin bu dirençteki katkısı araştırılmıştır. *D. radiodurans*'ın renksiz mutanı elde edilmiş ve bu mutant (R1ΔcrtB), karotenoid sentezinde başarısız olmuştur ve yabanıl tipe göre iyonize radyasyon, hidrojen peroksit ve kuraklık gibi koşullara daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *D. radiodurans* karotenoidlerinin çevresel stresle mücadelede bakteriye katkısının olduğunu düşündürmektedir. Kemilüminesans analizleri, karotenoid sentez yolunda önemli bir ürün olan deinoxanthin'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve singlet oksijene savunmada karoten (likopen ve β-karoten) ve iki ksantofil (zeaksantin ve lutein) 'den önemli ölçüde daha güçlü bir savunma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Deinoksantin'in aynı zamanda DNA üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular deinoksantin'in güçlü bir antioksidan etkisinin olduğunu ve *D. radiodurans*'ın direnç mekanizmasına direncine katkıda bulunduğunu desteklemektedir (Tian vd., 2007).

UV' e maruz kalmış *E.coli*' de eksponensiyel canlılık kayıpları görülmektedir. *D. radiodurans*, 500 J/m<sup>2</sup>'lik radyasyon dozuna dayanabilmektedir (Battista, 1997). *D. radiodurans* 'ın *E. coli*'e göre 20 kat daha dayanıklı olması hem DNA' sını BPPs' lere koruyabilmesinden hem de UV nin tetiklediği oksidatif zarara karşı proteinlerini

koruyabilmesinden ileri gelmektedir (Krisiko ve Radman, 2010). Bizim çalışmamızda da UV-C uygulamasının bakterilerin canlı hücre sayısına etkisini belirlediğimiz çalışmamızda bakterilere 0,37-4,47 j /cm<sup>2</sup>, enzim aktivite tayini için 4,47- 35,76 j /cm<sup>2</sup> lik doz uygulanmıştır.

İlgili tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bir bütün olarak karşılaştırıldığında görülmektedir ki, mikroorganizmalar kullanılarak geliştirilen ağır metal biyosorpsiyonu ile toksik metallerin bertaraf edilmesi ve değerli metallerin kazanılması için kullanılabilir en umut verici teknoloji olarak kabul edilmektedir. Bu ileri teknoloji kapsamında çeşitli gen sistemleri ile donatılmış organizmaların kullanımı yıkıcı zor toksik metallerin giderimi için büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda başta iyonize radyasyon ve ultraviyole radyasyon, genotoksik kimyasallar, oksidatif zararlar ve dehidrasyona karşı ekstrem dayanıklılığı ile Guinness rekorlar kitabına girmiş *D. radiodurans'* in vgb/VHb sisteminin rekombinant suşlarında UV-C direnci ve metal biyosorpsiyon kapasitesine etkisi ve organizmanın bundan nasıl etkileneceği ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır

Bu çalışma sonuçları ile Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji, Biyokimya ve Toksikoloji alanında temel düzeyde yeni bilgiler sunması beklenilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Ahmad, A.L., Bhatia, S., Ibrahim, N., Sumathi, S. (2005). Adsorption of residual oil from palm oil mill effluent using rubber powder. *Braz J Chem Eng*, **22** (3), 371-379.
- Akar, T., Cabuk, 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.
- Akbas, M.Y., et al., (2011). Further Investigation of the Mechanism of *Vitreoscilla* Hemoglobine Protection from Oxidative stress in *Escherichia coli*, *Section Cellular and Molecular Biology*, **66**(5), 735-740.
- 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.
- Albrecht, M.S., Takaichi, S., Steiger, Z., Wang, G. Sandmann, (2000). Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* **18**, 843–846.
- Almiron, M., A. J. Link., D. Furlong., R. Kolter. (1992). A novel DNAbinding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**, 2646–2654.
- Amachi, S., Minami, K., Miyasaka, I., Fukunaga, S. (2010) Ability of anaerobic microorganisms to associate with iodine: 125I tracer experiments using laboratory strains and enriched microbial communities from subsurface formation water. *Chemosphere* **79**, 349–354.
- Anderson, A. W., H. C. Nordan, R. F. Cain, G. Parrish, and D. Duggan. (1956). Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* **10**, 575–577.
- Anderson, R., and K. Hansen. 1985. Structure of a novel phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*. *J. Biol. Chem.* **260**, 12219–12223.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., Bukau, B., 2000, The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int Food Microbiol* 55:3-9.
- Bakeeva, L. E., Chumakov, K. M., Drachev A. L., Metlina, A. L., Skulachev, V. P. (1986). The sodium cycle. III. *Vibrio alginolyticus* resembles *Vibrio cholerae* and some other vibriones by flagellar motor and ribosomal 5S-RNA structures. *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 466–472.

