T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BREVIBACILLUS LATEROSPORUS TÜRÜNDEKİ SİDEROFOR ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ ve CIVA, NİKEL, KOBALT, DEMİR AĞIR METALLERİ VARLIĞINDAKİ DEĞİŞİMİ

BAHADIR AYDIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2014

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BREVIBACILLUS LATEROSPORUS TÜRÜNDEKİ SİDEROFOR ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ ve CIVA, NİKEL, KOBALT, DEMİR AĞIR METALLERİ VARLIĞINDAKİ DEĞİŞİMİ

BAHADIR AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE

2014

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİENSTİTÜSÜ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/01/2014 tarih ve 2014/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/05/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan BAHADIR AYDIN'ın tez çalışması MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE : Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE : Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Sideroforlar, canlı organizmalarda genel olarak demir bağlama özellikleri ile bilinen çok çeşitli kimyasal yapı ihtiva eden ekstrasellüler sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler mikroorganizmalar, mantarlar ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Brevibacillus laterosporus* tarafından siderofor üretiminin tespiti ve çeşitli metallerin (Fe, Co, Ni, Hg) siderofor üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Cıva metali nikel, kobalt ve demir metallerinin aksine biyolojik fonksiyon göstermeyen bir metaldir. Ayrıca cıva toksik etkileri bakımından önemli bir metaldir ve bu etkiler çevresel zarara yol açmaktadır. Çalışmada ilk olarak Universal CAS analizi ile siderofor varlığı tespit edilmiş ve Arnow analizi ile *B. laterosporus*'un üretmiş olduğu sideroforun katekol tipi olduğu tespit edilmiştir. *B. laterosporus* tarafından maksimum siderofor üretimi metal içermeyen besi ortamında 48. saatte % 50 olarak belirlenmiştir. *B. laterosporus*'un farklı metal konsantrasyonlarında siderofor üretimi incelendiğinde ise en yüksek siderofor üretimi 5 µM cıva varlığında % 46.6, 0.5 mM Nikel varlığında % 23, 0.1 mM Kobalt varlığında %35.7, 2.5 µM demir varlığında %31 olarak tespit edilmiştir. Cıva (5 µM) ile yapılan biyosorpsiyon deneyinde ise en yüksek cıva alınımı en yüksek siderophore üretiminin gözlendiği 48. saatte % 40 olarak gözlenmiştir.

Bu veriler sideroforların toksik metallerin alınımıyla ilişkili olduğuna dair yeni bir sonuç ortaya çıkarmış, sideroforların çevresel ağır metallerle etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Siderofor, Ağır Metal, Sekonder Metabolit, CAS Analizi, Biyosorpsiyon.

SUMMARY

Siderophores are known with iron chelation properties and they are extracellular secondary metabolites which consist of various chemical structures. These compounds are produced by microorganisms, fungi and plants.

In this thesis study, we aimed to determine siderophore production of *Brevibacillus laterosporus* and effects of certain heavy metals (Fe, Co, Ni, Hg) to this production. On the contrary of nickel, iron and cobalt, mercury does not show biological function. Mercury have also toxic impacts and causes environmental hazards. In this study firstly, existence of siderophore was detected with Universal CAS assay and siderophore compund was classified as cathecol type. Maximum siderophore production was determined 50 % at 48 in the metal free growth media. When we examine the effect of metals on siderophore production, maximum siderophore production was observed with 5 µM mercury as 46.6 %, with 0.5 mM nickel as 23 %, with 0.1 mM cobalt and with 2.5 µM iron as 31 %. In the phase of mercury biosorption experiment, maximum mercury biosorption was observed at 40 % level in 5 µM mercury containing media at 48. hour. *B. laterosporus* have substantial biosorption capacity and can accumulate such of these metals. At this study, maximum siderophore production was observed at 5 µM mercury containing media and maximum mercury biosorption was observed at same media.

These datas shows, a new result that siderophores are related with toxic metal uptake, and usable for removing of heavy metals from environmental habitats.

Keywords: Siderophore, Heavy Metal, Secondary Metabolite, CAS Assay, Biosorption.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR'e;

Bölüm başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, tez çalışmalarım esnasında ortak laboratuvarı paylaştığımız hocam Doç. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e;

Paylaşımları sayesinde tez çalışmamı bitirmeme yardımcı olan hocalarım; Doç. Dr. Mehmet Salim ÖNCEL'e, Doç. Dr. Melek ÖZKAN'a, Dr. Mine Gül ŞEKER'e;

Yardımlarını ve dostluklarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım; Enis GÜNEY, Ahmet TÜLEK, Şerif YILMAZ, Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Tuba KORKMAZ, Zişan ASAL KILIÇ, Raci Keleş, Gözde GÖRGÜLÜ, Taner ŞAR, Umut ACAR, Arş. Gör. Metin ÇETİN, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ ve Murat KARACA'ya en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Son olarak, tüm hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve her türlü kararımda yanımda olan ailem; Emine AYDIN, Hikmet AYDIN, Meral AYDIN, Ayşe AYDIN, Zuhal AYDIN ve Sema AYDIN YILMAZ'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1.Tezin Amacı, Katkısı ve Kapsamı	1
2. SEKONDER METABOLİTLERİN GENEL TANIMI	3
2.1. Sideroforların Genel Özellikleri	3
2.1.1. Siderofor Nedir?	3
2.1.2. Sideroforların Organizmalara Sağladığı Katkılar	4
2.1.3. Genel Kimyasal Yapılarına Göre Sideroforlar	4
2.1.3.1. Hidroksamatlar	5
2.1.3.2. Katekolatlar	7
2.1.3.3. Karboksilatlar	9
2.1.3.4. Karma Sideroforlar	10
2.1.4. Siderofor Üretimi Ve Genetik Regülasyonu	11
2.1.5. Siderofor Biyosentezi	13
2.1.6. Siderofor Salgılanması	16
2.1.7. Mikroorganizmalarda Siderofor Taşınması	17
3. KULLANILAN MİKROORGANİZMA	19
3.1. *Brevibacillus Laterosporus*	19
4. AĞIR METALLERİN SINIFLANDIRILMASI, EKOSİSTEM VE ORGANİZMALAR AÇISINDAN ÖNEMİ	20
4.1. Ağır Metaller	20
4.2. Ağır Metaller ve Canlı Çevre	20
4.3. Ağır Metaller ve Siderofor Sentezinin İlişkisi	22
4.3.1. Sideroforlar ve Demir	22

4.3.2. Sideroforlar ve Diğer Metaller 23
5. MATERYAL VE YÖNTEM 24
5.1. Materyal 24
5.1.1. Kimyasal Maddeler 24
5.1.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Çözeltiler 24
5.1.3. Kullanılan Besiyerleri 28
5.1.4. Kullanılan Cihaz ve Diğer Malzemeler 32
5.1.5. Kullanılan Bakteri Türleri 32
5.2. Yöntemler 33
5.2.1. Siderofor Üretimi 33
5.2.1.1 CAS Testi 33
5.2.1.2 CAS Likit Testi 34
5.2.1.2.1 Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi 35
5.2.1.2.2 Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi 36
5.2.2. Siderofor Tipinin Belirlenmesi 36
5.2.2.1. Arnow Testi 36
5.2.2.2. Csaky Testi 37
5.2.3. Ağır Metal Konsantrasyonlarının Siderofor üretimine etkisi 37
5.2.4. Hücresel Cıva Alınımının Saptanması 38
6. BULGULAR 40
6.1. Siderofor Üretimi 40
6.1.1 CAS Testi 40
6.1.2. CAS Likit Testi 42
6.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi 43
6.1.2.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi 44
6.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi 45
6.4. Siderofor Üretiminin Ağır Metal Varlığında Ölçülmesi 47
6.4.1. Farklı Demir (Fe) Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi 47
6.4.2. Farklı Kobalt (Co) Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi 48
6.4.3. Farklı Nikel (Ni) Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi 50

6.4.4. Farklı Cıva (Hg) Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi 51
6.5. Icp-Oes (Optical Emission Spectrometry) ile Hücresel Cıva Alınımının Saptanması 53
7. TARTIŞMA VE SONUÇ 54

KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ 68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
g	:	Gram
h	:	Saat
l	:	Litre
µM	:	Mikromolar
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
BB	:	Bacillibactin
CAS	:	Chrome Azurol Sulphonate
DHB	:	Dihydroxybenzoate
Fur	:	Ferric uptake repressor
GYTE	:	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
ICP-OES	:	Induced coupled plasma- optic emission spectrometer
LfOHOrn	:	L- formyl-hydroxyornithine
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NRPS	:	Non ribozomal peptit sentetaz
OD	:	Optical density
Pch	:	Pyocheline
PIPES	:	Piperazine diethane sulphonic acid
PPTase	:	Fosfopanteteinil transferaz
Pvd	:	Pyoverdine
RND	:	Resistance nodulation cell division
SAM	:	S- adenozil metionin
TBDT	:	TonB dependent transport
Zur	:	Zinc uptake repressor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		**Sayfa**
2.1:	Siderofor tipleri	5
2.2:	Hidroksamat tipi sideroforlar: a) pyoverdine, b) pyochelin, c) yersiniabactin.	6
2.3:	Hidroksamat bir siderofor olan Pyoverdinin sınıfları.	7
2.4:	Enterobactin ve Bacillibactin.	8
2.5:	Petrobactin ve Bacillibactin'in yapısı.	9
2.6:	Karboksilat tipi sideroforlar: a) rhizobactin, b) staphyloferrin, c) rhizoferrin.	10
2.7:	Mycobactinin yapısı.	11
2.8:	*P.aeruginosa*'daki Fur baskılama mekanizması: a) siderofor baskılanması, b) pvdS, pchR genlerinin aktivasyonu, c) pyoverdin genlerinin ifadesi, d) pyochelin genlerinin ifadesi.	13
2.9:	Pyoverdin biyosentezi: a) modül yapısı, b) PvdI, c) PvdJ, d) PvdD	15
2.10:	Üç farklı ferrisiderofor yolağı: a) permatik yolak, b) ABC transporter yolağı, c) siderofor-Fe ayrışması ve siderofor salgılanması.	18
5.1:	CAS sıvı deneyi: a) kontrol, b) siderofor içeren bileşim.	36
6.1:	CAS agar deneyi sonuçları: a) Kontrol, b) *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2, c) *Pseudomonas aeruginosa* PO1, d) *Geobacillus kaustophilus*.	42
6.2:	CAS agar üzerinde zamana bağlı siderofor üretimi.	43
6.3:	CAS sıvı deneyi sonuçları A) *Pseudomonas aeruginosa*, B) Kontrol, C) *Brevibacillus laterosporus*	44
6.4:	*Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2* bakterisinin zamana bağlı siderofor üretimi.	45
6.5:	Arnow Testinde renk değişim basamakları, a) (sarı).	46
6.5:	Arnow Testinde renk değişim basamakları, b) (kırmızı).	47
6.6:	Demirin siderofor üretimine etkisi.	48
6.7:	Demirin bakteri büyümesine etkisi.	49
6.8:	Kobaltın siderofor üretimine etkisi.	50
6.9:	Kobaltın bakteri büyümesine etkisi.	50

6.10: Nikelin siderofor üretimine etkisi. 51
6.11: Nikelin bakteri büyümesine etkisi. 52
6.12: Cıvanın siderofor üretimine etkisi. 53
6.13: Cıvanın bakteri büyümesi üzerine etkisi. 53
6.14: Cıva konsantrasyonlarına ve zamana bağlı cıva alınımı. 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		**Sayfa**
6.1:	Bakteri türlerinin Chorome Azurol S Agar testi sonuçları.	41
6.2:	CAS sıvı deneyinde siderofor üretiminin derecelendirilmesi.	43

1.GİRİŞ

Bakteri yaşamında çoğu metal, çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak metabolizmaya katılmakla organizma yaşamına katkı yapmaktadır. Hatta canlı yapılarda var olan proteinlerin yarısına yakını herhangi bir metal içermektedir [Thomson et al., 1998]. Metallerin bu yaşamsal gereklilikleri bakteriyel hücreye alınımları bakımından önemli olduklarını göstermektedir. Bu nedenle düşük miktarlarda metal barındıran habitatlardan metal temin edilmesi önemlidir. Bu işlevi yerine getirebilmek için bakteriler siderofor adı verilen bir bileşiği üretirler ve metal kazanımında kullanırlar. Sideroforlar yüksek afiniteli bir ferik demir şelatörü olarak bilinirler, dolayısıyla organizmaları bu metalle besleyebilme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca sideroforların, demir yanında başka metalleri de bağlayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Metallerin azlığı koşullarında siderofor sistemi organizmaya katkı sunarken, aşırılık koşullarında ise metallerin canlı hücreye toksik etki yaptığı bilinmektedir. Bu koşullarda ise siderofor sistemleri fazla metallerden korunmak için içsel dengeyi ayarlayıcı bir rol üstlenmektedirler [Schalk et al., 2011].

Bir siderofor çeşidi ile yapılan çalışmada bu sideroforun, 16 çeşit metali (Ag^{+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{2+}, Cu^{2+}, Eu^{3+}, Ga^{3+}, Hg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sn^{2+}, Tb^{3+}, Tl^{+} and Zn^{2+}) şelatladığı gösterilmiştir [Braud et al.,2009]. Sideroforlarla yapılan, metal rekabeti testlerinde sideroforların demiri en yüksek afiniteyle bağladığı fakat çevresel zararlara yol açan çeşitli ağır metalleri de belli bir afinite ile bağladığı gösterilmiştir [Chen et al.,1994]. Çevresel kirlilik etmeni olan bu tip metallerin giderimi son yıllarda bir hayli önem kazanmakta ve sideroforlar da bu sorun için bir çözüm yolu olarak belirmektedir. Bu özellikleri, bu bileşiklerin önemini bir kat daha arttırmakta ve sideroforları araştırmaya değer kılmaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve Kapsamı

Son yıllarda ağır metallerin çevresel kirliliğe olan katkısının bir hayli arttığı bilinmektedir. Gelişen teknoloji ile birlikte artış gösteren bu tür ağır metallerin doğal ortamlardan temizlenmesi ve olumsuz etkilerinin minimuma indirgenmesi bir hayli önem kazanmıştır. Bununla beraber ağır metallerin çevresel gideriminde bakterilerin kullanımı da son yıllarda oldukça fazlaca önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında *Brevibacillus laterosporus* bakterisinin siderofor üretimi belirlenerek siderofor üretimi ile bakteriyel ağır metal alınımının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bakterinin üretmiş olduğu siderofor tipi belirlenmiştir. Sideroforlar daha önce de bahsedildiği gibi ağır metalleri bağlayarak, ortamdaki serbest ağır metal miktarını azaltan organik bileşiklerdir. Kullandığımız mikroorganizma biyosorpsiyon kapasitesi yüksek bir bakteridir. Çalışma sonucunda bakterilerin en iyi siderofor ürettiği zaman aralığında biyolojik fonksiyon göstermeyen bir ağır metal olan Hg' nın hücre içine alınımı incelenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ayrıca Fe, Co ve Ni gibi ağır metallerin siderofor üretimine olan etkileri çeşitli konsantrasyonlarda belirlenmiştir.

Hg, toksik etkileri bilinen, çevresel kirlilik yaratan bir ağır metaldir. Bu ağır metalin belli biyolojik sistemlerle bağlanıp ortamdan uzaklaştırılması önemli bir olgudur. Bu bağlamda, sideroforlar ile bu metalin bağlanma etkinliğinin belirlenmesi Hg' nın çevresel ortamlardan uzaklaştırılması adına önemli bir olgudur.

Bakteriyel sideroforlar çevresel ağır metallerin giderimine dair son yıllarda birçok çalışmada kullanılmaktadırlar. Bu çalışmayla birlikte sideroforlar ile ağır metal kirliliğinin giderilmesine dair bir yaklaşım geliştirilerek literatüre katkı yapılması beklenmektedir.

2. SEKONDER METABOLİTLERİN GENEL TANIMI

Sekonder metabolitler organizmaların büyümesi, gelişimi ve üremesiyle direkt ilişkili olmayan organik bileşiklerdir [Fraenkel and Gottfried, 1959]. Primer metabolitlerin aksine sekonder metabolit eksikliği canlıda ölüme ya da fonksiyon kaybına neden olmaz fakat sekonder metabolit eksikliği bazen canlının kendini dışsal bir kaynağa karşı korumasına engel olabilir. Genel olarak sekonder metabolitler uygun olmayan koşullarda canlılar açısından bir savunma yanıtı olarak ortaya çıkmaktadır. Sekonder metabolitler, insanlar tarafından yıllardır tıp ve endüstride kullanılmaktadırlar. Sekonder metabolit ailesinin bir üyesi olan sideroforlar bu anlamda önemli bir yere sahiptir.

2.1. Sideroforların Genel Özellikleri

2.1.1 Siderofor Nedir?

Bakteri yaşamında birçok metal çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak metabolizmaya katılmakta ve organizma yaşamına katkı yapmaktadır. Hatta canlı yapılarda var olan proteinlerin yarısına yakınının herhangi bir metal içerdiği bilinmektedir [Thomson et al., 1998]. Bu nedenle metallerin hücre içine alınımları bakterilerin yaşamlarını sürdürebilmesi için oldukça önemlidir.

Metallerin bu yaşamsal gereklilikleri bakteriyel hücreye alınımları bakımından önemli olduklarını gösterir. Bu nedenle düşük miktarlarda metal barındıran habitatlardan metal temin edilmesi önemlidir. Bu amaçla bu tip habitatlardan metal temini için bakteriler özel sistemler geliştirmiştir. Bu sistemlerden biri de siderofor üretim mekanizmasıdır. Sideroforlar yüksek afiniteli bir ferrik demir şelatörü olarak bilinirler, dolayısıyla organizmaları bu metalle besleyebilme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca sideroforların, demir yanında başka metalleri de bağlayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir.

Birçok canlı farklı sideroforları üretmektedirler. Bakteriler ve konakları demiri bağlamak için yapısal olarak birbirinden farklı sideroforlar kullanarak birbirleriyle yarışırlar [Miller et al., 2008]. Ayrıca sideroforlar en az 500 farklı bileşik yapısına

sahip aileden oluşmuş çok zengin kimyasal çeşitlenişe sahiptir [Chu et al., 2010], [Hider and Kong, 2010].

2.1.2. Sideroforların Organizmalara Sağladığı Katkılar

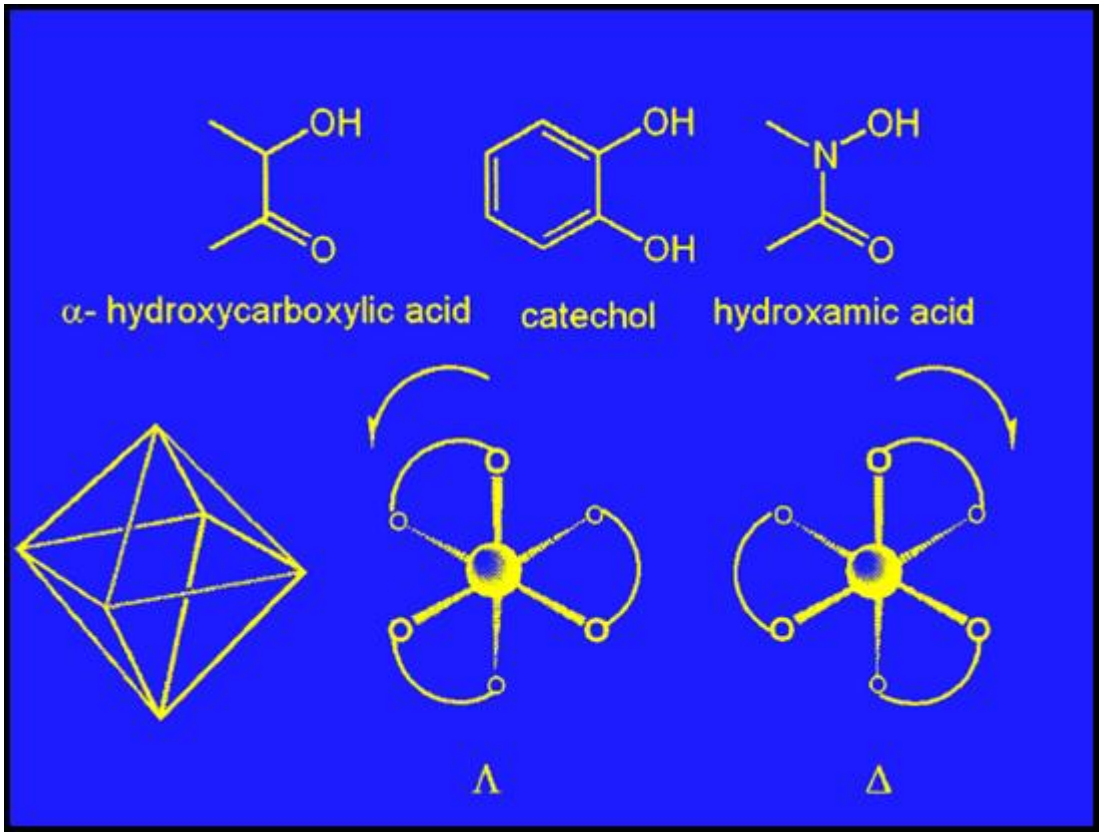
Sideroforlar yaşam için önemli enzimlerin işlev görmesini sağlayan metal gruplarının temininde önemlidir. Sideroforlar, canlıların metal yokluğu çektiği koşullarda metalleri kullanılabilir forma getirirler ve hücresel homeostazisin sağlanmasında önemli bir rol üstlenmiş olurlar. Aerobik koşullar altında yaşayan mikroorganizmalar açısından, oksijenin indirgenerek ATP üretilmesi, DNA'daki ribotid öncülerinin indirgenmesi, "heme" formasyonu ve diğer gerekli reaksiyonların gerçekleşmesi için demir ve diğere metallere ihtiyaç duymaktadır. Sideroforlar bu metallerin hücresel bünyeye kazandırılmasında görev yapmaktadırlar. Besleme faktörü olmasının yanında sideroforlar homeostazisi düzenleyerek bakterileri fazla metal koşullarının toksik etkilerinden de korumaktadırlar.