- Brady, D., Stoll, A., Duncan, J. R., (1994). Biosorption Of Heavy Metals Cations By Non-viable Yeast Biomass. *Environmental Technology*. **15**, 429-438.
- Battista, J. R. (1997). Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 203–224.
- Battista, J. R., Raney, F.A. Nobre, Schumann, Stackebrandt. (1997). *Deinococcus- Thermus*. 513.
- Bayramoglu G., Celik G., Yalcın E. et. al.,(2005). “Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr<sup>6+</sup> removal efficiencies from aqueous medium” *J. Hazar. Mater* , Basımda.
- Benefield, L.D., Judkins, J.R., Weand, J.F, BL. (1982). Process chemistry for water and wastewater treatment. New Jersey: Englewood Cliffs; 433-5.
- Berkow, R., Beers, M.D. (1997). M. The Merck Manual of Medical Information. *Merc*, U.S., 985-988.
- Bigersson, B., Sterner O., Zimerson, E., Chemie und Gesundheit “Eine verstandliche Einfuhrung in die Toxikologie”, VCHVerlagsgesellschaft, 1988, ISBN **3(527)**, 26455-8
- Bhide, J.V., Dhakephalkar, P.K., Paknikar, K.M. (1996). Microbiological process for the removal of Cr(VI) from chromat-bearing cooling tower effluent. *Biotechnology Letters*. **18**, 667-672.
- Brady, D., Duncan, J.R. (1994). Bioaccumulation of Metal Cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**,149-154.
- 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*, **7:72** 248-254.
- Brim, H., McFarlan, S.C., Fredrickson, J.K., Minton, K.W., Zhai, M., Wackett, L.P., Daly, M.J.(2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* **18**, 85–90.
- Brooks, B. W., Murray R. G. E. (1981). Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:353–360.
- Brochiero, E., Bonaly, J., Mestre, J.C. (1984). Toxic action Of Hexavalent Chromium On *Euglena Gracilis* Strain Z Grown Under Heterotrophic Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **13**, 603-608.
- Chang, J.S., Law, R., Chang, C.C. (1997). Biosorption of Lead, Copper and Cadmium by Biomass of *Pseudomans aeruginosa* PU21. *Wat. Res.* **31**,1651-1658

Carlos, C., Jesus, C.G., Silvia, D., Felix, G.C., Herminia, L.T., Juan Carlos, T.G. Rafael, M.S. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**, 335-347.

Caspari T. (2000) How to Activate p53, *Current Biology*, **10**, 315-R317,

Cervantes, C., Garcia, J., Devars, S., Corona, F., Tavera, H., Guzman, J., Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology*, **25**, 335-347.

Chen, X., Marie, A., Quinn, and Sandra, L. (2000). Cold Spring Harbor Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation Laboratory Press, *Genes Dev.* **14**, 777-782.

Corradi, M.G., Gorbi, G., Ricci, A., Torelli, A. Bassi, A.M. (1995). Chromiuminduced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ.* **32**, 12-18.

Cronan, J.E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **5**, 202-205.

Çabuk, A., Akar, T., Tunalı, 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.

Daly, M. J., et al. (2004). Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* **306**, 1025–1028.