2.1.3. Genel Kimyasal Yapılarına Göre Sideroforlar

Bir sekonder metabolit olarak sideroforlar, çok çeşitli ve kimyasal yapı bakımından oldukça farklı kimyasal yapılara sahiptirler bu yüzden evrensel ve açık bir sınıflandırmaları zordur. Bu zorluktan dolayı da sınıflandırma ya türe özgü (bakteri, fungus, bitki) ki bu isimlendirilmelerinden de çoğu kez anlaşılacaktır yada kimyasal iskeletlerine (peptidik, non-peptidik, siklik yada açık zincirli) veya doğal şelatlama gruplarına göre yapılmaktadır. Bütün bu yapısal farklılıklarına rağmen sideroforlar, demir (III) ile yaptıkları 6- koordineli kompleks oluşturmaları ve büyük termodinamik stabiliteleri ile birbirlerine benzemektedirler. Sideroforların kimyasal bağlama grupları hidroksamatların oksijen atomlarını, katekolatları, α-hidroksi-karboksilik asitleri ve α- keto-karboksilik asitleri içerir.

Sideroforlar genel kimyasala yapılarına göre 4 sınıfa ayrılarak incelenmektedir. Bu sınıflar: hidroksamatlar, katekolatlar, karboksilatlar ve karma yapılı sideroforlar olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1). Şekil 2.1'de, üst kısımda 3 siderofor çeşidi Karboksilik asit, Katekollar ve Hidroksamatlar gösterilmiştir. Alt kısımda ise metal merkezleri üzerinden geometrik iki ana konfigürasyon gösterilmiştir. Demir bağlantısı

yapan sideroforların, bu iki ana (lamda Λ ve delta Δ) konfigürasyon altında izomerlere sahip oldukları bilinmektedir [Matzanke, 2006].

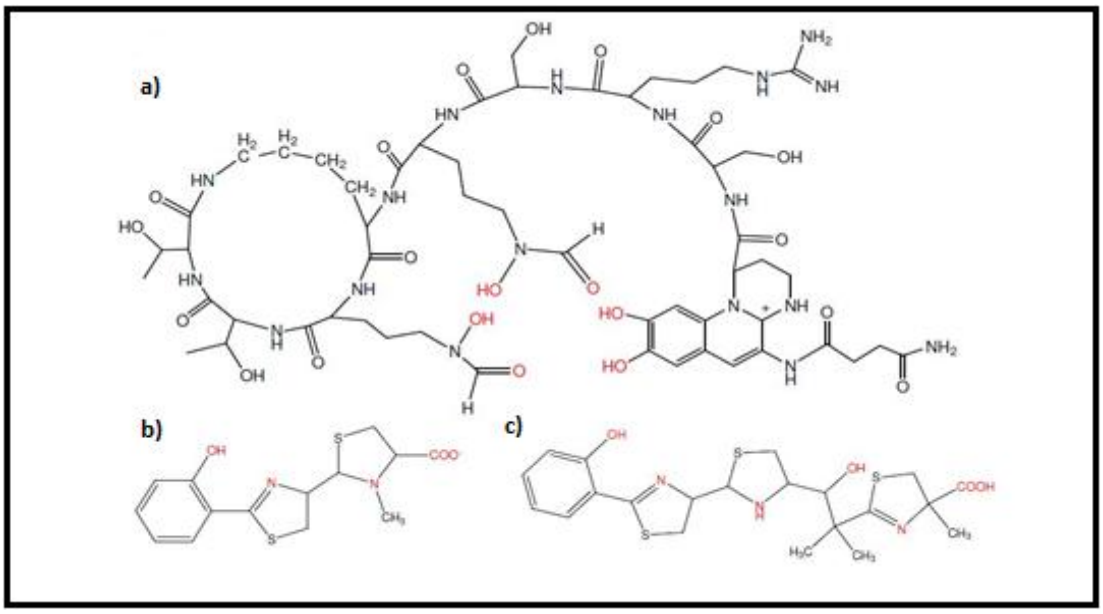


Şekil 2.1: Siderofor tipleri.

2.1.3.1. Hidroksamatlar

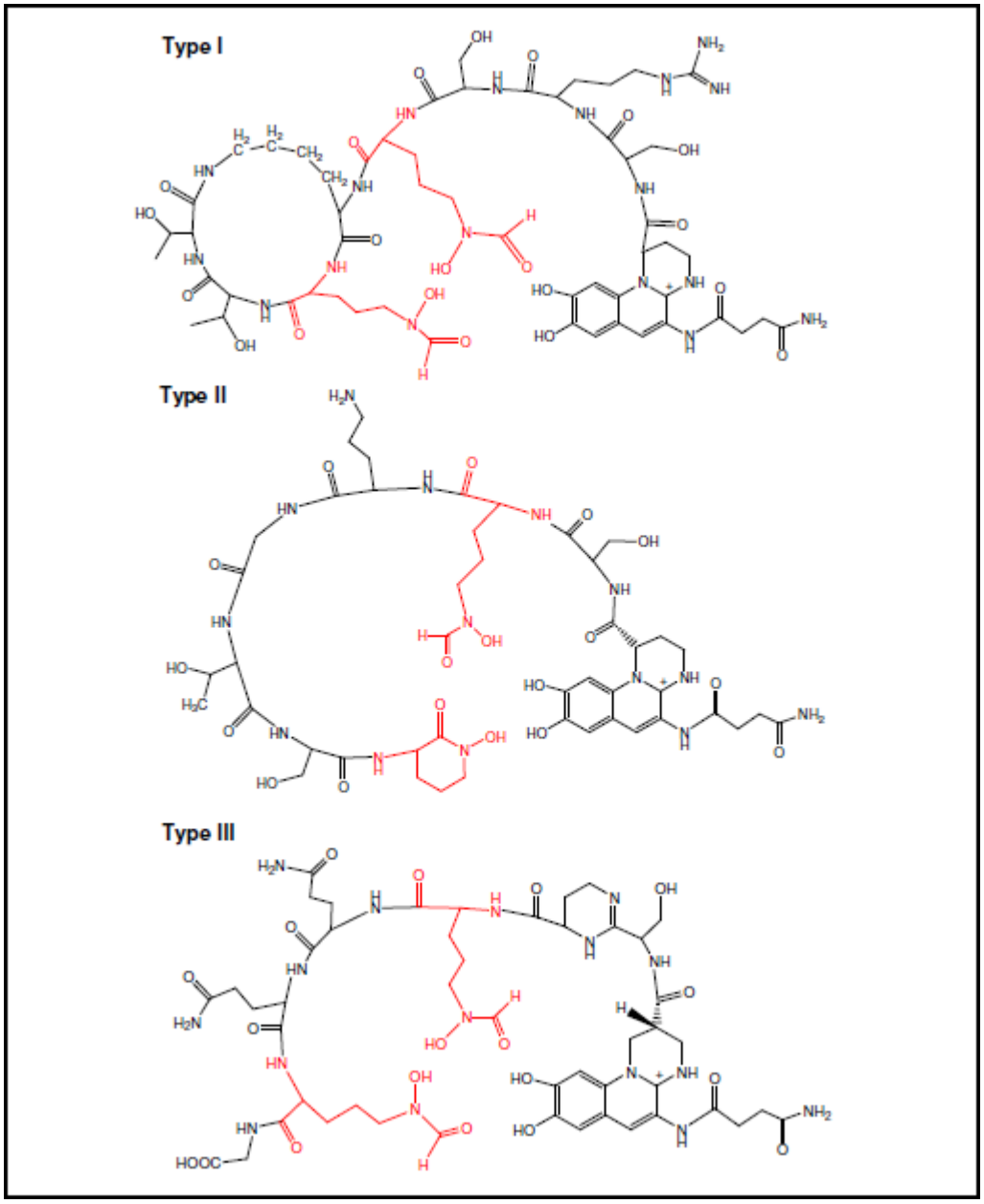
Hidroksamat sideroforlar baskın olarak funguslarda görülmekle beraber bazı bakteriler tarafından da üretilmektedirler. Bu türlerde şelasyon bölgesi, hidroksamat (-CO-N(O^-)-) bir gruptur ve genellikle lisin yada ornitinden kökenlenmiş asetillenmiş yada formillenmiş hidroksilaminlerden oluşmuşlardır (Şekil 2.2). Pyoverdin gibi *Pseudomonas aeruginosa* türlerine ait hidroksamat sideroforların sentezinde ornitin [Miethke et al., 2007] yan ürünleri kullanılırken, *Eschericia coli* bakterisinde bulunan aerobaktin için lisin [Crosa, 2002] yan ürünleri kullanıldığı literatürde gösterilmiştir. Hidroksamat gruplar iki basamaklı proses ile oluşturulmaktadırlar bu basamakların ilki, lisin ve ornitinlerin birincil yan zincir aminlerinin bir flavin adenozin dinükleotid- bağlı monooksigenaz ile hidroksilasyonudur [Challis, 2005]. İkinci basamak ise pyoverdin ve ornibaktin için bir metil transferaz yardımıyla formilasyon-

dur, diğer hidroksamat grupları için ise bu proseste bir asetilaz yardımıyla asetilasyon olgusu devreye girer [Miethke et al. 2007]. Şekil 2.2.a)'daki pyoverdin (hidroksmat) PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* tarafından, Şekil 2.2.b)'deki pyochelin (katekolat) *Pseudomonas aeruginosa* tarafından, Şekil 2.2.c)'deki yersiniabactin *Yersinia* spp.tarafından üretilmiş sideroforlar gösterilmektedir. Şekilde kırmızı işaretlenmiş fonksiyonel gruplar demir bağlayacı özelliğe sahiptir [Miethke et al., 2007].



Şekil 2.2: Hidroksamat tipi sideroforlar: a) pyoverdine, b) pyochelin, c) yersiniabactin.

Pyoverdinler (Şekil 2.3) *P. aeruginosa* da bulunan hidroksamat siderofor türleridir ve çeşitli yapılara sahip olan çok bilinen bir siderofor tipidir. Genel olarak 6 – 12 aminoasitten oluşan pyoverdinler suda çözünebilir bir forma sahiptirler. Daha önce yapılan çalışmalarda pyoverdinlerin demir bağlama kapasitelerinin yüksek ($10^{-30,8}$) olduğu da ortaya konulmuştur [Ankenbauer, 1985]. Şekil 2.3' de gösterilen Tip 1
İki formil- hidroksiornitin grubu ile birlikte bir siklik peptit yapısı içerir. Tip 2 bir formil- hidroksiornitin ile bir siklik hidroksiornitin içerir. Tip 3 İki formil- hidroksiornitin içerir fakat 1 den farklı olarak siklik peptit içermez. Ornitin yan ürünleri kırmızıyla gösterilmiştir [Poole et al.,2003], [Meyer, 2000], [Wendenbaum et al., 1983].

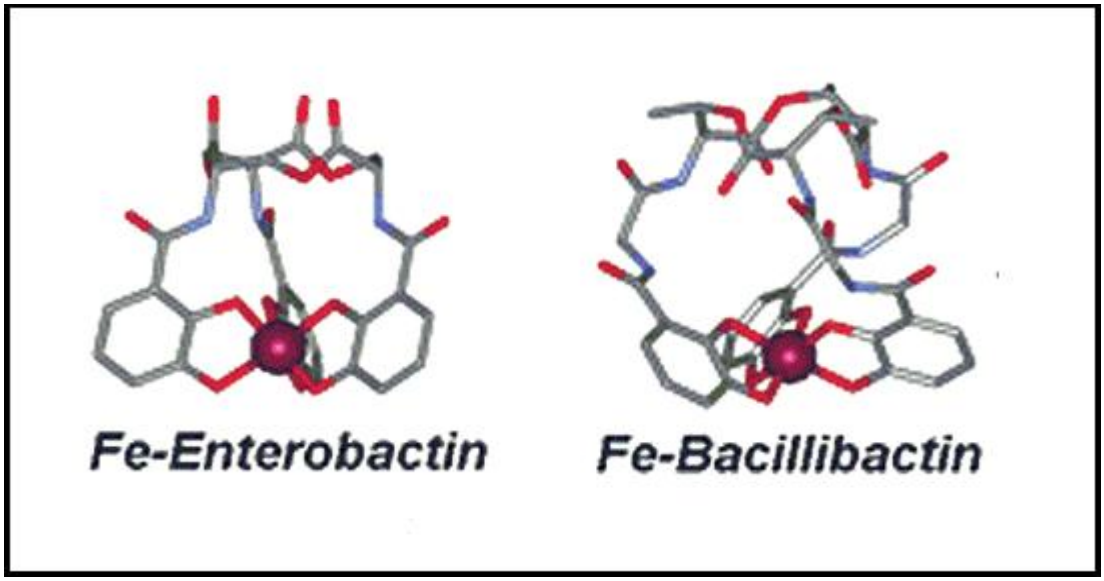


Şekil 2.3: Hidroksamat bir siderofor olan pyoverdinin sınıfları.

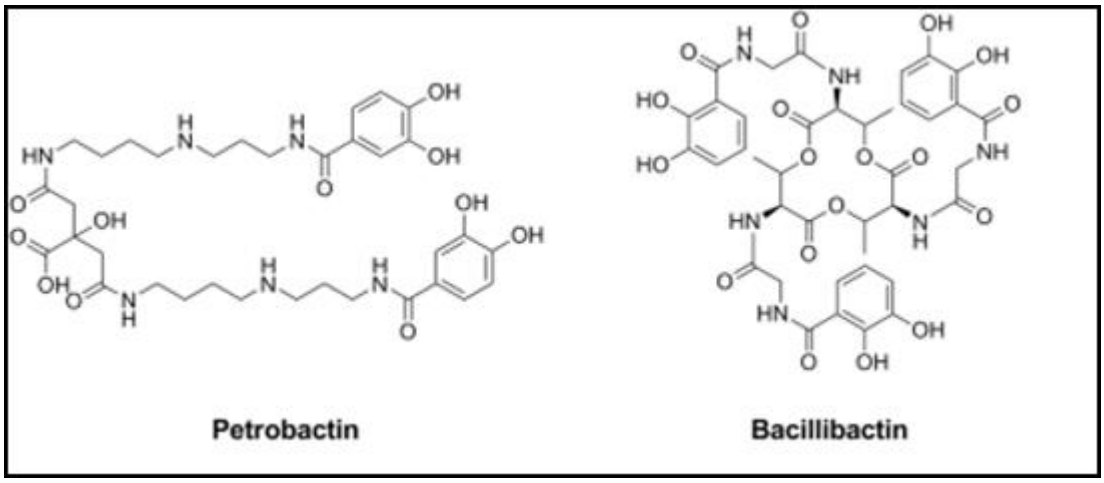
2.1.3.2. Katekolatlar

Katekollar moleküler formülleri $C_6H_4(OH)_2$ olan, pyrocatechol veya 1.2-dihidroksibenzen olarak da bilinen organik bileşiklerdir. Renksiz olan bu bileşik doğada iz miktarlarda bulunmaktadır. Katekollar, endüstriyel olarak hidrojen peroksitle fenollerin hidroksilasyonu sonucu üretilebilmektedir [Fiegel ve ark., 2000]. Katekollar şelatlama kapasitesi bilinen bir bileşiktir, demirin yanında Rutenyum (Ru) gibi elementleri de bağlayabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [Almeida ve ark.,

2007]. Enterobaktin adlı çok bilinen ilk trikatekol siderofor *E.coli, Aerobacter aerogenes* ve *Salmonella typhimurium'* dan 1970 yılında izole edilmiştir [Pollack and Neilands, 1970]. Enterobaktin, ayrıca gram pozitif bakteri suşlarında da tespit edilmiştir [Friedler et al.,2001]. *Bacillus* türlerinde çoklukla keşfedilen sideroforların yapısı katekolat yapılıdır. Daha önce *Bacillus subtilis* türünde bulunan Bacillibactin (BB) ise *Bacillus* türleri içinde karakterize edilmiş katekol türünde bir siderofordur [May et al., 2001]. BB kimyasal yapı bakımından enterobaktine büyük benzerlik göstermektedir (Şekil 2.4). *Bacillus. subtilis'e* ek olarak *Bacillus anthracis, Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* türlerinde de katekolik siderofor bacillibactin (BB) üretilebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bacillibactin sentezinin 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) öncüsü, dhbACEBF operonuna bağlı olduğu daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir [Rowland and Taber, 1996], [Rowland et al., 1996], [May et al., 2001]. *Bacillus* türleri siderofor üretimleri bakımından birçok çalışmada daha önce kullanılmıştır. Daha önce, üç farklı *B. anthracis* suşunda (USAMRIID, 7702 ve 34F2) ve *B. cereus* ATCC 14579 suşunda yapılan çalışmalarda bu canlıların 2 katekolat yapılı siderofor salgıladığı tespit edilmiştir, bunlar: petrobactin [Koppisch et al., 2005] (3,4-dihidroksibenzoil kısım içeren) ve bacillibactin (2,3-dihidroksibenzoil kısım içeren) dir (Şekil 2.3). Fakat başka bir *Bacillus* türü olan insektisit organizma olarak bilinen *B. thuringiensis* ATCC 33679 sadece bacillibactin üretmektedir [Wilson et al.,2006].



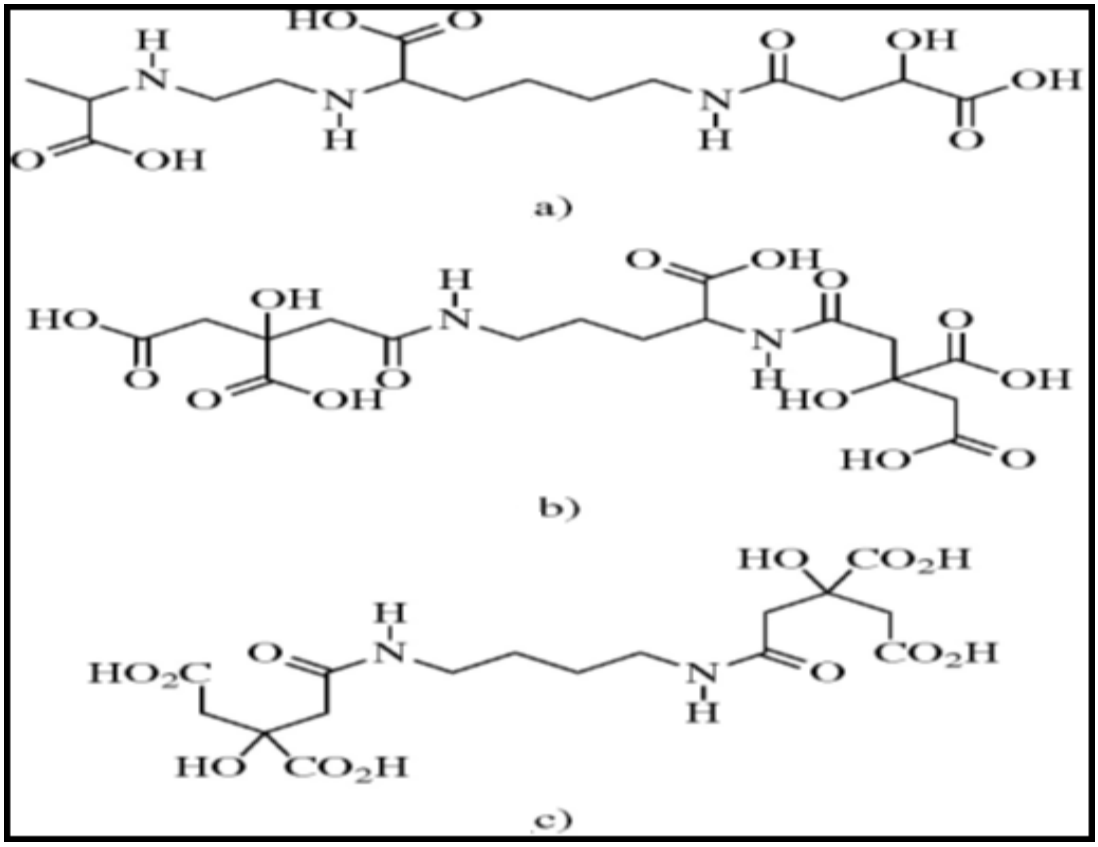
Şekil 2.4: Enterobactin ve Bacillibactin.



Şekil 2.5: Petrobactin ve Bacillibactin'in yapısı.

2.1.3.3. Karboksilatlar

Birçok siderofor karboksilat ve hidroksi donör gruplarına sahiptirler. Bunların bazıları karışım ligandlara ait sınıflardır. Karboksilatlar diğer ana siderofor türlerinden farklı olarak doksanlı yıllarda keşfedilmiştirler. Bu bileşiğin tespit edilmesi renksiz olmasından dolayı farklı tespit yöntemleri kullanmayı gerektirmiştir. Bu tespit yöntemleri chrome azurole ve demir besleme biyo analizleme yöntemleridir [Schwyn and Neilands, 1987]. Bu tipteki sideroforlar funguslarda olduğu kadar, bakteriler aleminde de bulunmaktadır. Bu tipteki sideroforlara bir önemli bir örnek olarak staphyloferrin A' yı verebiliriz bu siderofor *Staphylococcus hyicus* tarafından sentezlenmekte ve ornitin ile bağlı iki sitrat yapısından oluşmaktadır [Meiwes et al., 1990], (Şekil 2.6.a). Staphyloferrin A' nın yanında staphyloferrin B [Schwyn and Neilands, 1987], vibrioferrin ve rhizoferrin [Thieken and Winkelmann, 1992] yapıtaşı olarak sitrik asit ihtiva etmektedirler. Rhizoferrin, *Rhizopus* ve diğer *Zygomycetes* sınıfı üyelerinde izole edilmiştir (Şekil 2.6.c). Bir diğer karboksilik grup üyesi rhizobactin (Şekil 2.6.a) ise *Rhizobium meliloti* tarafından salgılanmaktadır [Smith et al.,1985]. Bu bakterinin atmosferik azotu fikse ettiği ve belli başlı baklagillerde simbiyotik yaşam sürdürebildiği bilinmektedir. Bu siderofor tiplerinin dışında fitosideroforlar olarak bilinen sideroforlar, gramine bitkilerin köklerinde tespit edilmiştirler ve bu sideroforların da karboksilatların ayrı bir sınıfı olduğu belirlenmiştir. Bu tür sideroforlara örnek olarak, nicotianamin, mugineic asit, avenic asit ve distichoic asit verilebilir, bu tip sideroforlardan arpa, buğday, çeltik ve yulaf gibi tahıllar yararlanabilmektedirler [Nomoto et al., 1987], [Stephan et al., 1996].



Şekil.2.6: Karboksilat tipi sideroforlar: a) rhizobactin, b) staphyloferrin, c) rhizoferrin.

2.1.3.4. Karma Sideroforlar

Karma yapılı sideroforlar olarak isimlendirilen bir başka siderofor grubu da ya karışım ligandlardan oluşur ya da heterosiklik şelatlama grupları ihtiva ederler. 55 yıl önce alüminyum kompleksinin kristalizasyonu ile izole edilen ilk siderofor olan mycobactin, Gram-pozitif bir bakteri *Mycobacteria*'lar tarafından üretilmiştir [Francis et al., 1949]. *Nocardia*'lar tarafından üretilen bir başka siderofor türü olan karışım siderofor nocobactin, mycobactinler ile oldukça benzer özellik ve yapı ihtiva etmektedir, nocobactinler lipit içerisinde çözünebilir sideroforlardır ve bakterilerin lipit zengini kısımlarında lokalize olurlar [Ratledge et al., 1982], (Şekil 2.7). Mycobactin grupları için yapılan X-ray kristalografi çalışmaları da mycobactinlerdeki demir bağlama bölgelerinin 2 hidroksamat gruptan, bir fenolat gruptan ve oksazolin azot kısımdan oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu donör eksikli grup olarak kabul edilen oksazolin tiazolin içeren gruplara imin-N adlı bir kısım katılmakta ve ferrik iyon kompleksinin olu-

şumu sağlanmaktadır. Bu heterosiklik yapılar fizyolojik olarak sisteinil, seril veya treonil yan zincirlerinin enzimatik siklizasyonundan oluşmaktadır. İmin-tip demir koordinasyonu pyochelin, yersiniabactin, anguibactin ve acinetobactin gibi sideroforların genel bir özelliğidir. Bir çok kromopeptid siderofor (pseudobactin ve pyoverdinler) da *Pseudomonas* türleri tarafından sentezlenmektedir [Abdallah et al., 1991]. Kromofor olarak da adlandırılan bu sideroforlar iki yada bir hidroksamat grubunun yanında bir α- hidroksikarboksilat grup içermektedirler.

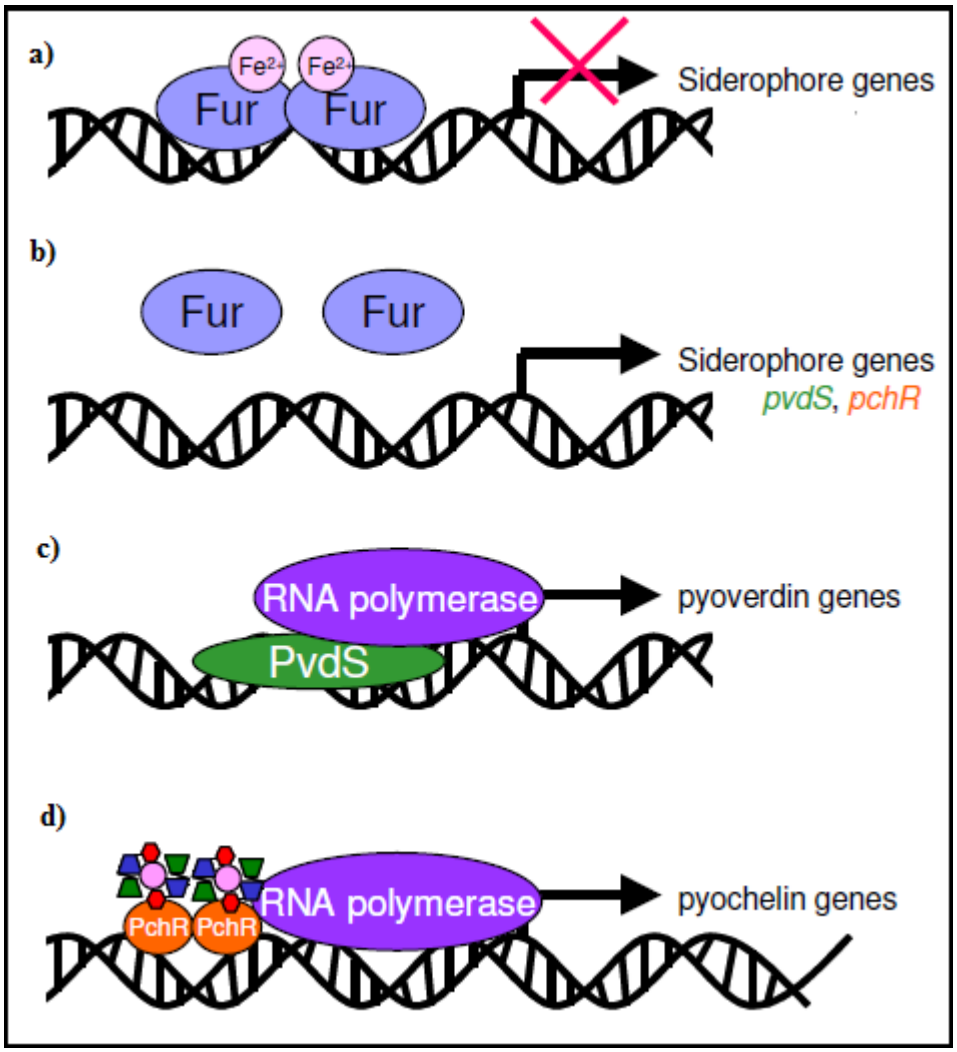
Şekil 2.7: Mycobactinin yapısı.

2.1.4. Siderofor Üretimi ve Genetik Regülasyonu

Siderofor üretimi *E. coli*'de genel olarak demirle düzenlenen bir yolaktır ve bir demir alım düzenleyicisi olarak adlandırılan Fur (Ferric uptake repressor) represörü ile düzenlenmektedir [Otto et al., 1992], [de Lorenzo et al., 1988], [Bagg and Neilands, 1987]. Siderofor üreten birçok bakteriyel tür, Fur homoloğu içermektedir ve bu sayede siderofor üretimini düzenlemektedirler. Yüksek demir varlığı koşullarında, Fur proteini kafaktörü olan Fe (II)' e bağlanır ve Fur bölgesindeki genlerin var olduğu promotor bölgedeki DNA'ya bağlanır. Fur bölgesindeki Fur bağlantısı siderofor biyosentez genleri ve ferrik siderofor alım genlerinin ekspresyonunu baskılar (Şekil 2.8.a). Buna karşın, düşük demir konsantrasyonunun olduğu koşullarda, hücredeki

demir konsantrasyonu düşer ve Fur, Fe(II)' ye bağlanamaz. Fur'un demirsiz formu Apo-Fur, DNA'ya bağlanamaz ve gen ekspresyonunu baskılayamaz (Şekil 2.8.b). Çoklu siderofor sistemi ihtiva eden bakterilerde, gen ekspresyonlarının kontrolü için ek regülasyon sistemleri mevcuttur ve bu sistemlerin her biri bağımsız iş görebilmektedirler. Birçok bakteri sigma faktörleri ve aktivatörlerini ek regülasyon için kullanmaktadır.

P. aeruginosa, pyoverdin ve pyochelin olarak bilinen iki tür siderofor üretmektedir, bu siderofor üretim sistemlerinde de yine sigma faktörleri ve aktivatörleri gibi alternatif sistemler kullanılmaktadır. Fur represyonu sadece bir dizi siderofor geninde görülmediği gibi, PvdS ve PchR gibi faktörleri içeren alınım genlerini de etkiler [Rombel et al., 1995], [Ochsner et al., 1995]. PvdS ve PchR siderofor genlerinin upregülasyonunda yardımcı birer faktördürler (Şekil 2.8). Şekil 2.8'de *P.aeruginosa*'daki Fur baskılama mekanizması gösterilmiştir: Şekil 2.8.a), Yüksek demir konsantrasyonunda siderofor baskılanmasını göstermektedir. Şekil 2.8.b), demir yokluğunda baskılanma durduğunu ve siderofor üretildiğini göstermektedir. Şekil 2.8.c) pyoverdin dışsal membran tarafından aktive olduktan sonra pyoverdin genleri yardımıyla PvdS (yeşil) RNA Polimeraz, işleme sokulduğunu ve transkripsiyon için pyoverdin ilişkili genlerin promotor bölgesine bağlanma sağlandığını göstermektedir. Şekil 2.8.d), PchR'ın (turuncu) Fe- pyochelin bağlanmasından sonra pyochelin ilişkili genlerin koaktivatörü olarak rol aldığını göstermektedir [Meneely, 2007].



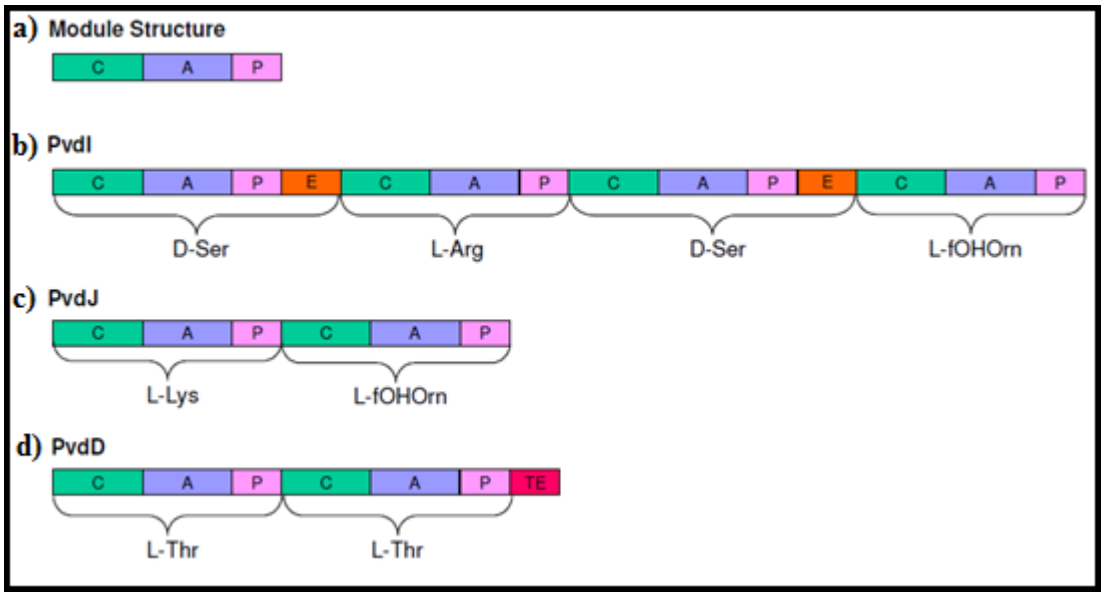
Şekil 2.8: *P.aeruginosa*'daki Fur baskılama mekanizması: a) siderofor baskılanması, b) pvdS, pchR genlerinin aktivasyonu, c) pyoverdin genlerinin ifadesi, d) pyochelin genlerinin ifadesi.

Bacillus türlerindeki genetik kontrol mekanizmaları da genel olarak Fur mekanizması içerse de çoğu kez diğer mekanizmalar da devreye girmektedir. Örneğin *Bacillus subtilis*'de üç farklı Fur homoloğu bulunmaktadır ilki Fur, bir diğeri Zur ve diğeri bir peroksit regulon reprösörü olan Peroksit regulon represörüdür [Bsat et al., 1988].

2.1.5. Siderofor biyosentezi

Sideroforlar iki farkı yolak sayesinde sentezlenirler. İlk yolakta, RNA kalıbına ihtiyaç duyulmaz ve aminoasitlerden direk peptid bağları yardımıyla peptidler oluşturulur. Bu proses, geniş, çoklu alanda ve çoklu fonksiyonel işlev görebilen proteinler

olarak bilinen nonribozomal peptid sentetazlar tarafından gerçekleştirilir [Crosa et al., 2002]. Diğer yolak ise NRPS- bağımsız yolaktır, bu yolak ise amid yada ester bağlarıyla bağlanmış, amino- alkol veya diamin yapıtaşları ve dikarboksilik asitlere bağlantılı bir yolaktır [Challis, 2005]. NRPS- bağımsız yolaklar; aerobactin, alcaligin, stephlobactin ve petrobactin gibi hidroksamat ve karboksilat sideroforların sentezinde kullanılmaktadır [Challis, 2005], [Miethke et al., 2007]. NRPS- bağımlı yolaklar ise enterobactin, yersiniabactin, pyochelin, pyoverdin, vibriobactin ve mycobactin gibi sideroforların üretiminde kullanılmaktadır [Crosa et al., 2002], [Quadri, 2000], [Ackerley et al., 2003]. Bu tip yolakların NRPS olarak adlandırılmasının nedeni sentez esnasında kalıp olarak RNA kullanılmamasıdır, bu yolaklarda dizi belli bölgelerin düzeni üzerinden belirlenmektedir. Bu yolaklarda aminoasitlerin peptid oluşturması esnasında tekli bir modül, kondensasyon (C), adenilasyon (A) ve peptidil-taşıyıcı (P) bölgeleri birlikte çalışırlar [Fischbach et al., 2006], (Şekil 2.9). Şekil 2.9.a) kısmında NRPS modülü yapısı kondensasyon (yeşil), adenilasyon (mavi) ve peptidil taşıyıcı (pembe) bölgeleri. Şekil 2.9.b) kısmında, PvdI' nın iki D-serin, bir L-Arg ve bir L-fOHOrn molekülü içerdiği, bu aşamada pyoverdin peptidi gelişime aşamasında olduğu ve iki epimeraz (turuncu) bölgesinin katılması sağlandığı gösterilmiştir (Epimeraz bölgesi L-aminoasitleri D-aminoasitlere dönüştürmektedir). Şekil 2.9.c) kısmında, PvdJ, büyüyen peptidde iki aminoasidi bir araya getirdiği gösterilmiştir; birincisi L-lys ve ikincisi L-fOHOrn dur. Şekil 2.9.d) kısmında, PvdD' nin, pyoverdinler için 2 final aminoasiti bir araya getirdiği gösterilmiştir, bu iki molekülde L-Thr' dir. Sentezlenmiş pyoverdin molekülü sonuç olarak tiyoesteraz (kırmızı) domain tarafından NRPS sisteminden serbest bırakılmaktadır [Meneely, 2007].



Şekil 2.9: Pyoverdin biyosentezi: a) modül yapısı, b) PvdI, c) PvdJ, d) PvdD.

Burada 50 kDa' luk kondensasyon bölgesi zincir uzaması için peptid bağının kondensasyon bölgesini katalizlemektedir [Crosa, 2002]. *Vibrio cholera*' daki vibriobactin biyosentezinde kondensasyon bölgesi VibH olarak isimlendirilmiştir [Keating et al., 2002]. Bu fonsiyonel "C" bölgesi, her biri α-β-α sandviç bölgelerinden oluşan iki yapısal bölge içermektedir. "C" bölgesinin fonksiyonel bir modifikasyonu ise siklizasyon (Cy) bölgesi olarak adlandırılır [Crosa, 2002]. "Cy" bölgesi "C" bölgesine benzer olarak peptid katalizler fakat ek olarak siklik sistein, serin veya treonin katalizler ve bir beş üyeli halka oluştururlar. Halka yapısı, tiyazolin (Cys) veya oksazolin (Ser, Thr) kazanabilmek için dehidre edilir.

Bir diğer fonksiyonel bölge olan modül 50 kDa'luk adenilasyon bölgesidir, bu bölge amino veya aril asitleri seçip, aktive ederek bir ATP- bağımlı yolla peptid oluşturur [Crosa, 2002]. Bu aktivasyon aminoaçil- AMP' yi oluşturur bu peptidil- taşıyıcı bölgeye transfer edilir. PheA yapıları antibiyotik gramisidin ve *Bacillus subtilis'* de belirlenmiş olan bir aril asit olan 2,3 dihydroxybenzoate (DHB)' ı aktive eden DhbE' nin birleştirilmesi için fenilalanini aktive eder [Conti et al., 1997], [May et al., 2002]. Adenilasyon bölgeleri firefly lusiferaz ile benzer yapıya sahiptir ve iki yekpare yapısal bölge içeremektedir.

NRPS'ler için son fonksiyonel bölge olan, peptidil-taşıyıcı bölge veya aril asitler kullanıldığında aril- taşıyıcı bölge olarak isimlendirilir [Crosa, 2002]. Bu 8-10 kDa'luk küçük bölgeler fosfopantetionil bir kuyruğun eklenmesi ile farklılaşmış post- transkripsiyonel olması gereken korunmuş bir serin dizisi içermektedir. Fos-

fopantetionil kuyruk aktive olmuş aminoaçil-AMP'ye kovalent olarak bağlanır ve uzayan zincir için bir iplik gibi görev alır. Kuyruk, fosfopanteteinil transferaz tarafından peptidil- taşıyıcı bölgeye bağlanır. PPTase'lar birincil ve ikincil metabolizmada içerilir ve genellikle her bir yolak için belirgindirler. Siderofor üretimi için PPTase'lar *Bacillus subtilis*' lerdeki Sfb' ler gibi, *Y. pestis*' lerdeki YbtD gibi çeşitli bakteriler için belirlenmiştir [Quadri et al., 1998], [Bobrov et al., 2002]. Buna karşın, *P. aeruginosa* primer ve sekonder metabolizmasının her ikisinde de sadece bir PPTase (PcpS) içermektedir [Barekzi et al., 2004].

Üstte bahsedilen bölgelere ek olarak NRPS modüllerinde üç gerekli fonsiyonel modül daha vardır, yani uzayan peptidin modifiye edilmesinde ek olarak bir grup bölge daha mevcuttur. Bunlar, epimeraz (E), metil transferaz (MT) ve tiyoesteraz (TE) bölgelerdir [Crosa, 2002]. Epimerizasyon bölgeleri, L- aminoasitleri, D- aminoasitlere çevirmektedir. Metil transferaz bölgeleri ise metil donörü olarak s- adenozil metionin (SAM) kullanarak aminoasitleri metile etmektedirler. Tiyoesteraz bölgeler ise zincir uzamasını bitirir ve hazır sideroforu serbest bırakır. Bazı bakteriler sideroforu farklılaştırmak için bazı yardımcı proteinler içermektedirler. *P. aeruginosa* ve *Yersinia* spp., bir tiazolidin halkasının içinde yersiniabactin ve pyochelinin ikincil tiyazolin halkasını çeviren bir NADPH- bağlı redüktaz kullanırlar.

P. aeruginosa'da pyoverdin ve pyochelin biyosentezi NRPS- bağlı bir yolaktır ve bu yolak ne kadar farklı sideroforların oluşturduğunu göstermektedir. Yersiniabactinin oluşum yolağı, pyocheline çok benzemesine rağmen, hibrit bir sistem kullanmaktadır yani bu yolak, NRPS- bağlı yada NRPS- bağımsız sistemlerin ikisini birden içermektedir. Bu üç sideroforun biyosentez aşamaları siderofor sentezlenmesinin anlaşılması bakımından güzel örnekler sunmaktadır.

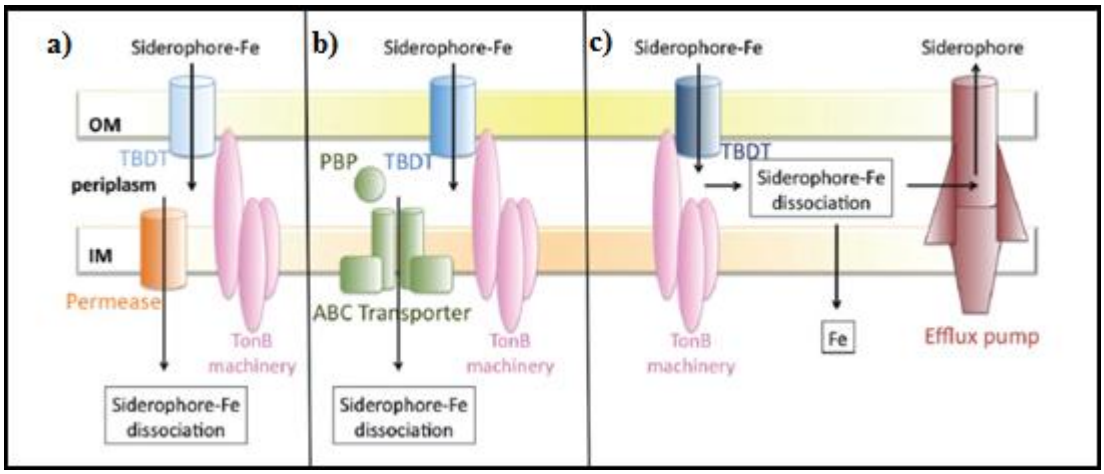
2.1.6. Siderofor salgılanması

Bakterilerde sideroforun salgılanması çıkış pompaları (efflux pump) olarak adlandırılan sistemlerle sağlanmaktadır (Şekil 2.10). Bu pompalar üç süperaile olarak ayrılırlar: ana kolaylaştırıcı süperaile (MFS), direnç, nodülasyon, hücre bölünmesi (RND) süperailesi ve ATP- bağlı kaset (ABC) süperailesi [Miethke et al., 2007], [Tseng et al., 1999]. RND süperailesi üzerine yapılan çalışmalarda pompa sisteminde üç çeşit protein tanımlanmıştır: MexA, MexB ve OprK bu protein sistemleri pyover-

din salgısında görev almakta ve transmembranda bir proton gradiyentinin oluşumuna yardım ederek sideroforun periplazma içine alınmasını sağlamaktadırlar. Bütün RND süperailesi üyeleri proton antiporter sistem olarak çalışmaktadırlar [Tseng et al., 1999].