Daly, M. J., O. Ling, and Minton, K. W. (1994). Interplasmidic recombination following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **176**, 7506–7515.

Daly, M. J., and Minton K. W. (1995). Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **177**, 5495–5505.

Daly, M. J., and Minton K. W. (1997). Recombination between a resident plasmid and the chromosome following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene*. **187**, 225–229.

Daly, M. J. (2009). A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 237–24.

Deng, L., Su, Y., Su, H., Wang, X., Zhu, X. (2007). Sorption and desorption of lead (II) from wastewater by Green Algae *Cladophora fascicularis*. *J Hazard Mat.* **143**, 220–25.

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

Dowling, V.A., and Sheehan, D., (2006). Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* **6**, 5597-5604.

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

Driedger, A. A. (1970). The DNA content of single cells of *Micrococcus radiodurans*. *Can. J. Microbiol.* **16**, 1136–1137.

Dunford, H. B. (1987). Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic. Biol. Med.* **3**,405–421.

Earl, A. M., Rankin S. K., . Kim, K. P., Lamendola,N, and Battista, J. R., (2002) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J. Bacteriol.* **184**,1003–1009.

Ekmekyapar, F., Arslan, A., Bayhan, YK., Cakici, A. (2006). Biosorption of copper(II) by non living lichen biomass of *Cladonia rangiformis Hoffm J Hazard Mat*, **137**, 293-8.

Elisabeth, L.. Hawley, Rula, A.. Michael, D., Kavanaugh, l C.. And Jacobs. J. R.G. (2004). *Treatment Technologies For Chromium(VI) L1608\_C08*.

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.

European Commission DG ENV. E3 Project ENV.E.3/ETU/2000/0058, (2002). “Heavy Metals in Waste” February (Danish).

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

Fredrickson, H. M., Kostandarithes, S.W., Plymale, L A., Daly, M. J. (2000).Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* *Applied And Environmental Microbiology*, **66(5)**, 2006–2011.

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.

Gadd, G.M. (1990a). Heavy Metal Accumulation by Bacteria and other Microorganisms. *Experientia.* **46**,834-840.

Gadd, G.M. (1990b). Interactions of Fungi with Toxic Metals. *New Phytol.* **124**,25-60.

Gadd, G.M, Griffiths, A.J (1978). Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microbial Ecology.* **4**, 303-317.

Galun, M., Galu, E., Siegel, B. Z., Keller, P., Lehr, H., Siegel, S. M., (1987). Removal Of Metal Ions From Aqueous Solutions By *Penicillium* Biomass: Kinetic And Uptake Parameters. *Water, Soil, And Soil Pollution.* **33**, 359-371.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stres tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* **48**, 909-930.

- Griffiths, E., and R. S. Gupta. (2007). Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *Int. Microbiol.* **10**,201–208.
- Girard, A. E., (1971). A comparative study of the fatty acids of some micrococci. *Can. J. Microbiol.* **17**,1503–1508.
- Golab, Z., Breitenbach, M. (1995). Sites of copper binding in *Streptomyces pilosus*. *Water Air Soil Pollut.* **82**,713–21.
- Groot, D. A., et al. (2009). Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet.* **5**, 1000434.
- Gourdon R., Bhende S., Rus E., and Sofer S. S. (1990). *Biotech Lett.* **12(11)**,8
- Grove, A., and S. P. Wilkinson. (2005). Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans*. *J. Mol. Biol.* **347**,495–508.
- Green-Ruiz, C. (2006). Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus sp.* from a tropical estuary. *Biores Technol.* **97**,1907–11.
- Green, S.J., Prakash, O., Jasrotia, P., Overholt, W.A., Cardenas, E., Hubbard, D., et al. (2012) Denitrifying bacteria from the genus *Rhodanobacter* dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a nuclear legacy waste site. *Appl Environ Microbiol* **78**: 1039–1047
- Guibal, E., Roulph, C., Le Cloirec, P. (1992). Uranium Biosorption By a Filamentous Fungus *Mucor miehei* pH Effect On Mechanisms And Performances Of Uptakes. *Water Research.* **26**, 1139-1145.
- Gupta, R. S. (1998). Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**,1435–1491.
- Gupta R., Ahuja P., Khan S., Saxena R. K., and Mohapatra H. (2000). Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science.* **78(8)**, 967-73.
- Gupta, V.K., Rastogi, A., Saini, V.K., Jain, N. (2006). Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Spirogyra* species. *J. Coll. Interface. Sci.* **296(1)**. 59-63.
- Gutman, P. D., P. Fuchs, and K. W. Minton. (1994). Restoration of the DNA damage resistance of *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment. *Mutat. Res.* **314**,87–97.
- Harsojo, S., Kitayama, and Matsuyama, A. (1981). Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *J. Biochem.* **90**,877–880.