2.1.7. Mikroorganizmalarda Siderofor Taşınması

Sideroforlar Fe^{3+} ile bağlandıktan sonra birbirine bağlanmış bir paket gibi genel olarak dış membran reseptörlerine ulaşır ve periplazmik alana TonB- kompleksi ile bileşik oluşturarak translokasyon sağlarlar. Periplazma içerisine salınım olduğu anda, sideroforlar hızlı bir biçimde periplazmik bağlanma proteinlerine bağlanırlar. Periplazmik siderofor taşıyıcı proteinleri daha sonra sideroforları bir permeatik sisteme yada ABC kaset sistemine aktarırlar sonrasında ise içsel membrandan sideroforun taşınımı gerçekleşir [Koster and Braun, 1989], [Chenault and Earhart, 1991], [Cuiv et al., 2004], [Michel et al., 2007], [Hannauer et al., 2010]. Genel olarak hücre membranında bu taşıma kompleksi Ton B, ExbB ve ExbD'den oluşur [Schalk, 2008], [Noinaj, 2010] (Şekil 2.10). Şekil 2.10' da dışsal membrandan Siderofor-Fe alınımının her zaman Ton-B bağlı transport sistemini içerdiği gösterilmiştir. Birçok farklı siderofor bu sistemle taşınmaktadır. Burada içsel membran alınım işleminin gerçekleştirilmesi için proton motiv güçten yararlanılmaktadır ve buradaki komplekste TonB, ExbB ve ExbD sistemleri bulunmaktadır. Ferrisideroforun içsel membrandan alınması ise Şekil 2.10.a)' da gösterilen permeatik ya da Şekil 2.10.b)' de gösterilen ABC transport sistemi ile yapılmaktadır. Bu iki mekanizmada da siderofor demir ayrışması hücre içinde yapılmaktadır. Şekil 2.10.c) kısmında gösterilen sistemde ferrisiderofor periplazmada ayrılarak demir serbest bırakılmakta, serbest kalan demir hücre içine alınmaktadır, pompa sistemi permeatik bölgedeki sideroforu tekrar kullanılmak üzere dışsal membrandan pompalamaktadır.



Şekil 2.10: Üç farklı ferrisiderofor yolağı: a) permatik yolak, b) ABC transporter yolağı, c) siderofor-Fe ayrışması ve siderofor salgılanması.

3. KULLANILAN MİKROORGANİZMA

3.1. *Brevibacillus laterosporus*

Brevibacillus laterosporus daha önceleri ana spora yakın kano- şekilli bir lamellar parasporal inklüzyon üretme yeteneği ile karakterize edilmiş aerobik spor oluşturan bir bakteri olarak biliniyordu. Bazı suşları sporangiumun lize olması sırasında spordan ayrı bir biçimde ortaya çıkan çeşitli şekillerde ve büyüklüklerdeki kristalin inklüzyonları üretmektedir. Biyolojik bir kontrol ajanı olarak salyangozlar, nematodlar ve böcekler gibi geniş ölçekte organizmalar üzerinde kullanılabilme potansiyeline sahip bir organizmadır. Rutin ortamlarda kolayca yetişebilir (Nutrient agar vb.) kolonileri 1-3 mm çapındadır. Sıvı ortamda; tekdüze gözükmez, orta derece bulanıklık yaratır ve çökelir. Agarda; beyaz-sarımsı oval S-tipi koloniler oluşturur. Kan agarda hemolitik değildir. Aeorobik ve anaerobik büyüme gözlenir. Optimum büyüme sıcaklığı 30-40^{0}C dir. Optimum pH isteği 6.8 dir. % 5 lik NaCl ortamda büyüyebilir.

Brevibacillus laterosporus daha önce sudan, ölü Avrupa çürüklüğü bal arısı larvalarından ve sağlıklı işçi arı bağırsaklarından izole edilmiştir. Böceklerden, topraktan, tuzlalardan, gıdalardan, kağıt ürünlerinden, denizel ortamlardan ve göz enfeksiyonlarından da izole edildiği olmuştur. Hetero ve oto antibiyotikleri üretmektedirler.

Saprofitik bakterilerin aksine, yoğun olarak ölü Avrupa çürüklüğü bal arısı larvalarında çoğalırlar, evolüsyonları *Paenibacillus alvei*' ye benzemektedir. Bazı suşları, sivrisinek ve karasinek larvaları için patojeniktir. Parasporal toksin kristalleri elektron mikroskobu ile gözlenebilir. Fakat yapılan çalışmalarda *B. laterosporus*'un *Bacillus thuringiensis var. israelensis* standartlarına göre 1000 kat daha az larvasidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir [Favret et al.,1985], [Rivers DB et al., 1991]. Bazı suşlar göz enfeksiyonu da yapabilirler.

4. AĞIR METALLERİN SINIFLANDIRILMASI EKOSİSTEM VE ORGANİZMALAR AÇISINDAN ÖNEMİ

4.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, geçiş metalleri, bazı yarı metaller, lantanitler ve aktinitler gruplarında bulunan çeşitli elementlerdir. Ağır metal olarak adlandırılabilecek elementlerin sınıflandırılması çok çeşitli metotlarla yapılmaktadır. Aslında ağır metal tanımının eksik olması ve açık olmaması bu grubun hangi elementleri kapsayıp kapsamadığı konusunu biraz karışık kılmaktadır. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ağır metal tanımının yanlış yönlendirici ve anlamsız olduğunu belirtmiştir [Duffus, 2002]. Buna rağmen bu isim sıklıkla kullanılmakta ve metaller bu grup içerisine kimyasal özellikleri üzerinden yada bazı fiziksel özellikleri üzerinden dahil edilmektedirler. Bunun yanında bazı gruplamalarda, ayırt edici özellik olarak ağır metallerin, düşük konsantrasyonlardaki toksik etkileri dikkate alınmaktadır. Bu tip tanımlamada ise ağır metallerin canlılık üzerindeki etkileri dikkate alındığından bu isimlendirmenin daha çok biyolojik etki üzerinden, biyoloji biliminin bakışına uygun bir tanım olarak kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. Buna karşın ağır metaller, canlı çevre üzerinde çok büyük fonksiyonel zararlara yol açarlar. Bunun yanında ağır metal grupları içerisinde, canlı yaşamına katkı sağlayan elementlerin de var olduğu unutulmamalıdır.

4.2. Ağır Metaller Ve Canlı Çevre

Canlılar yaşam döngüleri boyunca hücresel metabolik süreçlerde kullanmak üzere metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde temel metabolizma elemanı olan Na, Mg, K gibi metal iyonlarının yanında hücresel süreçlerde, yapıya katılan metaller de bulunmaktadır. Bu elementlere Fe, Ni, Cu, Mn, Co, Mo gibi örnekler verilebilir ve bu metallerin bakteriyel hücrelerde μM seviyelerden mM seviylere kadar varolabildiği gösterilmiştir [Heldal et al., 1985]. Periyodik cetvelde, geçiş metalleri, yarı metaller, lantanit ve aktinitleri içeren, ağır metal grupları ise, genel olarak canlı yaşamında toksik etkiye yol açan metaller olarak bilinmektedir. Bunların yanında

bazı metaller ise biyolojik olarak fonksiyon göstermezler bunlara örnek olarak ise Hg, Pb, Ag, Al metalleri verilebilir. Buna karşın canlı yaşamına yararlı olan Vanadyum, Tungsten, Kadmiyum gibi bazı istisna ağır metaller de tespit edilmiştir [Lane et al., 2000], [Lane et al., 2005]. 2007 yılında Sinha ve arkadaşlarının yaptığı çalışma buna örnek oluşturmaktadır. Bu çalışmada bitki köklerinin etrafında koloni oluşturabilen bakterilerin, Kadmiyum varlığında siderofor üretiminde artış oluşturdukları dolayısıyla bu artışın, bitki gelişimine olumlu katkı yaptığı ortaya konulmuştur [Sinha et al., 2007]. İstisnaların dışında kalan bu toksik metallere karşı da organizmalar kendilerini korumak için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir [Nies, 1999], [Nies, 2003]. Mikroorganizmalar, ağır metalleri bünyelerinde biriktirerek aynı zamanda bu metallerin yaratmış olduğu toksik etkileri en aza indirgemek için stratejiler geliştirmişlerdir. Bu stratejilere örnek gösterilebilecek bir sistem olan siderofor sistemleri; metal kıtlığı koşullarında bakterileri besleme gibi bir işlev görürken, ağır metal toksisitesine karşı da bakterileri korumaktadırlar.

Cıva çevresel koşullarda çok düşük konsantrasyonlarda bulunan ve toksik etki gösteren bir elementtir. Genel olarak kömürün ve petrol ürünlerinin yanması ve endüstriyel yan ürünlerden kaynaklanan Hg, atmosfere, suya ve karasal sistemlere yayılmaktadır. Çevresel Hg jeolojik ve biyolojik prosesler sonucunda çevresel döngüye katılmaktadır. Cıva dumanı doğal ve antropojenik kaynaklar tarafından emilmekte ve ardından atmosfere dağılmaktadır. Cıva aynı zamanda besin zinciri basamaklarında da birikmektedir. Cıva atmosferde buhar formunda bulunmakta ve uçucu cıva Hg^{+2} formuna okside olabilmektedir. Doğaya yayılan cıva, Hg_2^{+2}, HgO veya metil/etil cıva formlarında yayılım göstermektedir. Bu formların hepsi toksiktir, suda çözünebilir ve yayılabilirler [Smith et al., 1995]. Ayrıca cıva iyonları toprakta sülfür iyonlarıyla tutunarak HgS formunda bulunabilirler.

İnorganik cıva su ve sedimentlerde bulunmaktadır. Cıva toksisitesi, cıva bileşiklerinin sülfür içeren enzim ve diğer proteinler gibi organik maddelere büyük ilgisi ile yakından ilişkilidir. Mikroorganizmalar cıva kontaminasyonuna; indirgeme, oksidasyon, metilasyon ve dimetilasyon reaksiyonlarıyla karşı koyarlar [Nascimento and Chartone-Souza, 2003]. Bazı mikroorganizmalar, cıvayı pasif difüzyonla hücrelerinden atma kabiliyetine sahiptir [Silver et al., 1996]. Hücre dışında Hg diğer bakteriler tarafından oksidize edilebilmektedir. Çevre mikrobiyologları, cıvanın bakteriler tarafından çevresel habitatlardan uzaklaştırılmasını uzunca süredir araştırmaktadırlar. İlk çalışma, 1984 yılında Silver ve William tarafından gerçekleşirilmiş ve bu çalışmada

mikroorganizmalar toksik cıva bileşiklerinin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Brunke ve arkadaşları tarafından 1993 yılında bir çalışmada ise cıva atık sulardan biyofilmler aracılığıyla uzaklaştırılmaya çalışılmıştır [Silver and William 1984], [Brunke, 1993].

Biyolojik süreçlerin de cıva toksisitesinin azaltılması açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Demir, nikel, kobalt gibi elementler organizmaların bünyesinde hem yaşam hem de gelişim için çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu ağır metaller daha önce de bahsedildiği gibi uygun oranlarda canlılar için önemli kofaktörlerdir. Demir, temel enzimatik reaksiyonların katalizinde işlev görmektedir. Bu mekanizmalara örnek olarak oksijen metabolizması, elektron transferi, DNA ve RNA sentezi süreçleri verilebilir. Bunun yanında, bazı metallerin yüksek konsantrasyonları organizmalar için toksik etkilere yol açmaktadır. Bu tip ağır metal fazlalıkları, oksidatif strese yol açmaktadır yani reaktif oksijen türlerini (ROS) tetiklemektedir ve reaktif oksijen türleri hücresel DNA'ya zarar vermektedir [Valho et al., 2005].

4.3. Ağır Metaller Ve Siderofor Sentezinin İlişkisi

4.3.1. Sideroforlar ve Demir

Sideroforların demir alınımını kolaylaştırdığına dair bulgular daha önce literatürde yer almıştır [Chu et al., 2010], [Hider and Kong, 2010]. Daha önce de belirtildiği gibi demirin organizma yaşamı açısından ne kadar önemli bir element olduğu açıktır. Sideroforlar organizmayı demirle beslemek için aerobik habitatlarda çoğunlukla çözünmemiş oksit anhidrat kompleksi halinde bulunan demiri şelatlama görevi üstlenmektedir. Bu olgu aerobik habitatlar için, demirin saf mineral halinde organizmaya teminin zor olduğu anlamına gelmektedir. Bunun yanında patojenik organizmaları ilgilendiren bir diğer çevre olan konakçı ise bünyesindeki demiri genellikle bir enzim kompleksinin içine hapsetmiş formda bulundurmaktadır. Bu olguda yine demirin mikroorganizmalar açısından çevre koşullarında ne kadar az bulunduğunu ortaya çıkarmaktadır. Yapılan bir çalışmada, demirin (10^{-7} ila 10^{-24} M) mikroorganizma çevresinde her zaman düşük bir seviyede olduğu saptanmıştır [Raymond et al., 2003]. Bunun yanında, toprak için değerlendirildiğinde, siderofor konsantrasyonlarının, litre başına 10 μM'den birkaç μM'e kadar bulunabileceği varsayılmaktadır

[Hersman, 1995]. Daha önce yapılan bir çalışmada 1μM seviyesindeki demirin siderofor üretimini maksimuma çıkardığı da gözlenmiştir [Dave and Dube, 2000]. Demirin ortam koşullarında bu kadar az bulunmasıyla birlikte sideroforlar, demiri mikroorganizmalar için temin edilebilir forma getirerek ortamı bir anlamda zenginleştirmiş olmaktadır. Bunun yanında çevre koşullarına göre patojenik bir organizmaya aitse sideroforlar bazen virülans faktörü olarak da değerlendirilebilecek bileşenler olarak ortaya çıkmaktadırlar.

4.3.2. Sideroforlar ve Diğer Metaller

Demirin bu tür bir sistemle organizmaların bünyelerine katıldığı bilinmektedir [Neilands et al., 1995], son yıllarda yapılan çalışmalar ise ağır metallerin de siderofor sistemlerini etkilediğini ortaya koymuştur [Hernlem et al.,1996], [Neubauer et al., 2000]. Sideroforlar gibi canlı organizmalara ait metal şelatlama kompleksleri birçok metal grubu ile etkileşime girerek düşük miktarlarda metalleri canlı yapısına kazandırmaktadır.

Bazı sideroforlar demir metalini tercihen daha fazla bir aktiflik ile bağlarken diğer metalleri görece daha düşük bir aktiflik ile bağlamaktadırlar. Örneğin hidroxamate türevi bir siderofor olan Desferrioxamine B, Ga^{3+}, Al^{3+} ve In^{3+} yı 10^{20} ve 10^{28} M^{-1} etkinliğiyle bağlarken Fe^{3+} yı 10^{30} M^{-1} cıvarında etkinlik ile bağladığı tespit edilmiştir [Evers et al., 1989], [Hemlem et al., 1996]. Bu metallerin yanında daha önce sideroforlarla Ag, Al, Cd, Cr, Co, Eu, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl, Zn gibi metallerin bağlanmasına dair çalışmalar yapılmıştır. Metallerin azlığı koşullarında siderofor sistemi organizmaya katkı sunarken, aşırılık koşullarında ise metallerin canlı hücreye toksik etki yaptığı bilinmektedir. Bu koşullarda ise siderofor sistemleri fazla metallerden korunmak için içsel dengeyi ayarlayıcı bir rol üstlenmektedirler [Schalk et al., 2011].

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Kimyasal Maddeler

Mono potasyum fosfat, sodyum klorür, amonyum klorür, demir (III) klorür, HDTMA, 8-hidroksiquinolin, kloroform, sodyum hidroksit, magnezyum klorür, kalsiyum klorür, sülfanilik asit, sodyum asetat, alfa-naftilamin, sodyum nitrit, sodyum molibdat, cıva klorür, nikel sülfat ve kobalt klorür, sodyum tiosülfat pentahidrat Merck (Almanya/Darmstadt) firmasından temin edilmiştir. CAS, hidroklorik asit, glukoz, mannitol, piperazine, sülfosalisilik asit ve asetik asit Sigma Aldrich (Almanya/Steinheim) firmasından temin edilmiştir. Piperazine diethanesulfonik asit, Applichem (Almanya/Darmstadt) firmasından temin edilmiştir. Bakto agar Fluka (İsviçre/Steinheim) firmasından temin edilmiştir. İyodin Alfa Aeser (Almanya/Karlsruhe) firmasından temin edilmiştir.

5.1.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Çözeltiler

Kullanılan tüm solüsyon ve çözeltiler 121ºC'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

- MM9 ortamı bileşenleri (1L),
  - KH_2PO_4 ⟶ 3g
  - NaC1 ⟶ 5g
  - NH_4CI ⟶ 10g
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- CAS-HDTMA solüsyonu (1L),
  - CAS ⟶ 0,605g
  - dH_2O ⟶ 500ml

(Birlikte karıştırılır),

- $FeC1_3.6H_2O$ ⟶ 2,703g
- HCl ⟶ 40ml
- dH_2O ⟶ 100ml

(Bir önceki karışıma eklenir),

- HDTMA ⟶ 0,729g
- dH_2O ⟶ 400ml

Son olarak tüm karışıma distile suyun içinde çözülmüş olan HDTMA eklenmiştir. CAS-HDTMA solüsyonu 121ºC'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle kullanılma hazır hale getirilmiştir.

- $MgCI_2$ çözeltisi (1M, 100 ml),
  - $MgCI_2$ ⟶ 9.521g
  - dH_2O ⟶ 100ml

- $CaCI_2$ çözeltisi (100 mM, 100 ml),
  - $CaCl_2$ ⟶ 1.109g
  - dH_2O ⟶ 100ml

- Glukoz çözeltisi (100 ml, %20),
  - Glukoz ⟶ 20g
  - dH_2O ⟶ 100ml

- CAS stok solüsyonu (1L, 2mM),
  - CAS ⟶ 1,21g
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- FeCI3.6H20 çözeltisi (1L, 1 mM),
  - $FeCI_3.6H_20$ ⟶ 2,703g
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- HCl çözeltisi (1L, 10 mM),
  - HCl ⟶ 40ml
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- Fe stok solüsyonu (1 mM, 10 mM HCl),
  - $FeCI3.6H_2O$ ⟶ 2.703g
  - HCl ⟶ 40ml
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- Piperazine tamponu (100 ml, pH 5.6),
  - Piperazine ⟶ 14.357g
  - dH_2O ⟶ 100ml
  - HCl ⟶ 6.75ml

Piperazin distile suyun içinde çözülmüştür. Devamında çözelti pH'ı 5.6 olana kadar HCl eklenmiştir.

- HDTMA çözeltisi (1L),
  - HDTMA ⟶ 0,438g
  - dH_2O ⟶ 1000ml

- CAS testi solüsyonu(1L),
  - Fe solüsyonu ⟶ 15ml
  - CAS solüsyonu ⟶ 75ml
  - HDTMA çözeltisi ⟶ 500ml
  - Piperazin Tamponu ⟶ 367,5ml
  - dH_2O ⟶ 42,5ml

CAS testi solüsyonunu hazırlamak için sırasıyla, CAS solüsyonun üzerine Fe solüsyonu eklenmiştir. Sonra bu karışımın üzerine HDTMA çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak piperazin tamponu eklenip solüsyonun toplam hacmi 1000ml oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir.

- Shuttle solüsyonu (1L, 0,2M),

- Sülfosalisilik asit ⟶ 27,62g
- dH_2O ⟶ 1000ml

• HCl çözeltisi (500 ml, 0.5 N),
- HCL ⟶ 20ml
- dH_2O ⟶ 500ml

• Nitrit - molibdat ayıracı (100 ml),
- $NaNO_2$ ⟶ 10g
- Na_2MoO_4 ⟶ 10g
- dH_2O ⟶ 100ml

• NaOH çözeltisi (100 ml, 1N),
- NaOH ⟶ 4g
- dH_2O ⟶ 100ml

• HCl çözeltisi (100 ml, %10),
- HCl ⟶ 10ml
- dH_2O ⟶ 90ml

• Asetik asit çözeltisi (100 ml, %30),
- Asetik asit ⟶ 30ml
- dH_2O ⟶ 100ml

• Sülfanilik asit çözeltisi (100 ml),
- Sülfanilik asit ⟶ 1g
- Asetik asit çözelti ⟶ 100ml

Sülfanilik asit çözeltisi, asetik asit çözeltisi içinde ısıtılarak çözülmüştür.

• İyodin solüsyonu (100 ml),
- İyodin ⟶ 1.3g
- Glasiyal asetik asit ⟶ 100ml

- Sodyum tiyosülfat çözeltisi (100 ml),
  - $Na_2S_2O_3$ ⟶ 24.818g
  - dH_2O ⟶ 100ml

- Sodyum asetat çözeltisi (100 ml),
  - $C_2H_3NaO_2$ ⟶ 35g
  - dH_2O ⟶ 100ml

- Alfa-naftilamin solüsyonu (100 ml),
  - α- Naftilamin ⟶ 0,3g
  - Glasiyal asetik asit ⟶ 100ml

- Demirsizleştirilmiş casamino acids (1L),
  - Casamino asit ⟶ 100g
  - dH_2O ⟶ 1000ml
  - 8- hydroxyquinolin ⟶ 30g
  - Kloroform ⟶ 1000ml

Aminoasit önce belirtilen miktarda su ile çözülür ardından 8- hydroxyquinolin, kloroform ile karıştırılarak daha aminoasit su karışımının içine dökülür. İki karışımında hacmi eşittir. Sonra karışımın üstte kalan kısmı ayrılır ve ayrı bir kapta eşit hacimde kloroform ile bir kere daha karıştırılır. Üstte kalan kısım amino asit içermektedir ve bu kısım tekrar alınır. Gerek duyulması halinde eşit hacimde kloroformla bu işlem birkaç kere tekrarlanır. Bu saf kloroformla muamelenin amacı ekstrakte etme aşamasında aminoasit karışımında 8- hydroxyquinolin artıklarının kalmamasını sağlamaktır.

5.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri 121ºC'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

- Luria broth (1 L, pH 7.5),
  - Tripton → 10g
  - Maya özütü → 5g
  - NaCl → 10g

- Luria agar (1 L, pH 7.5),
  - Tripton → 10g
  - Maya Özütü → 5g
  - NaCl → 10g
  - Agar → 15g

- Triptic soy broth (1L, pH 7.3),
  - Kazein pepton → 17g
  - Soya pepton → 3g
  - Glukoz → 2,5g
  - NaCl → 5g
  - KH_2PO_4 → 2,5g

- MM9 broth (1L pH 6.5),
  - dH_2O → 855ml
  - NaOH → 6g
  - PIPES → 30,24g
  - 10x MM9 → 100ml
  - Casamino acids → 30g
  - % 20 Glikoz → 10ml
  - 1 M $MgCI_2$ → 1 ml
  - 100 mM $CaCI_2$ → 1ml

MM9 ortamı (Schwyn and Neilands, 1987) literatürde daha önce M9 (Maniatis et al., 1982) olarak bilinen ortama göre dizayn edilmiş bir ortamdır. Bu MM9 ortamında, M9'dan farklı olarak KH_2PO_4 %0.03 oranına çekilmiştir. Ortam iki basamak halinde hazırlanmaktadır. Birinci basamakta, NaOH su içerisinde çözülür ve ardından tampon olarak kullanılan PIPES bu karışımın içerisine nakledilir. En son MM9 tuzlarının oluşturduğu solüsyon eklenir ve karışım otoklavlanır. İkinci basamakta

otoklavdan alınan karışım 50 ºC' ye kadar soğutulur ve ekstraksiyona tabi tutulmuş Casamino acids, Glikoz, $MgCI_2$ ve $CaCI_2$ karışıma eklenerek ortam hazırlanır.

- Ağır metal içeren MM9 broth ortamlar,

Bu ortamlar MM9 ortamına solüsyon halinde $CoCl_2$, $FeCl_3$, $HgCl_2$ ve $NiSO_4$ ağır metalleri belli seviyelerde eklenerek hazırlanmıştır.

- 1 mM $CoCl_2$ içeren MM9 broth
  - dH_2O ⟶ 855ml
  - NaOH ⟶ 6g
  - PIPES ⟶ 30,24g
  - 10x MM9 ⟶ 100ml
  - Casamino acids ⟶ 30g
  - % 20 Glikoz ⟶ 10ml
  - 1 M $MgCI_2$ ⟶ 1ml
  - 100 mM $CaCI_2$ ⟶ 1ml
  - $CoCl_2$ ⟶ 0.13g

- 100 µM $FeCl_3$ içeren MM9 broth
  - dH_2O ⟶ 855ml
  - NaOH ⟶ 6g
  - PIPES ⟶ 30,24g
  - 10x MM9 ⟶ 100ml
  - Casamino acids ⟶ 30g
  - % 20 Glikoz ⟶ 10ml
  - 1 M $MgCI_2$ ⟶ 1ml
  - 100 mM $CaCI_2$ ⟶ 1ml
  - $FeCl_3$ ⟶ 0.027g

- 100 µM $HgCl_2$ içeren MM9 broth
  - dH_2O ⟶ 855ml
  - NaOH ⟶ 6g
  - PIPES ⟶ 30,24g

- 10x MM9 → 100ml
- Casamino acids → 30g
- % 20 Glikoz → 10ml
- 1 M $MgCI_2$ → 1ml
- 100 mM $CaCI_2$ → 1ml
- $HgCl_2$ → 0,0271g

• 2 mM $NiSO_4$ içeren MM9 broth

- dH_2O → 855ml
- NaOH → 6g
- PIPES → 30,24g
- 10x MM9 → 100ml
- Casamino acids → 30g
- % 20 Glikoz → 10ml
- 1 M $MgCI_2$ → 1ml
- 100 mM $CaCI_2$ → 1ml
- $NiSO_4$ → 0,31g

• MM9 agar (1L pH 6.5)

- dH_2O → 855ml
- NaOH → 6g
- PIPES → 30,24g
- 10x MM9 → 100ml
- Casamino acids → 30g
- % 20 Glikoz → 10ml
- 1 M $MgCI_2$ → 1ml
- 100 mM $CaCI_2$ → 1ml
- Bacto agar → 15g

• CAS agar (1L pH 6.5)

- dH_2O → 750ml
- NaOH → 6g
- PIPES → 30,24g
- 10x MM9 → 100ml

- Casamino acids → 30g
- % 20 Glikoz → 10ml
- 1 M $MgCI_2$ → 1ml
- 100 mM $CaCI_2$ → 1ml
- CAS-HDTMA → 100ml

Siderofor üretiminde iki indikatörden biri olarak kullanılacak bu ortamda ise MM9 ortamına ek olarak CAS- HDTMA solüsyonu eklenmiştir. Bu solüsyon sayesinde CAS agar ortamı mavi bir renk alacaktır [Payne, 1994].

5.1.4. Kullanılan Cihaz ve Diğer Malzemeler

Manyetik karıştırıcı (Isolab), Vorteks VWR, +4ºC ve -20 ºC Buzdolabı (Arçelik), -80 ºC derin dondurucu, (Thermo, Forma -86ºC ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), Masa Üstü Santrifüj (Heraeus, Labofuge 400R), Spektrofotometre (Bio-Rad, Smartspec 3000), Otoklav (HIRAYAMA, HICLAHVE-50), pH metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter) Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Mikrodalga Fırın (Kumtel), İnkübatör (Hereus TipB6), Floresans Mikroskobu (Nikon Eclipse Ti-S), ICP-OES (Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer), Pipetler (Gilson Pipetman) Petri kapları (Fıratpen), Falkonlar (Capp), Pipet uçları, Eppendorflar (Expell), Erlenmayerler (Lamtek).

ICP-OES (Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer) cihazı, Doç. Dr. Salim Öncel'in GYTE, Çevre Mühendisliği A.B.D. İnorganik Enstrumental Analiz Laboratuvarı'nda kullanılmıştır.

5.1.5. Kullanılan Bakteri türleri

Çalışmada kullanılan 301/İK3-2 adı verilmiş *Brevibacillus laterosporus* ve *Pseudomonas aeruginosa* PO1 adlı iki bakteri suşu Prof. Dr. Yavuz Sezen'in laboratuvarından temin edilmiştir. 301/İK3-2 *Brevibacillus laterosporus* türü Dr. Mine Gül Şeker'in doktora tezi esnasında Marmara Denizi'nden izole edilmiş ve tanımlanmış bir bakteridir. Vitek tanımlama yüzdesi ile % 85 BLASTN tanımlama yüzdesi ile de % 99 oranında doğrulanmıştır.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Siderofor Tespiti

Bakterilerde siderofor tayini Payne (1994) ‘nin çalışması referans alınarak belirlenmiştir. Çalışmada sıvı ve katı olmak üzere iki tür test kullanılmıştır. Mikrooranizmaların katı besi ortamında yetiştirildiğinde siderofor tayini; CAS sıvı besi ortamında yetiştirildiğinde CAS Likit testi kullanılmıştır [Payne,1994].

Bakteri kültürleri tüm deneylerde demir içermeyen MM9 besiyerlerinde büyütülmüşlerdir. Kullanılan tüm cam malzemeler; ortamdaki demiri uzaklaştırmak amacı ile % 10’luk HCl ile muamele edilip daha sonra distile sudan geçirilmiştir. Cam gereçler son olarak 121 ºC’de 20 dk süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle kullanılma hazır hale getirilmiştir.

5.2.1.1 CAS Testi

CAS agar deneyi, ferrik demir (Fe^{+3}) için sideroforun yüksek afinite göstermesini temel alan ve sideroforun tespitinde kullanılan evrensel bir testtir. HDTMA içeren CAS agar plateleri, Fe^{+3} ile Chrome Azurol Sulfonate (CAS) boyasının kompleks oluşturmasından dolayı mavi renktedir. Bir deterjan olan HDTMA ortamda boyanın çökmesini engellemekte ve bakteriyel büyümeyi teşvik etmektedir. Siderofor varlığında aşağıda belirtilen reaksiyon gerçekleşir, serbest boya açığa çıkar ve mavi renk turuncuya dönüşür.

$$Fe^{+3}\text{- CAS (mavi)} + \text{Siderofor} \rightarrow\rightarrow Fe^{+3} - \text{Siderofor} + \text{CAS (turuncu)} \quad (5.1)$$

Siderofor üretiminin gözlenmesi için seçilen *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 *ve Pseudomonas aeruginosa PO1* bakterileri -80 ve -20 stoklarından her biri için 10 ul alınarak, Luria agar besi yerine aktarılmış ve 37ºC’de inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen ortamlardan bakteriler öze aracılığıyla alt kültüre edilerek tek koloni elde edilmesi sağlanmıştır.

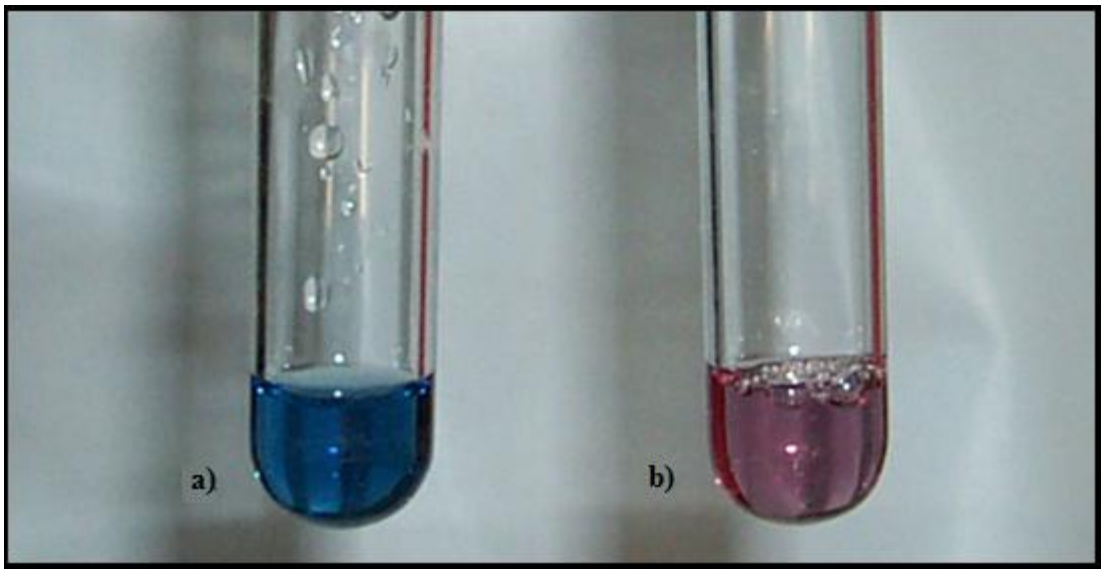
Sonraki aşamada tek koloni halinde elde edilen bakteriler CAS Agar besiyerine kürdanla delme ekim tekniği ile transfer edilerek 37 ºC’de 168 s inkübe edilmiş-

tir. İnkübasyona bırakılan bakteriler için oluşturdukları üreme halkalarının hemen dışında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumunu ve dolayısıyla CAS agar deneyi için pozitif sonuç verdiğini göstermektedir [Payne, 1994]. Bakteri kolonilerinin etrafında siderofor üretiminin varlığını kanıtlayan turuncu halkalar 24 saatlik aralıklarla ölçülmüş ve 168 saat sonucunda bu oluşumlar fotoğraflanmıştır. 168 saat sonucunda halkaların genişlemesi veri olarak ele alınmış ve grafikler yardımıyla değerlendirilmiştir. Bütün analizler üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

5.2.1.2 CAS Likit Testi

CAS sıvı deneyi ile siderofor üretiminin tespit edilmesi amacıyla *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 ve *Pseudomonas aeruginosa PO1* bakterileri demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine ön kültüre alınmıştır. Taze MM9 sıvı besiyerine 1/100 oranında aktarılan her bir ön kültür 225 rpm'de 37 ºC'de inkübe edilmiştir.

Sideroforlar hücre dışına salgılanan moleküllerdir, bu nedenle bakteri kültürleri inkübasyon sonunda 20 ºC'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletinin çökmesi sağlanarak süpernatant elde edilmiştir. Her bir bakteri kültürü için 0,5 ml süpernatant alınarak 0,5 ml CAS solüsyonu ile karıştırılmış, bunu takiben CAS solüsyonu ile siderofor arasındaki bağı kuvvetlendirmesi ve renk değişimini belirginleştirmesi için 10 µM shuttle solüsyonu ilave edilmiştir. Renk değişimin gerçekleşmesi için en az 5 dk bekletilip elde edilen sonuçlar fotoğraflanmıştır. Ayrıca siderofor üretimi bakteri türleri arasında derecelendirilmiştir. Bütün analizler her iki kültür için üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. CAS agar analizinde olduğu gibi siderofor üretimi olan bakterilerde salgılanan siderofor demire bağlanarak boyayı serbest bırakmakta ve ortamdaki rengi maviden, turuncuya çevirmektedir (Şekil 5.1)



Şekil 5.1: CAS sıvı deneyi: a) kontrol, b) siderofor içeren bileşim.

5.2.1.2.1 Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi

Bakteriler tarafından salgılanan sideroforların üretim yüzdelerini belirlemek amacıyla hazırlan ön kültürler 1/100 oranında demir içermeyen MM9 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37ºC'de 225 rpm'de 24 saat inkübe edildikten sonra 20 ºC 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Her bir kültür tarafından salgılanan sideroforun kantitatif olarak ölçülebilmesi için bu basamakta spektrofotometrik tayin kullanılmıştır. Payne' in 1994 yılındaki çalışması esas alınarak 0,5 ml süpernatant, 0,5 ml CAS solüsyonu ile karıştırılmış ve daha sonra 10 µl shuttle solüsyonu ilave edilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm için kültür içermeyen bir MM9 ortamı blank olarak kullanılmıştır. Referans (inokule edilmemiş 0,5 ml MM9 besiyeri + 0,5 ml CAS solüsyonu + 10 µM shuttle solüsyonu) değerlerindeki ve örneklerdeki renk kaybı A630 nm dalga boyunda ölçülerek belirlenmiştir. Payne [1994]' e göre siderofor varlığı olan örneklerdeki değerler referans değerlerden az çıkmalıdır. Sonuçlara bakıldığında referanstan az çıkan değerler bize sideroforların varlığını gösterecektir. Çalışma sonuçları grafiklerle değerlendirilmiştir. Bütün analizler her iki kültür için üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

Sideroforların genel yüzde hesabı,

$$\% \, siderofor = \frac{Ar - As}{Ar} \tag{5.2}$$

Ar: Referans değeri (A_{630}), As: Örnek değeri (A_{630})

5.2.1.2.2 Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi

Brevibacillus laterosporus bakterisinin maksimum siderofor üretim zamanını belirlemek amacıyla hazırlanan ön kültürler 1/100 oranında demir içermeyen MM9 besiyerine inoküle edilerek 37ºC'de 225 rpm 168 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24. 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatlerde örnekler alınarak kantitatif veriler elde etmek için A_{630} da spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve siderefor yüzdeleri belirlenmiştir. Siderofor ölçümlerinin yanında, karşılaştırma amacıyla büyüme verileri OD değerleri A_{600}' de spektrofotometrik ölçümler belirlenmiş ve elde edilen veriler grafik üzerinde birlikte değerlendirilmiştir. Bütün analizler üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

5.2.2. Siderofor Tipinin Belirlenmesi

Brevibacillus laterosporus bakteri suşunun hangi tip siderofor ürettiğini belirlemek amacıyla Arnow testi ve Csaky testleri yapılmıştır.

5.2.2.1. Arnow Testi

Arnow testi katekol tipi sideroforların tipinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [Arnow,1937]. *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin siderofor tipinin belirlenmesi için bu bakteri daha önce bahsedildiği gibi MM9 broth besi yerinde ön kültüre alınmıştır. Daha sonra MM9 broth besi yerine 99 ml besiyeri 1 ml ön kültür olmak üzere transfer edilmiş ve 37ºC'de 225 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saatlik üreme evresi sonunda bakteri kültürlerinden 1 ml alınıp 20 ºC'de 10.000 rpm 5 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 1ml alınıp üzerine 1ml 0,5 N

HCl ve 1ml nitrit-molibdat ayıracı ilave edilmiştir. Eğer *Brevibacillus laterosporus* bakterisi katekol tipi siderofor üretiyorsa bu basamakta karışım sarı renge dönmesi beklenmektedir. Son olarak karışmın üstüne 1 ml NaOH çözeltisi eklenmiştir. Bu basamakta ise katekol tipi siderofor üreten bakterilerde karışımın kırmızı renge dönmesi gerekmektedir. Siderofor oluşumuna bağlı olarak gözlenen renk değişimi spektrofotometre cihazında 510 nm'de ölçülmüştür.

5.2.2.2. Csaky Testi

Csaky testi hidroksamat tipi sideroforların belirlenmesinde kullanılmaktadır [Csaky, 1948]. Bu amaçla ön kültüre alınmış *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisi demir içermeyen MM9 broth besiyerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37 ºC'de 225 rpm'de 48 s inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürleri 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip hücre pelletinin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen 1 ml süpernatantın üzerine 1ml H_2SO_4 (6N) eklenmiştir ve karışım 30 dk 130 °C'de bekletildikten sonra 3 ml sodyum asetat ilave edilmiştir. Daha sonra sırası ile 1 ml sülfanilik asit solüsyonu ve 0,5 ml iyodin solüsyonu eklendikten sonra 5 dk beklenip 1 ml sodyum tiyosülfat solüsyonu ilave edilmiştir. Son olarak, solüsyonun üzerine α-naftilamin solüsyonun ilave edilmesinin ardından karışımın üzerine 10 ml distile su ilave edilip 30 dk bekletilmiştir. Karışımdan 1 ml örnek alınıp spektrofotometre cihazında 526 nm'de ölçülmüştür.

5.2.3. Ağır Metal Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Siderefor üretimine agır metallerin etkisini belirlemek amacıyla çeşitli ağır metal formları ($HgCl_2$, $NiSO_4$, $FeCl_3$, $CoCl_2$) kullanılmıştır. Hg, Ni ve Co gibi ağır metaller bakteri büyümesini etkileyebileceği doz eşiğine kadar çeşitli konsantrasyonlarda ortama verilirken Fe elementi ortama düşük konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Kobalt ve Nikel konsantrasyonları Yılmaz' ın 2003 tarihli çalışması dikkate alınarak, cıva konsantrasyonları Ranganathan ve Shruthi' nin 2008 yılındaki çalışmaları dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu verilere göre siderofor üretimine ağır metallerin etkisini belirlemek amacıyla *Brevibacillus laterosporus* bakterisinin maruz bırakılacağı demir konsantrasyonları 0, 2,5, 5, 10 µM olarak, kobalt konsantrasyonları 0, 0.1, 0.3,

0.5 mM olarak, 0, 0.5, 1, 1.5 mM, nikel konsantrasyonları 0, 0.5, 1, 1.5 mM olarak, cıva konsantrasyonları 0, 5, 10, 15 µM olarak belirlenmiştir.

Hg, Fe, Co ve Ni ağır metallerinin *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin büyümesine ve siderofor üretimine etkisi belirlenirken bu ağır metaller besiyerlerine çeşitli konsantrasyonlarda eklenmişlerdir. Demir dışındaki ağır metallerin mikrobiyal inhibisyon değerleri belirlenerek bu değerlerin altındaki miktarlar besiyerlerine katılmışlardır. Bu değerler Co için 0.6 mM, Ni için 1.6 mM ve Hg için 20 µM' dır.