- Hawiger, J., and Jeljaszewicz, J. (1967). Antibiotic sensitivity of *Micrococcus radiodurans*. *Appl. Microbiol.* **15**, 304–306.
- He, Y. (2009). High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**,539–546.
- Hensel, R., Demharter, W., Kandler, O., Kroppendstedt, R. M. and E. Stackebrandt. (1986). Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus*: evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the genus *Deinococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**,444–453.
- Horsfall, M.J., Spiff, A.I. (2005). Effects of temperature on the sorption of Pb<sup>+2</sup> and Cd<sup>+2</sup> from aqueous solution by *Caladium bicolor* (Wild Cocoyam) biomass. *Electron J Biotechn.***8**, 143–50.
- Hu, H. (2000). Exposure to metals. *Occupational and Environmental Medicine*, **27**, 983-996.
- Hua, Y., Narumi, G., Gao, B., Tian, K., Satoh, S., Kitayama, B., Shen. (2003). PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 354–360.
- Ilijin, L., Mataruga, Peric., Radojicic, V., Lazarevic, R.J., Nenadovic Vlahovic, 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.
- Imlay, J.A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol. Microbiol.* **59**,1073–1082.
- Jagannatham, M.V., Cattopadhyay, M.K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C.M., Shivaji, S., (2000). Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus* and a mesophilic bacterium *Sphingobacterium multivorum*. *Arch. Microbiol.* **173**, 418-424.
- Jianlong, W. (2002). Biosorption of Copper(II) by Chemically Modified Biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* **37**,847-850.
- John, H., Howard, G.J. (1996). Worth, “Fundamental toxicology for chemists : *Royal Society of Chemistry Information Services*. ”Cambridge.(UK).
- Kapoor, A. and Viraraghavan, T. (1995). Fungi biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. *Bioresource Technology.* **53**; 195–206.
- Katz, S.A., ve Salem, H. (1993). The Toxicology of Chromium with Respect to its Chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* **13**, 217-224.
- Kiff, R. J., Little, D. R. (1986). Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. In immobilization of ions by biosorption. *Ellis Hunt Publishers*. 649s. Chichester
- Kitayama, S. (1982). Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. *Biochim. Biophys. Acta* **697**,381–384.