Ağır metallerin siderofor üretimine etkisini belirleyebilmek amacı ile hazırlanan *Brevibacillus laterosporus* ön kültürleri 1/100 oranında farklı oranlarda metal içeren MM9 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bakterileri kültürleri 37 ºC'de 225 rpm'de 72 s inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden 0, 24, 48, 72 saatlik zaman aralıklarında alınan örnekler 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlardan her biri için CAS sıvı deneyi yapılmış ve siderofor miktarı 630 absorbans değerinde ölçülerek bakterilerin siderofor üretim yüzdesi belirlenmiştir. Farklı metal konsantrasyonlarının varlığında siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında bakteri kültürlerinden 1 ml örnek alınarak OD 600'de hücre yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

5.2.4. Hücresel Cıva Alınımının Saptanması

Hücresel cıva alınımının saptanması amacıyla hazılanan *Brevibacillus laterosporus* ön kültürü, farklı konsantransyonlarda $HgCl_2$ içeren (0, 5, 10, 5 ve 15 µM) MM9 sıvı besiyerlerine 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Bakteri kültürleri 37 ºC'de 225 rpm'de 72 s inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteri kültürlerinden 24 s aralıklarla alınan örnekler (10 ml), 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar optik emisyon spektrometresinde demir için öngörülen emisyon hattı değeri olan 194.168 nm'de okutulmuştur. Elde edilen değerler ile bakteri kültürlerinin mevcut ortamdaki demir miktarının absorblama yüzdesi hesaplanmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Optik emisyon spektrometresindeki çalışmalar GYTE Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı İnorganik Enstrümental Analiz Laboratuvarında gerçek-

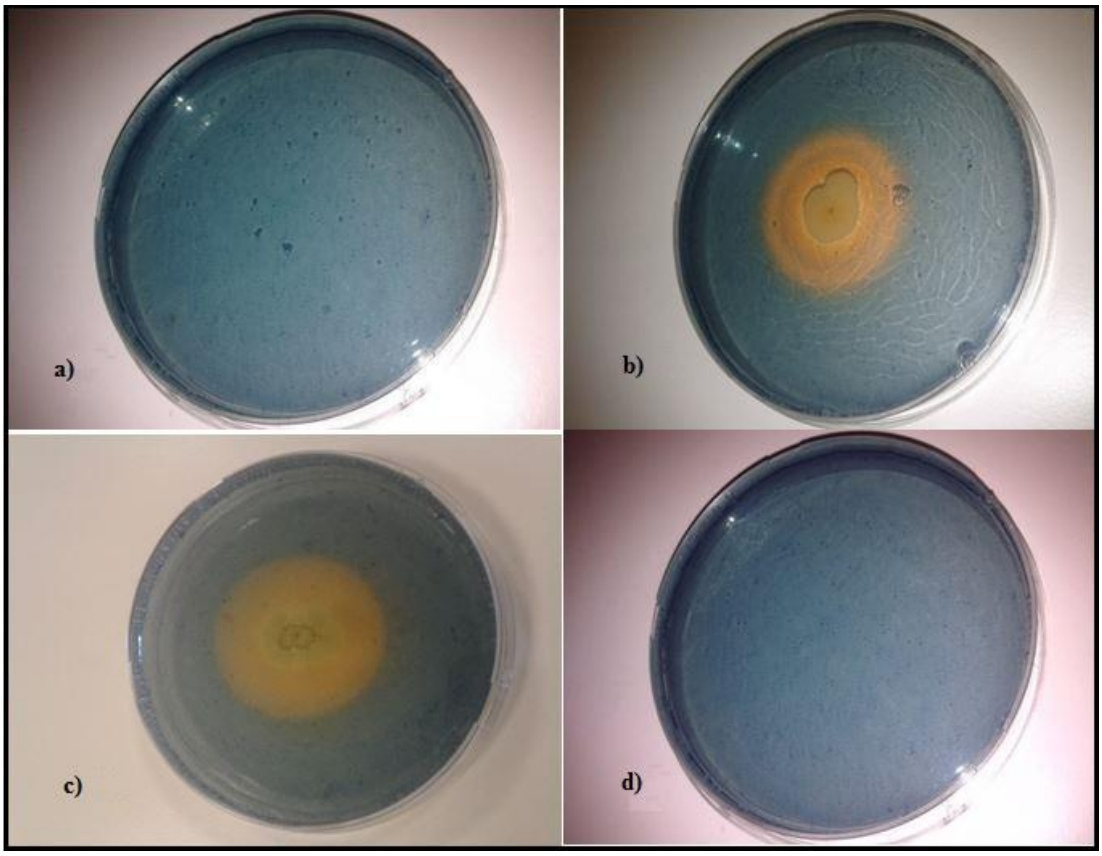
leştirilmiştir. Ayrıca farklı demir konsantrasyolardaki hücre yoğunluğu ve siderofor üretimi daha önce belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

6. BULGULAR

6.1. Siderofor Üretimi

6.1.1 CAS Testi

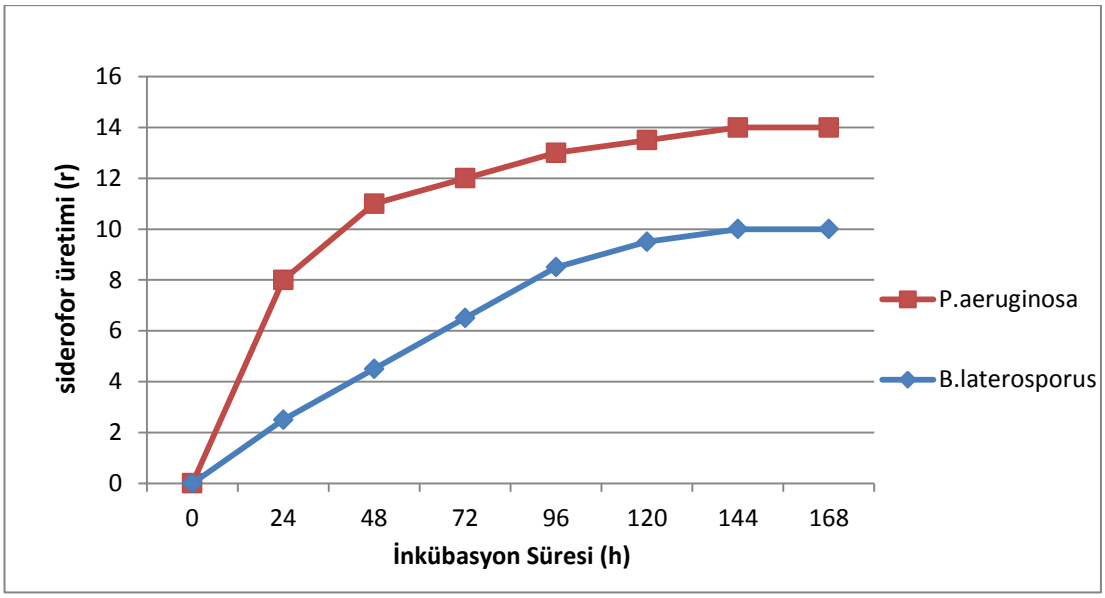
Sideroforlar düşük demir stresi altında salgılanan demir-spesifik bileşiklerdir. Öncelikle *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2, *Pseudomonas aeruginosa* PO1 ve *Geobacillus kaustophilus* bakterileri CAS agar platelere kürdanla delme ekim tekniği ile transfer edilmiş ve 168. saatlik inkübasyon sonunda siderofor üretimini olan bakteri kolonilerinin etrafında oluşan turuncu renkli zonlar Şekil 6.1'de gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-ve yüksek siderefor üretimi yaptığını bildiğimiz ve çalışmalarımızda pozitif kontrol olarak kullandığımız *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde turuncu halka gözlemlenmiştir. *Geobacillus kaustophilus* bakterisi ise negatif sonuç vermiştir. Turuncu halka çapı *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde 14 mm, *Brevibacillus laterosporus* 01/İK3-2 bakterisinde ise 10 mm olarak ölçülmüştür (Tablo 6.1) Aynı zamanda CAS agar platelerinde büyüyen bakteri kolonilerinin siderofor üretimine bağlı olarak oluşturduğu turuncu zonların yarıçapları 24 saat aralıklarla ölçülmüştür. Siderofor üretiminin zamana bağlı grafiği Şekil 6.2' de gösterilmiştir. Bu verilere göre *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3 siderofor üretimi 96. saate kadar hızla artmış, 96-144 saatleri arasında ise üretim hızı yavaşlamıştır. Siderofor üretimi tüm bakteri türlerinde 144. saatten sonra sabit olarak kalmıştır.



Şekil 6.1: CAS agar deneyi sonuçları: a) Kontrol, b) *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2, c) *Pseudomonas aeruginosa* PO1, d) *Geobacillus kaustophilus*.

Tablo 6.1: Bakteri türlerinin Chorome Azurol S Agar testi sonuçları.

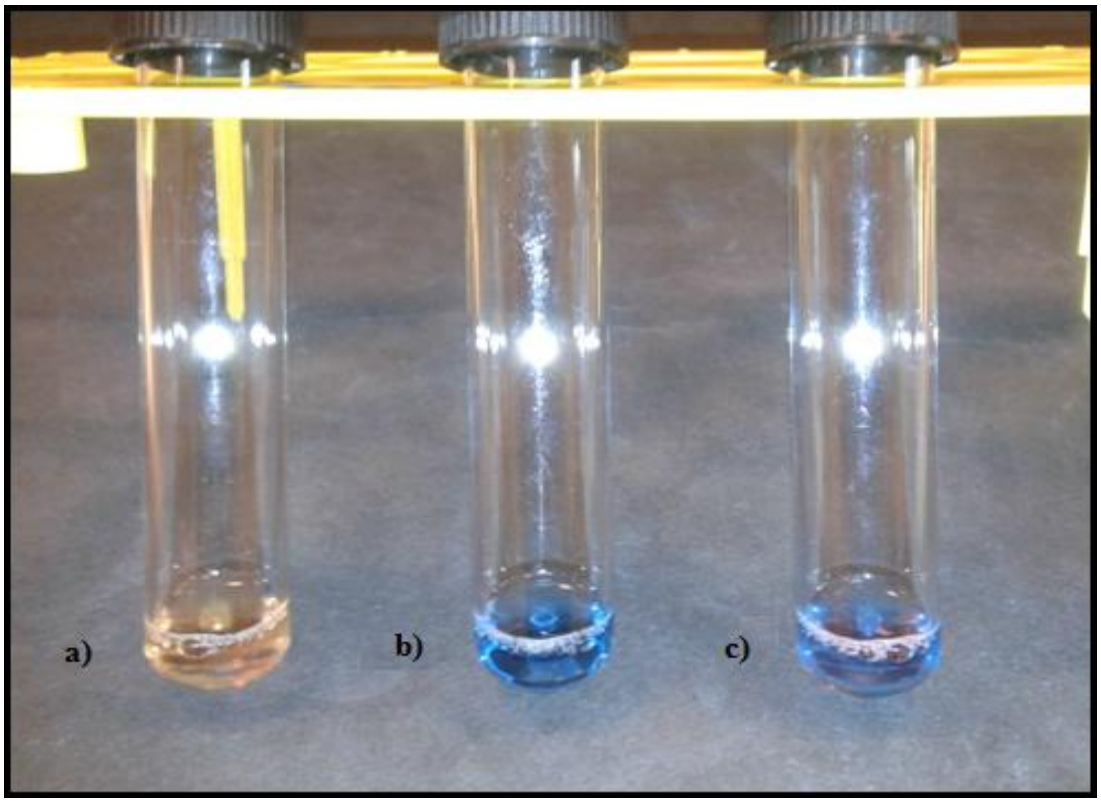
Bakteri Türleri	CAS Agar	Ortalama Çap (mm)
Brevibacillus laterosporus	++	(11-15)
Pseudomonas aeruginosa	+++	(0-5)
Geobacillus kaustophilus	-	(0)



Şekil 6.2: CAS agar üzerinde zamana bağlı siderofor üretimi.

6.1.2. CAS Likit Testi

Bakteri kültürlerinin sıvı besiyerine salgıladıkları sideroforların tespiti için CAS sıvı deneyi yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 7. 3'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 ve pozitif kontrol amaçlı kullandığımız Pseudomonas aeruginosa PO1 bakterilerinde CAS solüsyonunun mavi olan rengi turuncuya dönüşmüştür ve CAS sıvı deneyi pozitif sonuç vermiştir. *Geobacillus kaustophilus* suşunda is renk değişimi gözlenmemiştir. CAS sıvı deneyi sonucunda siderofor üretimleri renk değişim miktarı üzerinden değerlendirilmiş ve derecelendirme yapılmıştır (Tablo 6.1).



Şekil 6.3: CAS sıvı deneyi sonuçları A) *Pseudomonas aeruginosa*, B) Kontrol, C) *Brevibacillus laterosporus*

Tablo 6.2: CAS sıvı deneyinde siderofor üretiminin derecelendirilmesi

Bakteri Türleri	CAS Broth	Üretim Seviyesi
Brevibacillus laterosporus	++	Orta
Pseudomonas aeruginosa	+++	İyi

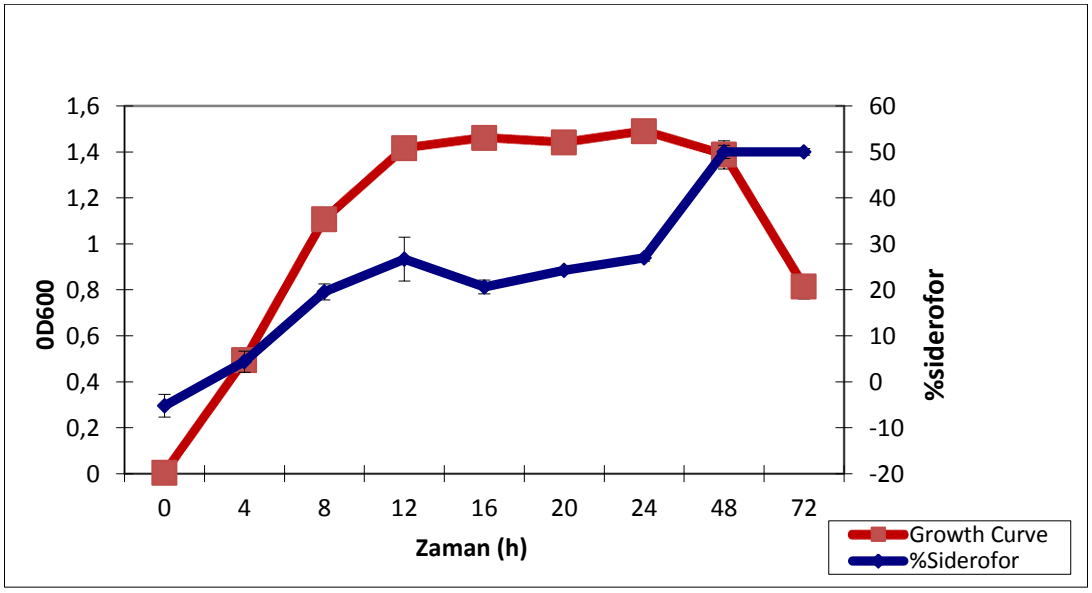
6.1.2.1. Siderofor Üretim Yüzdesinin Belirlenmesi

Siderofor üretim miktarını belirlemek amacıyla CAS sıvı deneyi gerçekleştirilmiştir. Mavi olan CAS solüsyonunun turuncu renge değişimi boyadan demirin sideroforlar tarafından uzaklaştırılması sonucu gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak CAS rengindeki değişim oranı A630 nm dalga boyunda ölçülmüş ve siderofor birim yüzdesi hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre görece en yüksek siderofor yüzdesi pozitif kontrol olarak kullandığımız *Pseudomonas aeruginosa PO1* suşunda % 87,1, *Brevibacillus laterosporus* bakterisinde ise % 28,6 olarak belirlenmiştir. *Geobacillus kaustophilus* suşunda ise CAS sıvı deneyi sonucunda renk değişimi göz-

lenmemiş aynı zamanda 630 nm dalga boyundaki ölçümlerde sonuç elde edilmemiştir.

6.1.2.2. Maksimum Siderofor Üretim Zamanının Belirlenmesi

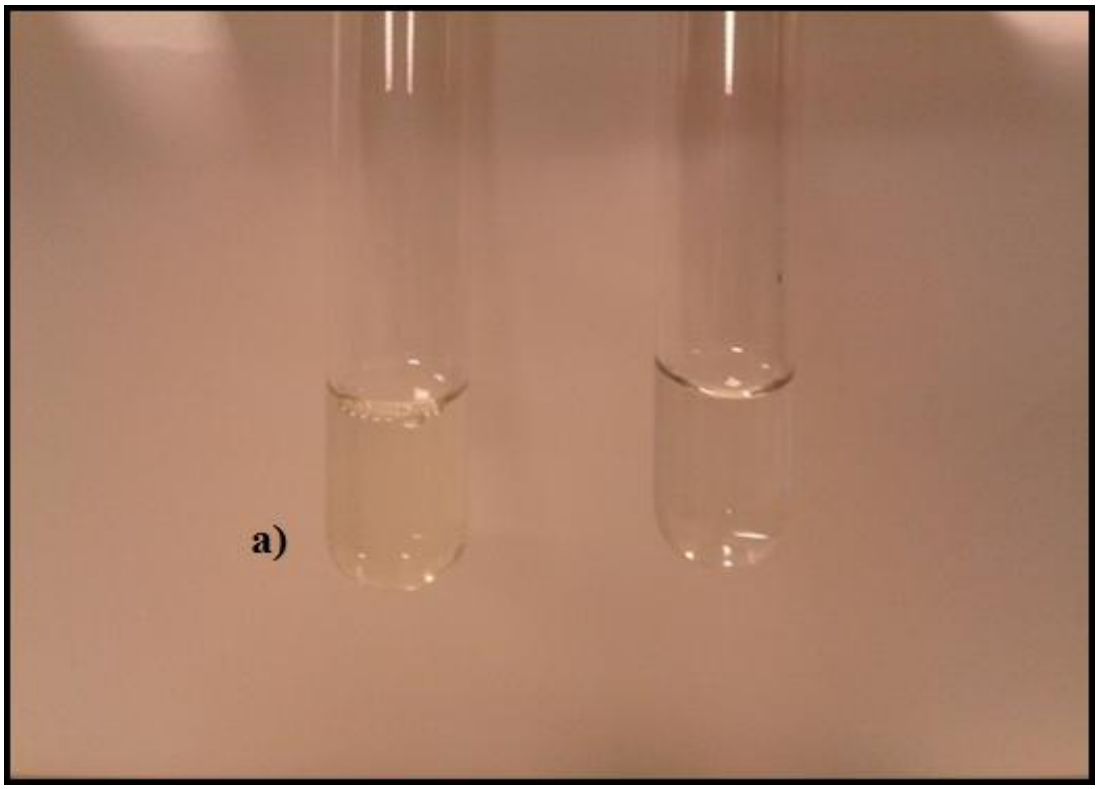
İnkübasyon süresinin siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla *Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2* bakterilerisi MM9 besi ortamında 120 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında farklı zaman aralıklarında örnekler alınalarak bakterilerin siderofor üretim yüzdeleri belirlenmiştir. Aynı zamanda siderofor üretiminin hücre büyümesi ile ilişkisini belirlemek amacı ile belirtilen zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre yoğunluğu 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde ettiğimiz verilere göre *Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2* bakterisinin zamana bağlı siderofor üretimi Şekil 6.4' de gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre siderefor üretimi 48. saate kadar artış göstermiş takip eden saatlerde siderofor üretimi sabitlenmiştir. *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin en yüksek siderofor üretimi hücre büyümesinin ölüm evresine geçiş yaptığı 48. saatte % 50 olarak tespit edilmiştir.



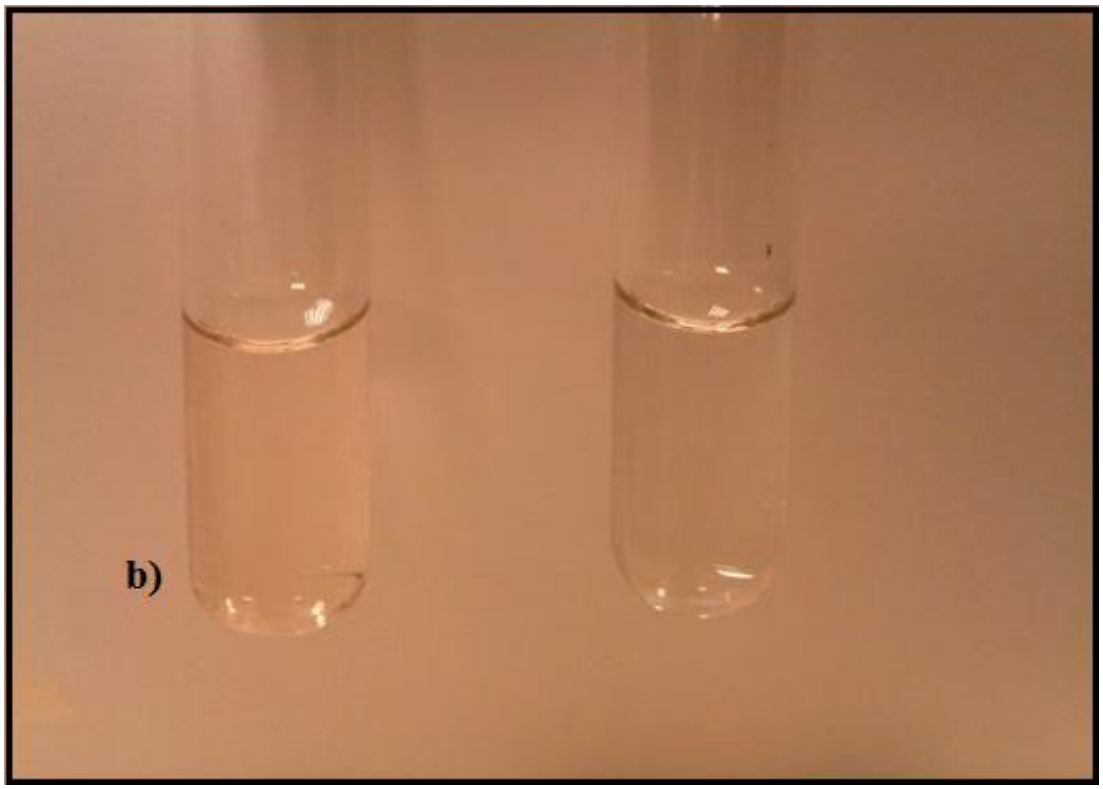
Şekil 6.4: *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin zamana bağlı siderofor üretimi.