- Knivett, V.A., Cullen J., and Jackson, M. J. (1965). Odd-numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*. *Biochem. J.* **96**, 2–3.
- Krabbenhoft, K. L., Anderson, A.W. and Elliker, P.R. (1965). *Ecology of Micrococcus radiodurans* Department of Microbiology *Appl Environ Microbiol.* Oregon State University, Corvallis.(Oregon).
- Kobayashi, I., Tamura, T., Haitham Sghaier<sup>b, c</sup>, Issay Narumi<sup>b</sup>, Shotaro Yamaguchi<sup>d</sup>, Koichi Umeda<sup>d</sup>, Kenji Inagaki, Journal of Bioscience and Bioengineering Characterization of monofunctional catalase KatA from radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* Volume 101, Issue 4, April 2006, Pages 315–321
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease, *Mol. Aspects Med.* **26**, 459–516.
- Krisko, A., and M. Radman. (2010). Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**,14373–14377.
- Kuyucak N., Volesky B. (1988). Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnol. Lett.* **10**,137-142.
- Kuyucak, N., Volesky, B. (1989) Accumulation of cobalt by marine algae. *Biotechnol Bioeng*, **33 (7)**, 809-14.
- Lakin, N.D., and Jackson, P.S.(1999). Regulation of p53 in response to DNA damage, *Oncogene*, **18**, 7944-7655.
- Lancy, P., and Murray, R. G. (1978). The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. *Can. J. Microbiol.* **24**,162–176.
- Latonen L., Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses—Functions of tumor supressor p53, *BBA*, **1755**, 71-89.
- Levis, A.G., ve Bianchi, V. (1982). Mutagenic and cytogenic effects of chromium compounds: Biological and Environmental Aspects of Chromium. *Elsevier*,171-208.
- Lijun, L., Xuemeia, L., Yaping, G., Enbo, M. (2005). Activity of enyzmes of the antioxidative system in cadmiumtreated *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidae). *Environmental toxicology and Pharmacology* **20**, 412-416.
- Linde, A.R., Arriba,s P., Sanchez-Galon, S., Garcia-Vazquez, F. (1996). Eel (*Anguila anguila*) and Brown trout (*Salma trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 297-302.
- Lipton, M.S., et al. (2002). Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11049–11054.
- Liu, Y., et al. (2003). Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4191–4196.

- Liu, S.C., Webster, D.A., Stark, B. C. (1995). Cloning and expression of the *Vitreoscilla* Hemoglobine gene in *Pseudomonas*: Effect on cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**(3), 419-424.
- Lu, W.B., Shi, J.J., Wang, C.H., and Chang, J.S. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *J. Hazard Mater.* **134**, 80–6.
- Luck, H., (1963). *Catalase. Methods of Enzymatic Analysis* 885–888.
- Makarova, K. S., et al. (2007). *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One* **2**,e955.
- Makarova, K. S., et al. (2001). Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 44–7.
- Madigan, M., and Parker. (1997). *Biology of Microorganisms Eighth Edition*, Southern Illinois University, (Carbondale).
- Matheickal, J.T., Yu, Q. (1997). Biosorption of Lead(II) from Aqueous Solutions by *Phellinus badius*. *Miner. Eng.* **10**(9), 947-957.
- Markillie, L. M., Varnum, S. M. P., Hradecky, and Wong, K.K. (1999). Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (katA) and superoxide dismutase (sodA) mutants. *J. Bacteriol.* **181**, 666–669.
- Martinez, A., and Kolter, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* **179**, 5188–5194.
- McMurray, C.T., Tainer, J.A. (2003). Cancer, cadmium and genome integrity. *Nature Genetic* **34**, 239-241.
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969) *Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoerythrocyte)*, *J. Biol. Chem.*, **244**: 22, 6049–6055, November 25.
- Mello, F., and Meneghini, R. (1984). In vivo formation of singlestrand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber- Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **781**, 56–63.
- Mikhailova, M.V., Littlefield, N.A., Hass, B.S., Poirier, L.A., Chou, M.W. (1997) Cadmium-induced hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Letters* **115**, 141-148.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett.* **384**, 240–242.



- Minton, K.W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* 13:9–15.
- Moeller, R., et al. (2010). Genomic bipyrimidine nucleotide frequency and microbial reactions to germicidal UV radiation. *Arch. Microbiol.* **192**,521–529.
- Moseley, B. E., and Copland, H. J. (1975). Isolation and properties of a recombination-deficient mutant of *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **121**,422–428.
- Moseley, B. E., and Setlow, J. K.. (1968). Transformation in *Micrococcus radiodurans* and the ultraviolet sensitivity of its transforming DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**, 176–183.
- Moseley, B. E., and Evans, D. M. (1983). Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2437–2445.
- Moseley, B. E., and Schein, A. H. (1964). Radiation resistance and deoxyribonucleic acid base composition of *Micrococcus radiodurans*. *Nature* **203**, 1298–1299.
- Moseley, B. E., Mattingly, A., and Copland, H. J. (1972). Sensitization to radiation by loss of recombination ability in a temperature-sensitive DNA mutant of *Micrococcus radiodurans* held at its restrictive temperature. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 329–338.
- Mungasavalli, D.P., Viraraghavan, T., Jin, Y.C. (2007). Biosorption of chromium from aqueous solutions by pretreated *Aspergillus niger*: Batch and Column studies. *Colloid Surface A: Physicochem Eng Asp.* **301**, 214-23.
- Murray, R.G. (1986). Family II. *Deinococcaceae*, 1035–1043. In P. H. A.
- Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Muter, O., Lubinya, I., Miller, D., Grigorjeva, L., Ventiya, E., Rapoport, A. (2001). Cr(VI) sorption by inact and dehydrated *Candida utilis* cells in the presence of the other metals. *Process Biochemistry*, **38**, 123-131.
- Neidhardt, F.C. and VanBogelen, R.A. (2000). Proteomic analysis of bacterial stress response, in Bacterial Stress Responses. *American Society for Microbiology Press*, 445-452.
- Norais, C. A., Chitteni-Pattu, S. E. A., Wood, R. B., Inman, and Cox, M. M. (2009). DdrB Protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21402–21411.
- Omelchenko, M. V., et al. (2005). Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol. Biol.* **5**, 57.
- Paul, J. C. H. (1999). Technische Universiteit Eindhoven, Proefschrift - ISBN 90- 386-0970. Cools - Eindhoven

- Prasad, B. J., Sabnis, K. D., Deobagkar, and Deobagkar, D. N. (2005). *Deinococcus radiodurans* strain R1 contains N6-methyladenine in its genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 412–416.
- Prakash, D., Gabani, P., Chandel, A K., Ronen, Z., Singh, O. V. (2013). *Microbial Biotechnology* .Volume 6, Issue 4, Article first published online.
- Qazi, G.N., Sharma, N, R., Parshad, (1993). Role of Dissolved-Oxygen as a Regulator for the Direct Oxidation of Glucose by *Erwinia herbicola* and *Gluconobacter oxidans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76(4)**, 336-339.
- Raj, H. D., et al. (1960). Utilization of carbohydrates and amino acids by *Micrococcus radiodurans*. *Can. J. Microbiol.* **6**, 289–298.
- Ravin, A. W. (1961). The genetics of transformation. *Adv. Genet.* **10**, 61–163.
- Rhizopus Arrhizus*. *Biotechnology And Bioengineering.* **29**, 955-969.
- Rho, J., Kim, J. (2002). Heavy Metal Biosorption and Its Significance to Metal Tolerance of Streptomycetes. *The Journal of Microbiology.* **40**, 51-54.
- Ross, I. S., Townsley, C. C. (1986). The uptake of heavy metals by filamentous fungi. In immobilization of ions by biosorption. *Ellis Hunt Publishers.* 542. (Chichester).
- Sağ, vd., (1998) “İkili metal karışımlarından Krom (VI), Demir (III), Bakır (II) iyonlarının *R. arrhizus* ve *C. Vulgaris*’e yarışmalı biyosorpsiyonu”, *J. of Engineering and Environmental Sciences* **22**, 145-154.
- Sağ, Y., Kaya, A., Kutsal, T. (1998). The Simultaneous Biosorption of Cu(II) and Zn(II) on *Rhizopus arrhizus*: Application of The Adsorption Models. *Hydrometallurgy.* **50**, 297-314.
- Sağlam, N., Cihangir, N. (1995). *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi* Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorpsiyonu Çalışmaları **11**, 157-161.
- Sanders, S. W., and R. B. Maxcy. (1979). Isolation of radiation-resistant bacteria without exposure to irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 436–439.
- Schein, A., Berdahl, B. J., Low, M., and Borek, E.. (1972). Deficiency of the DNA of *Micrococcus radiodurans* in methyladenine and methylcytosine. *Biochim. Biophys. Acta* **272**, 481–485.
- Setlow, J. K., and D. E. Duggan. (1964). The resistance of *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet radiation. I. Ultraviolet-induced lesions in the cell’s DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 664–668.
- 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 Microbiology Letters.* **244( 2)** , 251–257.