6.3. Siderofor Tipinin Belirlenmesi

Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2 bakteri suşunun hangi tip siderofor ürettiğini belirlemek amacıyla katekolat tipi sideroforlar için pozitif sonuç veren Arnow metodu ve hidroksamat tipi sidereoforlar için pozitif sonuç veren Csaky metodu uygulanmıştır. Arnow metoduna göre siderofor içeren solüsyon, nitrit-molibdat ayıracının ilave edilmesi ile sarı renge dönüşmektedir (Şekil 6.5.a). Oluşan sarı renk ise fazla miktarda sodyum hidroksit varlığında turuncu-kırmızı renge dönüşmektedir. Şekil 6.5.b)'de görüldüğü gibi siderofor içermeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Brevibacillus laterosporus* suşunun ürettiği sideroforun katekolat tipi olduğu tespit edilmiştir. Arnow metoduna göre *Brevibacillus laterosporus* siderofor örneği 510 nm'de 0.055 olarak ölçülmüştür.



Şekil 6.5: a) Arnow testinde renk değişim basamakları (sarı).



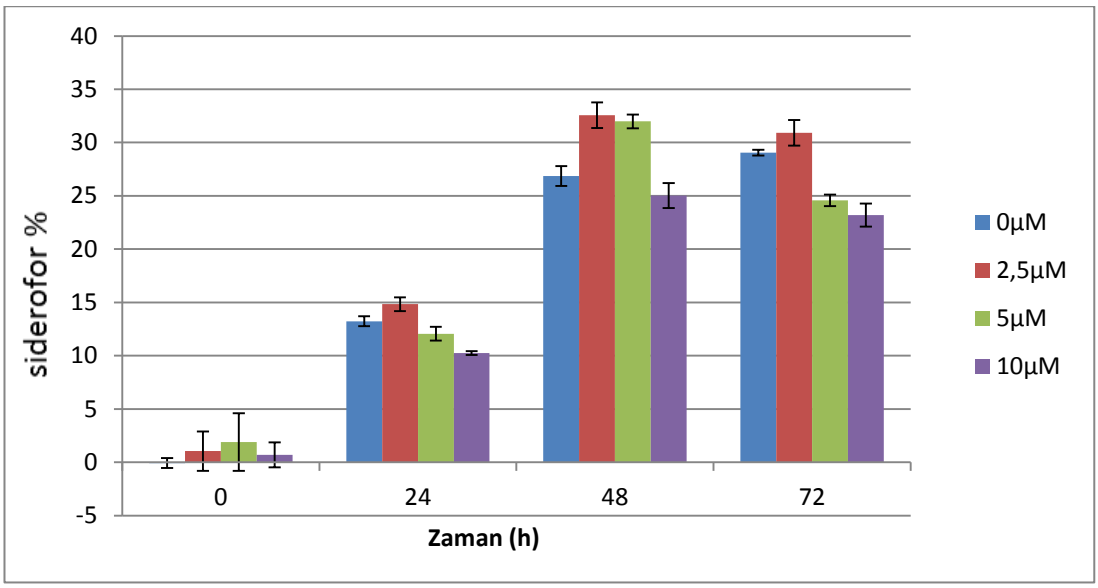
Şekil 6.5: b) Arnow testinde renk değişim basamakları (kırmızı).

Siderofor tipinin belirlenmesi için kullandıgımız ikinci test Csaky metodudur. Hidroksamat tipi sideroforların belirlenmesinde kullanılan bu method *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin ürettiği siderofor örneği ile negatif sonuç vermiştir.

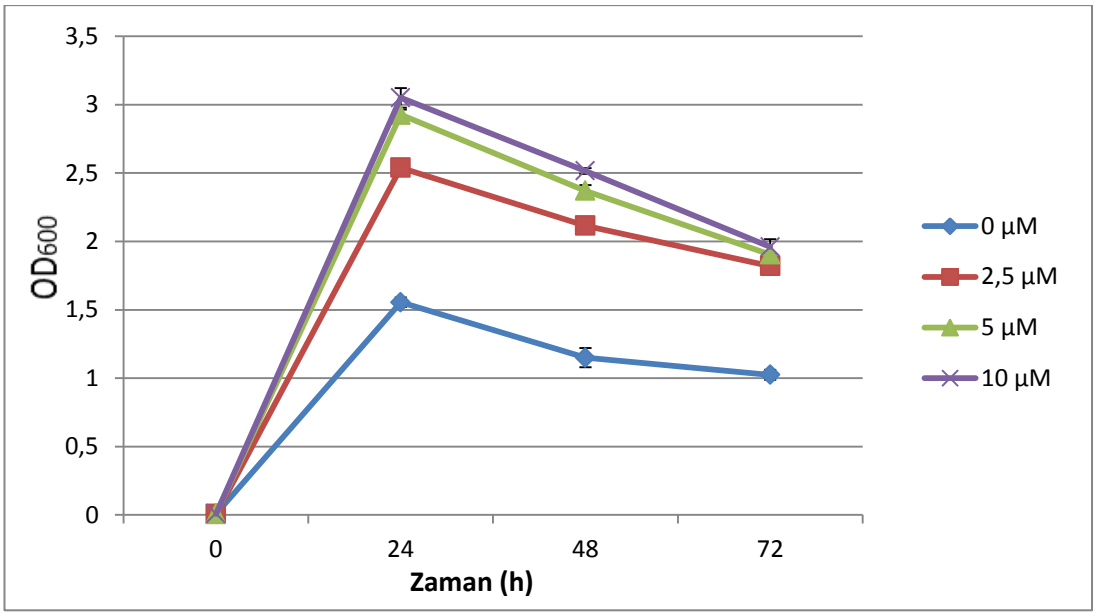
6.4. Ağır Metal Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

6.4.1. Farklı Demir Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Demirin *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3 bakterisinin siderofor üretimi ve hücre büyümesi üzerine etkisini incelemek amacıyla bakteriler 0, 2.5, 5, 10 µM $FeCl_3$ içeren MM9 besi ortamında 37 ^{o}C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 24 saat aralıklarla örnekler alınanarak siderofor üretim miktarındaki ve hücre büyümesindeki değişimler incelenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre demir konsantrasyonlarının siderofor üretimine etkisi Şekil 6.6' da, hücre büyümesine etkisi ise Şekil 6.7'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek siderofor üretimi 48. saatte 2.5 µM ve 5 µM Fe içeren besiyerinde sırasıyla % 32.57 ve % 31.98 olarak tespit edilmiştir. Demir, hücre büyümesini stimüle etmiş artan demir konsantasyonuna paralel olarak hücre büyümesinde artış gözlenmiştir. Maksimum hücre büyümesi 24. saatte 10 µM Fe içeren büyüme ortamında tespit edilmiştir.



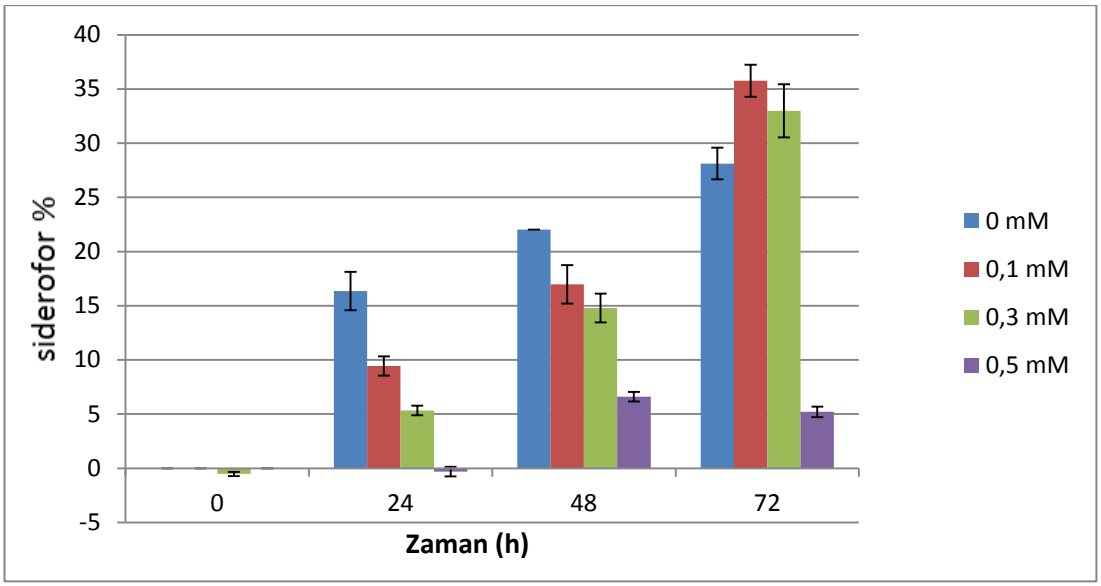
Şekil 6.6: Demirin siderofor üretimine etkisi.



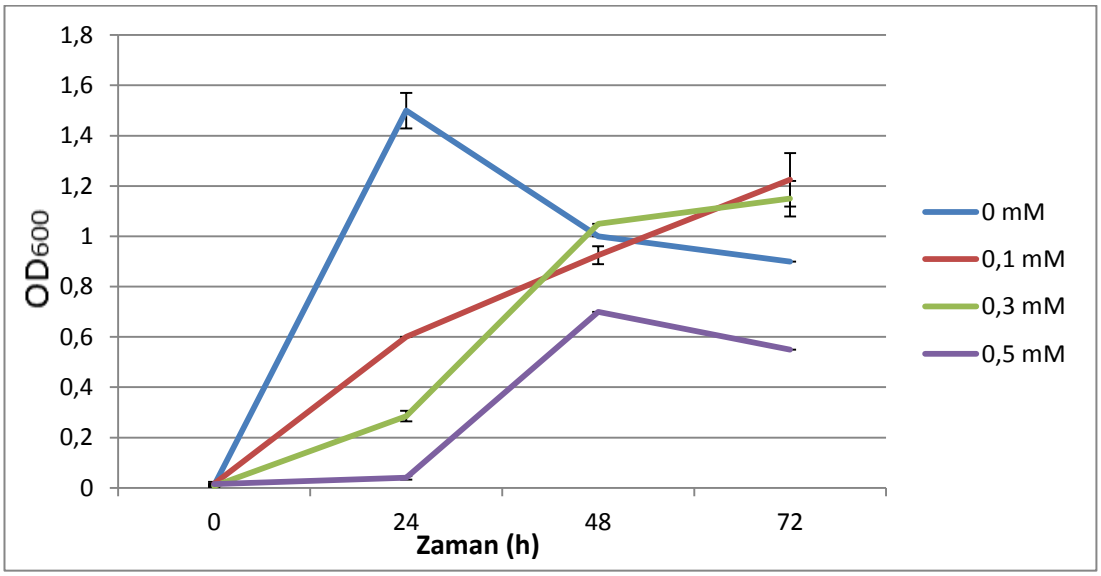
Şekil.6.7: Demirin bakteri büyümesine etkisi.

6.4.2. Farklı Kobalt Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Kobaltın *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 siderofor üretiminine etkisi 0, 0.1, 0.3, 0.5 mM konsantrasyonlarında incelenmiştir. Hücrelerin farklı kobalt konsantrasyonlarındaki siderofor üretimi ve bu metal konsantrasyonlarının hücre büyümesine etkisi sırasıyla Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'da gösterilmiştir. En yüksek siderofor üretimi 72. saatte 0,1 mM kobalt varlığında % 35.76 oranında tespit edilmiştir. Maksimum hücre büyümesi, kobaltın olmadığı besi ortamında 24. saatte gözlenirken 0.1 mM konsantrasyonundaki kobaltın hücre büyümesini zamana bağlı olarak arttırdığı ve bu konsantrasyonda en yüksek hücre büyümesinin siderofor üretimin en yüksek miktarda sentezlendiği 72. saatte olduğu tespit edilmiştir.



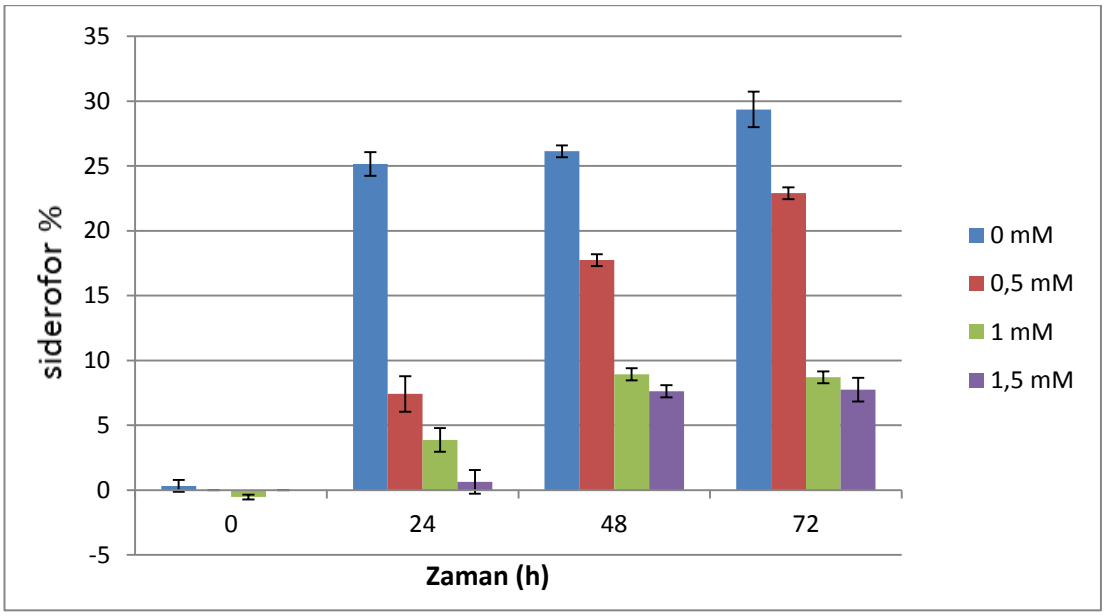
Şekil.6.8: Kobaltın siderofor üretimine etkisi.



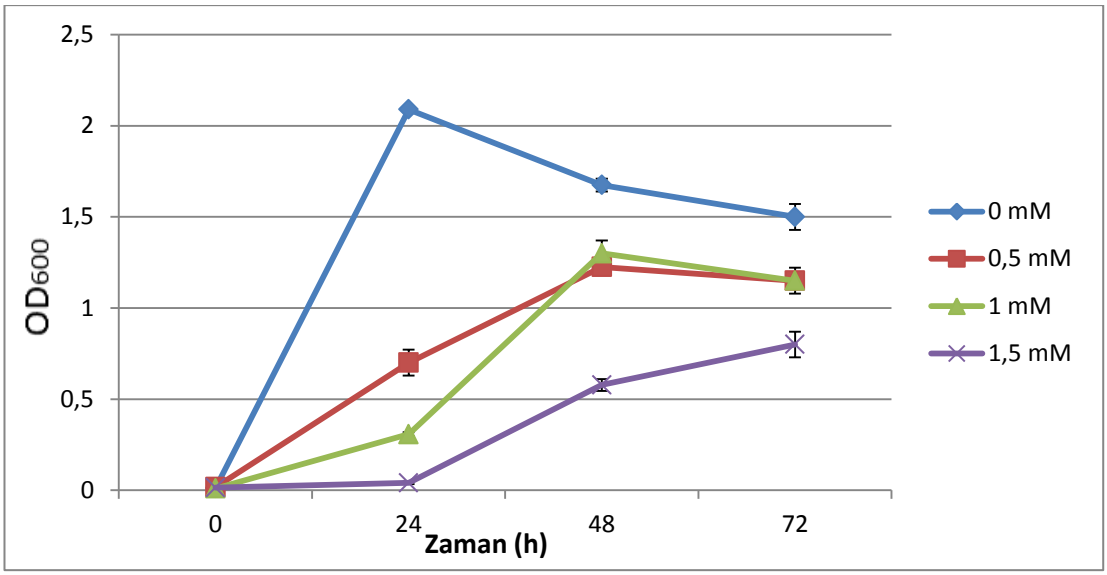
Şekil.6.9: Kobaltın bakteri büyümesine etkisi.

6.4.3. Farklı Nikel Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Nikelin *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 siderofor üretimine etkisi 0, 0.5, 1, 1.5 mM konsantrasyonlarında incelenmiştir. Farklı cıva konsantrasyonlarına bağlı olarak siderofor üretimi Şekil 6.10' da ve hücre büyüme grafiği ise Şekil 6.11'de gösterilmiştir. Nikel diğer metallerin aksine siderofor üretimini pozitif yönde etkileyen bir katkı yapmamıştır. En yüksek siderofor üretimi nikel içermeyen besi ortamında 72. saatte % 29.35 olarak tespit edilmiştir. Nikel içeren ortamlarda ise en yüksek siderofor üretimi 72. saatte 0.5 mM nikel konsantrasyonunda % 22.90 olarak belirlenmiştir. En yüksek hücre büyümesi 24. saatte gözlenirken nikel varlığında hücre büyümesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Nikel varlığında en yüksek hücre büyümesi 0.5 ve 1 mM konsantrayonlarında tespit edilmiştir.



Şekil.6.10: Nikelin siderofor üretimine etkisi.

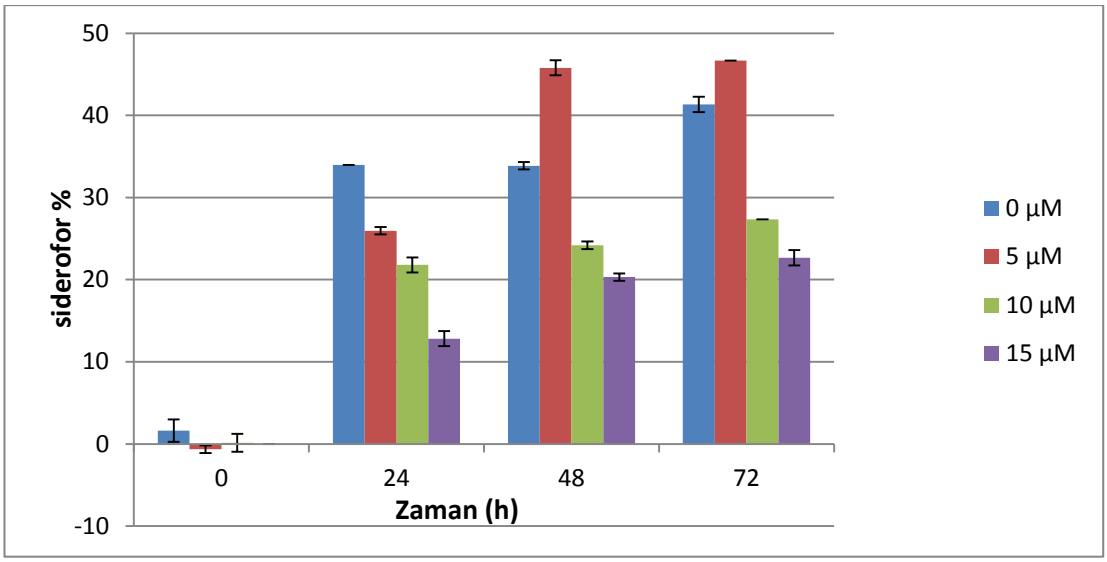


Şekil.6.11: Nikelin bakteri büyümesine etkisi.

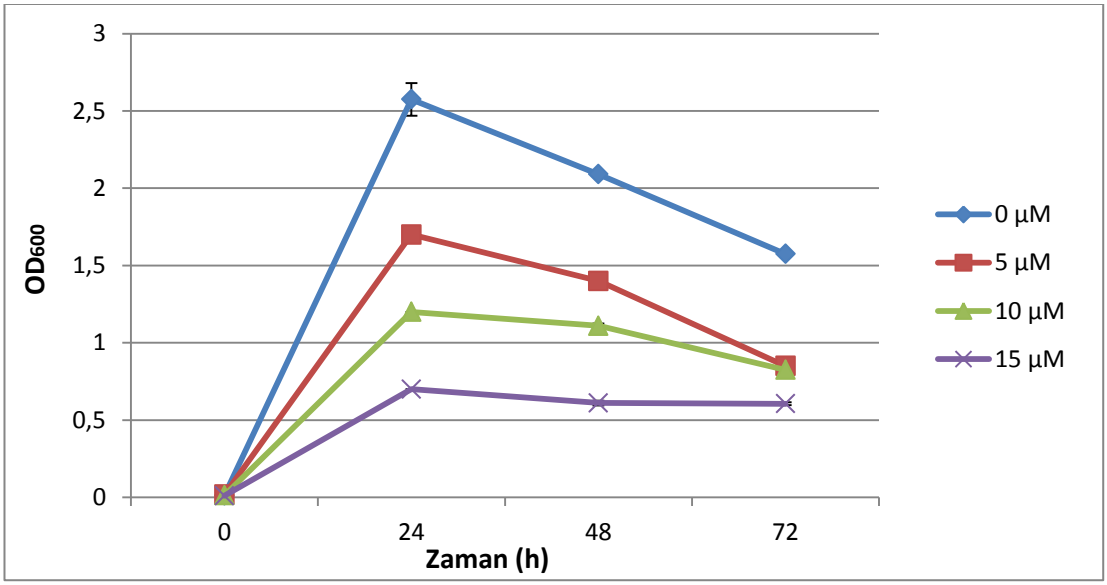
6.4.4. Farklı Cıva Konsantrasyonlarının Siderofor Üretimine Etkisi

Cıvanın *Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2* siderofor üretimine etkisi 0, 5, 10, 15 µM konsantrasyonlarında incelenmiştir. Farklı cıva konsantrasyonlarına bağlı olarak siderofor üretimi Şekil 6.12'de ve hücre büyüme grafiği ise Şekil 6.13'de gösterilmiştir.

En yüksek siderofor üretimi 5 µM Hg varlığında 48. ve 72. saatlerde sırasıyla % 47.1 ve % 46.6 oranında gözlenmiştir. Cıvanın hücre büyümesi üzerine etkisine baktığımızda artan cıva konsantrasyonunun hücre büyümesini baskıladığı gözlemlenmiştir. Cıva varlığında en yüksek hücre büyümesinin ise en yüksek siderefor üretimin gözlendiği 5 µM Hg konsantrasyonunda olduğu tespit edilmiştir.