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

Slade, D., Lindner, A. B., Paul, G. and Radman, M. (2009). Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* **136**, 1044–1055.

Snow, E.T. (1994). Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environ. Health Perspect.* **3**, 41-44.

Stackebrandt, E., and Woese, C. R. (1981). Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Curr. Microbiol.* **5**, 197–202.

Stahl, W., et al. (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.* **427**, 305–308.

Stahl, W., and Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345–351.

Sternberg ve Dorn, “Cadmium removal using *Cladophora* in batch, semi batch and flowreactors” *Biosource Technology* 81, 2002

Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (1996). *Algal Ecology, Freshwater benthic ecosystems. Academic Press, 753s, (California).*

Sud D., Mahajan G., Kaur, M. P. (2008). Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions, *Bioresource Technology* 99, 6017–6027.

Tanaka, M., et al. (2005). Characterization of pathways dependent on the *uvsE*, *uvrA1*, or *uvrA2* gene product for UV resistance in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 187,3693–3697.

Tanaka, M., et al. (2004). Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics.* **168**,21–33.

Tang, N., Enger, M.D. (1993). Cd(2+) induced c-myc mRNA accumulation in NRK-49F cells is blocked by the protein kinase inhibitor H7 but not by HA1004, indicating that protein kinase C is a mediator of the response. *Toxicology* **81(2)**, 155–164.

Tatsuzawa, H., Maruyama, T.N., Misawa, K., Fujimori, and Nakano, M., (2000). Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli*—attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. *FEBS Lett.* **484**, 280–284.

Tewari, N., Vasudevan, P., Guha, B.K.(2005). “Study on biosorption of Cr(VI) by *Mucor hiemalis*” *Biochemical Engineering Journal* **23**, 185–192.

Thompson, B. G., Anderson, R., and Murray, R. G. (1980). Unusual polar lipids of *Micrococcus radiodurans* strain Sark. *Can. J. Microbiol.* **26**,1408– 1411.

- Thornley, M. J., Horne, R. W. and Glauert, A. M.. (1965). The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. *Arch. Mikrobiol.* **51**, 267–289.
- Tian, B., et al. (2004). Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence* **19**, 78–84.
- Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J. and . Hua, Y. (2007) . Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 902–911.
- Ting, Y.P. and Lawson, F. (1991). The influence of cadmium and zinc on the cell size distribution of the alga *Chrorella vulgaris*. *The chemical Engineering Journal*, **3**, 23-34.
- Ting, vd, (1989). “Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*” *Biotech. And Bioeng.* **34**, 990-999.
- Tirgari, S. and . Moseley, B. E. (1980). Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurement of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 287–296.
- Tobin, J. M., Cooper, D. G., Neufeld, R. J. (1984). Uptake Of Metal Ions By *Rhizopus Arrhizuz* Biomass. *Applied Environmental Microbiology.* **47**, 821- 824.
- Travieso, L., Canizarez, R.O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A.R., Dupeyron, R. Valiente, V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 144-151.
- Tsezos, ve Volesky. (1981). “Biosorption of Uranium and Thorium” *Biotech. And Bioeng* **23**, 583-604,
- Tsezos, M., Volesky, B., (1982). The Mechanism Of Throium Biosorption By İleri, “Çevre Biyoteknolojisi” **2000**, 501-503.
- 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.
- 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.
- Veglio, F., Beolchini, F. (1997). Removal of Metals by Biosorption: A Review. *Hydrometallurgy.* **44**, 301-316.
- Venkateswaran, A., et al. (2000). Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2620–2626.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology Advances* **26**, 266–291.

- Volesky, B. (1990). Biosorption of Heavy Metals. CRC Pres, *Boca Raton*. 396.
- Volesky B. (1986). Biosorbent Materials Biotechnoi. *Bioeng. Symp.* **16**, 121-126.
- Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. and Woese, C. R. (1989). The *Deinococcus- Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**, 128–134.
- White, O., et al. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**, 1571–1577.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271.
- Wong, P.T. ve Trevors, J.T. (1988). Chromium toxicity to algae and bacteria. Chromium in the Natural and Human Environments 305-315. Wiley, (New York).
- Work, E. (1964). Amino acids of walls of *Micrococcus radiodurans*. *Nature* 201,1107–1109.
- Work, E., and H. Griffiths. (1968). Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **95**, 641–657.
- Xu, G., et al. (2008). RecO is essential for DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **190**, 2624–2628.
- Young, S., Yun, And Young, N.L. (2001). Superoxide Dismutase Profiles In The Mesophilic *Deinococcus* Species. *The Journal Of Microbiology.* **39(3)**, 232-235.
- Yousef, A.E., Courtney, P.D., (2003). Basics of stres adaptation and implications in new-generation foods. *Microbial Stres Adaptation and Food Safety. Pres*, 1–25 (New York).
- Yu, B., Zhang, Y., Shukla, A., Shukla, S., Dorris, S. (2000). The Removal of Heavy Metal from Aqueous Solutions by Sawdust Adsorbtion-Removal of Copper. *Journal of Hazardous Materials*, **80**, 33-42.
- Zahradka, K., et al. (2006). Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature.* **443**, 569–573.
- Zhang W. X., Majidi, V. (1994). Monitoring the cellular response of *Stichococcus baccillaris* to exposure of several different metals using *in vivo* P-31 NMR and other spectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1577-1581.
- Zhang, P., and Omaye, S. T. (2000). Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Toxicology* **146**, 37–47.
- Zhang, L., et al. (2007). Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability. *Arch. Microbiol.* **188**, 411–419.

Zhang, L., Zhao, L., Yu, Y. T., Chen, C. Z. (1998). Removal Of Lead From Aqueous Solution By Non-Living *Rhizopus Nigricans*. *Water research*. **32**,1437-1444.

Ziagova M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, X., Tzannetaki, E. L. and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas sp.* in single and binary mixtures. *Biores. Technol.* **98**, 2859–65.

Zouboulis, A.I., Loukidou. M. X., Matis, K.A., (2004). “Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils”, *Process Biochemistry*. **39**, 909–916,

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ELİF ÖZBEY  
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya – 18-06-1981  
Mesleği ve Ünvanı : Biyolog

### Eğitim durumu

İlkokul :30 Ağustos İlköğretim Okulu (Malatya, 1987-1992)  
Ortaokul :Milli Eğitim Vakfı İlköğretim Okulu (Malatya, 1992-1995)  
Lise : Atatürk Kız Lisesi (Malatya, 1995-1998)  
Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Malatya, 2000-2004)  
Tezsiz yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (Malatya, 2005-2006)  
Tezli Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya, 2006-2009)  
Doktora :İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, ( Malatya,2009 - 2014)

## YAYINLANMIŞ ESERLER

### Bilimsel faaliyetler

- ❖ Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, 3-4 Mayıs 2007, MALATYA. Dinleyici
- ❖ Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli* Bakterilerinde Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 2008, Trabzon. Poster
- ❖ Radyasyonun *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* Bakterilerinin Üreme Üzerine Etkilerinin Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Enzimleriyle İlişkilendirilmesi, 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir. 2012, Poster

- ❖ Kadmiyum ve Krom 'un *Deinococcus radiodurans* ve Rekombinantlarının Üreme Potansiyeli ve Morfolojisi Üzerine Etkileri, 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir. 2014, Poster
- ❖ SEMİNER:“Guinness Rekortmeni Mucize Bakteri: "Deinococcus Radiodurans”
- ❖ SEMİNER: "Nanomateriyallerin Biyolojide Kullanımı"
- ❖ SEMİNER: "İnsan Mikrobiyom Projesi"

TÜBİTAK PROJESİ: Biyolojik Yapıların Kullanılması ile Elde Edilecek Metal Oksit Nano yapılardan Süperkapasitör ve Batarya Oluşturulması.