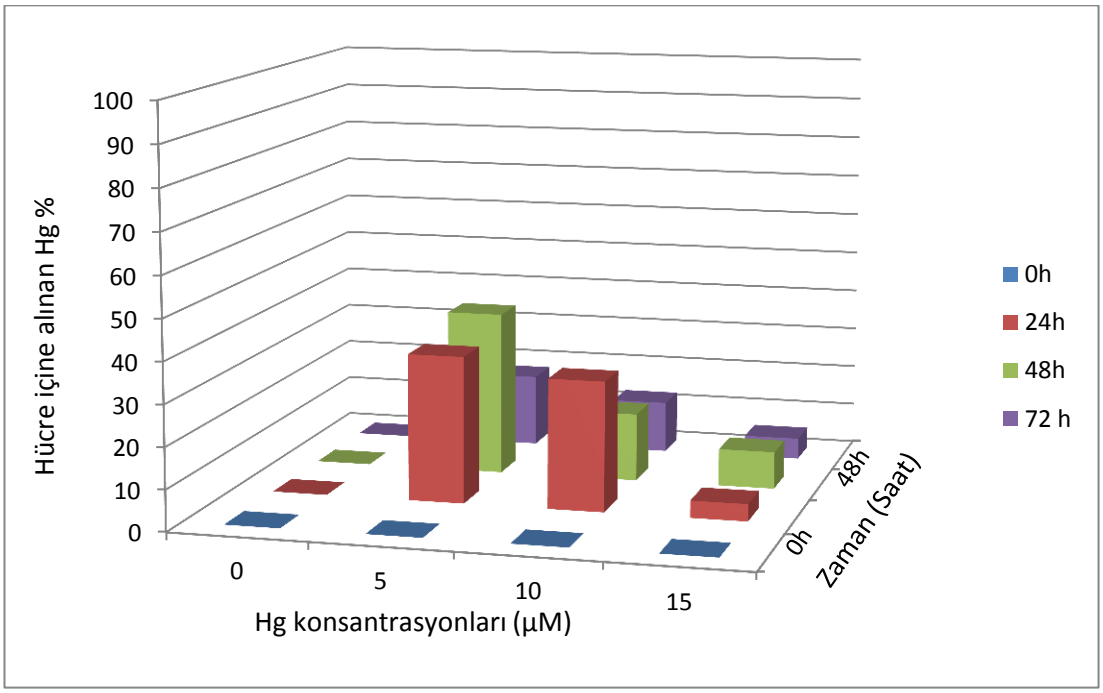
Şekil.6.12: Cıvanın siderofor üretimine etkisi.



Şekil.6.13: Cıvanın bakteri büyümesi üzerine etkisi.

6.5. ICP-OES (Optical Emission Spectrometry) ile Hücresel Cıva Alınımının Saptanması

Brevibacillus laterosporus 301/İK3-2 suşunun farklı cıva konsantrasyonlarında besi ortamına salgılanan siderofor üretimini belirlemekle beraber siderofor ile birlikte hücre içine alınan cıvanın miktarının saptanması için ICP-OES cihazı kullanılmıştır. ICP-OES cihazındaki ölçüm sonuçlarına göre; en yüksek cıva alınımı 48. saate gözlenirken en az metal alınımı 72. saate saptanmıştır (Şekil 6.14). En yüksek cıva alınımının 48. saatte gerçekleşmesi, maksimum siderofor üretimini belirlemek için yaptığımız araştırmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olduğu saptanmıştır. *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2 bakterisinin 48. saatte, farklı cıva konsantrasyonlarındaki demir alınımı sonuçlarına göre en yüksek cıva kazanımı 5 µM (% 40) konsantrasyondaki bakteri kültürlerinde gözlenmiştir. 10 µM konsantrasyonda % 16.62 yüzdesinde cıva alınımı gözlenmiştir. En düşük cıva kazanımı ise 15 µM konsantrasyonunda da % 9.1 olarak tespit edilmiştir.



Şekil.6.14: Cıva konsantrasyonlarına ve zamana bağlı cıva alınımı.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması, *Brevibacillus laterosporus* bakterisi tarafından üretilen sideroforun tespiti ve çeşitli metallerin siderofor üretimine olan etkilerinin araştırılmasını kapsamaktadır.

Çalışmamızda ilk olarak *Brevibacillus laterosporus* tarafından üretilen sideroforların tespiti için CAS deneyi yapılmıştır. Siderofor tespiti için yaptığımız deneylerimizde, yüksek oranda siderofor ürettiği bilinen *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterisi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [Tailor and Joshi, 2012]. Aynı zamanda siderofor üretimi gözlemlenmeyen *Geobacillus kaustophilus* bakterisi de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Siderofor tayini öncelikle CAS agar platelerinde gerçekleştirilmiştir ve siderofor varlığını gösteren turuncu renkteki zonlar gözlemlenmiştir. CAS agar platelerinde gözlenen turuncu siderofor halkalarını derecelendirmek amacıyla 24 saat aralıklarla 7 gün boyunca zon çapları ölçülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Pseudomonas aeruginosa* PO1 bakterisi ile karşılaştırıldığında (zon çap 14 mm), *Brevibacillus laterosporus* bakterisi siderofor üretmiş ve 7. gün sonunda zon çapı 10 mm'ye ulaşmıştır. Ancak CAS agar deneyi öncelikle sideroforların tespiti için bir tarama testi olduğundan bakterilerin CAS agar plateleri üzerinde oluşturdukları kolonilerin büyükleri arasındaki fark ihmal edilmiştir. Aynı zamanda *Brevibacillus laterosporus* bakterisinin metalsiz MM9 sıvı besi ortamına salgıladığı siderofor miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla, öncelikle salgılanan sideroforun CAS solusyonundaki (1 Mm Fe solüsyonu + Piperazine buffer + HDTMA) demire yüksek afinite ile bağlanması sonucu meydana gelen renk kaybını ölçmeye dayanan CAS sıvı deneyi yapılmış ve elde edilen veriler [(Ar -As)/Ar] x 100 formülü kullanılarak siderofor birim yüzdesi ile hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullandığımız *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde % 87.1 oranında siderofor üretimi gözlenirken *Brevibacillus laterosporus* bakterisinde % 28.6 oranında tespit edilmiştir.

Brevibacillus laterosporus tarafından üretilen sideroforun kimyasal olarak karakterize edebilmek için katekol ve hidroksomat tipi sideroforların tespitinde kullanılan sırasıyla Arnow ve Csaky metodları kullanılmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada *Bacillus* türlerinin katekol tipi siderofor ürettiği bilinmektedir [Williams et al., 2012]. Yaptığımız Arnow testi sonuçları bu bakterinin katekol tipi siderofor üret-

tiğini desteklemiştir. Csaky deneyi sonucunda ise kültür süpernatantında hidroksamat tipi siderofor tespit edilmemiştir.

Brevibacillus laterosporus bakterisinin maksimum siderofor üretim zamanını belirlemek amacıyla metal içermeyen MM9 besi ortamında büyütülerek zamana bağlı büyüme grafiği elde edilmiş ve belirli aralıklarla alınan süpernatant örnekleri kullanılarak siderofor üretim yüzdeleri hesaplanmıştır. Sideroforların büyük çoğunlukla eksponansiyel fazda üretildikleri ve durgun fazda sabit olarak devam ettikleri, ilerleyen zamanla beraber bakterinin besini tüketmesi ve hücrelerin parçalanmaya başlaması sonucu siderofor konsantrasyonu düştüğü de daha önce gösterilmiştir [Kalinowski et al., 2000]. Yaptığımız çalışmada benzer olarak siderofor üretimi eksponansiyel fazda artış göstermiştir. Yine hücrelerin 16. saatten 24. saate kadar durgun faza girdikleri evrede siderofor üretimi sabit olarak devam etmiş ancak 24. saatten 48. saate kadar hızlı bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek siderefor üretimi ise hücrelerin ölüm evresine giriş yaptığı 48. saatte % 50 olarak tespit edilmiştir.

Ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşiklerdir, bozulmaz ve yok edilemezler. Metaller canlı yapısına gıda, su ve hava yolu ile girmektedirler. İz elementler gibi bazı ağır metaller canlıların metabolizmalarını sürdürmeleri için gereklidirler. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmektedir. Na, K, Mg gibi metaller organizmalar tarafından temel metabolizma elamanı olarak kullanılırken çalışmamızda kullandığımız Fe, Ni, Co gibi metaller de yapıya katılan metaller olarak bilinmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda kullandığımız Hg elementi ise biyolojik fonksiyon göstermeyen bir metal olarak bilinmektedir.

Sideroforlar başta demir olmak üzere birçok metalle farklı düzeylerdeki afinitelerle bağlanmakta ve kompleks oluşturmaktadır [Hernlem et al., 1996]. Sideroforların demirin yanında çeşitli metallerle olan ilişkisinin ortaya konulması, olumsuz çevresel etkileri olan toksik metallere karşı doğal tolerans mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunmak bağlamında önemli bir olgudur. Bu amaçla çalışmamızda *B. laterosporus* bakterisindeki siderofor üretimine dair çeşitli metallerin etkisi incelenmiştir. Çalışmada hem hücre yapısına katılan hem de biyolojik olarak fonksiyon göstermeyen Fe, Ni, Co ve Hg gibi metaller kullanılmıştır. Braud ve arkadaşları yaptığı çalışmayla 16 farklı metalin siderofor türleri olan pyoverdin ve pyochelin üretimini etkilediğini göstermiştir (Braud et al., 2009). Kullandığımız 4 metal de bu 16 metalin arasından seçilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız metallerin konsantrasyonları daha önce yapılan çalışmalar temel alınak belirlenmiştir. Co ve Ni metal konsantrasyonları Yılmaz (2003)'ın *Bacillus circulans* EB1 bakterisinin metal toleransını belirlemek amacıyla yaptığı çalışma dikkate alınarak belirlenmiştir [Yılmaz., 2003]. Belirlediğimiz metal konsantrasyonları hücreler üzerinde denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre mikrobiyal inhibisyon yapan konsantrasyonlar değiştirilerek koşulların optimize edilmesi sağlanmıştır. Hg değerleri ise daha önce *Bacillus* ve *Ureibacillus* türlerinde yapılan bir çalışmada kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak belirlenmiştir (Glendinning et al., 2005). Fe konsantrasyonları ise Rachid' in yapmış olduğu çalışma esas alınarak belirlenmiştir [Rachid et al, 2005].

Brevibacillus laterosporus ile yapılan metallerin siderofor üretimine etkisine dair yapılan deneylerde genel olarak en iyi sonuç 72. saatte alınmıştır. Fe için alınan sonuçlarda ise en iyi siderofor üretimleri 48. saatte tespit edilmiştir. Hg ile yapılan deneyde ise 48 ve 72. saatlerdeki yüzdesel siderofor değerleri birbirlerine oldukça yakın çıkmıştır. Siderofor üretiminin ağır metal varlığında geç saatlerde yükseldiği görülen deneylerdeki sonuçlar, üremelerin ilk saatlerde baskılanıp, tolerans ile birlikte artmasına bağlanmıştır. Kullanılan 3 ağır metalin konsantrasyonları da doğada herhangi bir ortamda çok bulunamayacak düzeylerde yüksek seviyelerdedir.

Metallerin siderofor üretimine etkisini belirlemek amacıyla ilk olarak demir elementi kullanılmıştır. Demir elementi tüm canlıların büyümesi için gerekli olan bir iz elementtir. Hg, Co ve Ni konsantrasyonlarının aksine Fe konsantrasyonları çok daha düşük tutulmuştur. Yüksek oranda kullanılabilir demir (Fe^{3+}) varlığında siderofor ekspresyonunun baskılandığı fakat organizmaların büyümesi için ortamda düşük miktarda demirin gerekli olduğu bilinmektedir [Neiland et al., 1987). Demirin büyüme ve siderofor üretimi ile ilişkisini belirlemek amacıyla farklı demir konsantrasyonlarındaki MM9 besiyerlerinde büyütülen *B. laterosporus* bakterisinin eş zamanlı büyüme ve siderofor ölçümleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçalara göre çok düşük seviyelerdeki demir varlığında (2.5, 5, 10 µM) dahi siderofor üretiminin azaldığı buna karşılık bakterinin üremesinin arttığı belirlenmiştir. Her ne kadar 48. saatte 2.5 ve 5 µM lık gruplar ve 72. saatte 2.5 µM lık grup siderofor yüzdesi bağlamında, kontrolü geçse de üremelerin ulaştığı düzeylere bakıldığında demirin bakteri üremesini stimüle ettiği ve bakterinin üreme miktarı ile oranlandığında siderofor yüzdesinin yine kontrol grubunda maksimum olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde bulundan birçok çalışma ile parallellik arz etmektedir. Yine benzer bir

şekilde Rachid ve arkadaşlarının (2005) yapmış olduğu bir çalışmada ferrik demir miktarı besiyerlerinde 200 µg/L'nin üzerinde olduğunda siderofor üretimi baskılanmış, ferrik demir miktarı besiyerlerinde 160 µg/L'in altında bulunduğunda ise siderofor üretimi pozitif yönde etkilenmiştir [Rachid et al, 2005]. Siderofor yüzdelerindeki bu dalgalanmanın nedeni üremelerdeki değişime bağlandığı düşünülmektedir. Ayrıca kullandığımız ortamın (MM9) demir eksikli bir ortam olması ve bu ortamın mikroorganizma yaşamını baskılayan bir ortam olduğu da çalışma esnasında göz önünde bulundurulmuştur.

Kobalt canlılık açısından önemi bilinen; kobalamin, nitril hidrataz ve metionil aminopeptidaz gibi birçok organik bileşiğin yapısına katılan bir metaldir [Cracan et al., 2013]. Kobalt ile yapılan çalışmalarda ise yaptığımız optimizasyon çalışmaları sonucunda, kontrol dışında konsantrasyonlar sırasıyla 0.1, 0.3, 0,5 mM olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre siderofor üretimi, 48. saatte kobalt içermeyen kontrol grubunda en yüksek seviyede gözlenirken (%22), 72. saatte 0.1 mM (%35.7) ve 0.3 mM (%32.9) lık kobalt konsantrasyonlarında siderofor üretimi kontrol grubunu aşmıştır. 0.5 mM kobalt içereni ortamda ise üreme baskılanırkn aynı zamanda siderofor üretimi diğer konsantrasyonlara göre oldukça düşük çıkmıştır. Kontrol grubu 24. saatte üremede en yüksek düzeye ulaşırken diğer konsantrasyonlarda üreme baskılanmıştır, ilerleyen saatlerde kobalt içeren kültürler bu metale karşı adaptasyon göstermiş, üremelerde ve siderofor üretiminde belirgin bir artış gözlenmiştir. Kobalt içeren ortamlarda üreme artarken siderofor üretimi de artmıştır. Benzer bir şekilde Yuqiang ve arladaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada desferrioxamine B türü bir siderofor kobalt ile güçlü bir kompleks oluşturmuş ve kobalt metalinin mobilizasyonu artmıştır.

Nikel bakteriler için oldukça önemli olan bir metaldir. Nikel elementinin gastrik *Helicobacter* türleri için, önemli olduğu ve üreaz ve hidrojenaz enzimleri için kofaktör görevi gördüğü bilinmektedir. Ayrıca nikelin enerji üretiminde de rolü vardır [Olson and Maier, 2002], [Stingl and De Reuse, 2005]. Nikel elementi ile yaptığımız çalışmalarda kontrol dışında kullanılan konsantrasyonlar 0.5, 1, 1.5 mM olarak belirlenmiştir. Ni çalışmalarında da yine en yüksek siderofor yüzdeleri 72. saatte elde edilmiştir (%22.9). Nikel içeren kültürlerde siderofor üretimi kontrol gruplarını aşmamıştır. Buna karşın siderofor üretiminin 0.1 ve 0.3 mM kobalt içeren kültürlerde, kobalt içermeyen kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Nikel elementinin sideroforlar aracılığıyla hücre içine alınabildiğine dair

daha önce *Helycobacter pylori* ile yapılan bir çalışmada, bakterinin siderofor vasıtasıyla özel dışsal ve içsel membran proetinleri sayesinde nikeli hücre içine alabildiği gösterilmiştir [Schauer et al.,2007].

Hg biyolojik olarak fonksiyon göstermeyen bir metaldir, metabolik faaliyetlere katılmaz ve çok düşük konsantrasyonlarda toksik etki yaratmaktadır. Cıva ile yapılan çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar 5, 10, 15 µM olarak belirlenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda cıva içeren kültürlerde, hücre büyümesi genel olarak baskılanmıştır. Cıvanın siderofor üretimi üzerindeki etkisini incelediğimizde 24. saatte siderofor üretimi cıva içermeyen kontrol gruplarında çeşitli cıva konsantrasyonları içeren kültürlere oranla yüksek seviyede gözlenmiştir (%33.9). Buna karşın siderofor üretimi 5 µM cıva konsantrasyonu içeren kültürlerde 24. saatten sonra kontrol grubuna oranla artış göstermiştir (% 46.6). 48. ve 72. saatlerde siderofor üretimleri % 47.1 ve % 46.6 seviyesine erişmiştir. Metallerle yaptığımız çalışmalar içerisinde en yüksek siderofor üretimi kontrol grubu dâhil cıva varlığında (5 µM) gözlemlenmiştir. Bu tip bir sonuca daha önce kadmiyum ile yapılmış bir çalışmada ulaşılmıştır [Sangram et al., 2008]. Sangram ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1.75 mM kadmiyum varlığında maksimum siderofor üretimi elde edilmiştir.

Çalışmamız esnasında da yüksek konsantrasyonlardaki ağır metallerin siderofor üretimini olumsuz etkilediğini belirledik. Bununla birlikte çalışma sonucunda genellikle kontrole yakın konsantrasyonların siderofor üretimini pozitif yönde etkilediği sonucu ortaya çıkmıştır. Yukarıda siderofor yüzdelerine olan etkileri değerlendirilen Fe dışındaki 3 ağır metalinde toksik etki yarattığı bilinmektedir. Bu üç ağır metal de bakteri üremesini baskılamıştır. Bütün gruplarda 1 haftalık üreme periyotlarından sonra siderofor ölçümleri alındığında siderofor yüzdeleri 72. saattekine çok yakın elde edilmiş üreme aktiviteleri oldukça azalmış ve bütün gruplarda birbirine yakın üreme aktivitesi gözlenmiştir. 72. saatin seçilmesi ilerleyen zamanlarda siderofor yüzdesinde kayda değer bir değişim görülememesinden kaynaklanmıştır.

Brevibacillus laterosporus hücrelerinde siderofor üretimine paralel olarak ile kompleks oluşturması sonucu hücre besiyerindeki cıva oranının azalması beklenmektedir. Hücre besiyerindeki cıvanın siderofor tarafından uzaklaştırıldığını desteklemek amacıyla optik emisyon spektrokopisi kullanılarak farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda ortamdaki cıva miktarlarının ölçümü yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarına göre; bakteri kültürlerin en yüksek cıva kazanımı siderofor üretimin de maksimum olduğu 48. saate olduğu saptanmıştır. Farklı cıva konsantrasyonlarında

48. saatte en yüksek cıva alınımına baktığımızda en yüksek cıva absorbsiyonu yine maksimum siderofor üretiminin gözlendiği 5 µM Hg konsantrasyonunda (% 40) gözlenmiştir. Her ne kadar başka tip mekanizmalarlar yardımıyla da cıvanın hücre içine alınabileceği bilinse de çalışma sonucunda siderofor yüzdesinin arttığı konsantrasyonda cıvanın süpernatantta azaldığının ortaya konulması önemli bir sonuçtur.

KAYNAKLAR

Abdallah M., (1991), “Pyoverdins and Pseudobactins”, CRC Press, 576, 139-154.

Abergel R. J., Zawadzka A. M., Hoette T. M., Raymond K. N., (2009), “Enzymatic hydrolysis of trilactone siderophores: where chiral recognition occurs in Enterobactin and Bacillibactin ıron transport”, Journal of American Chemical Society, 131 (35), 12682-12692.

Ackerley D. F., Caradoc-Davies T. T., Lamont I. L., (2003), “Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from Pseudomonas aeruginosa”, Journal of Bacteriology, 185, 2848-2855.

Almeida W. L. C., Vitor D. N., Pereira M. R. G., de Sá, D. S., Alvarez L. D. G., Pinheiro A. M., Costa S. L., Costa M. F. D., Rocha Z. N., El-Bachá R. S., (2007), “Redox properties of ruthenium complex with catechol are involved in toxicity to glial cells”, Journal of the Chilean Chemical Society 52, 1240-1243.

Ankenbauer R., Sriyosachati S., Cox C. D. (1985), “Effects of siderophores on the growth of Pseudomonas aeruginosa in human serum and transferrin”, Infection and Immunity 49, 132-140

Arnow L. E., (1937), “Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures”, The Journal of Biological Chemistry, 118, 531-537.

Bagg A., Neilands J. B., (1987), “Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli”, Biochemistry, 26, 5471-5477.

Bailey L., (1963), “Infectous disease of honey- bee”, 1st Edition, Land Books Limited.

Barekzi N., Joshi S., Irwin S., Ontl T., Schweizer H. P., (2004), “Genetic characterization of pcpS, encoding the multifunctional phosphopantetheinyl transferase of Pseudomonas aeruginosa”, Microbiology, 150, 795-803.

Bobrov A. G., Geoffroy V. A., Perry R. D., (2002), “Yersiniabactin production requires the thioesterase domain of HMWP2 and YbtD, a putative phosphopantetheinylate transferase”, Infection and Immunity, 70, 4204-4214.

Braud A., Geoffroy V., Hoegy F., Mislin G. L. A., Schalk I. J., (2010), “The siderophores pyoverdine and pyochelin are involved in Pseudomonas aeruginosa resistence against metals: Another biological function of these two siderophores”, Environmental Microbiology Report, 2 (3), 419–425.

Braud A., Hannauer M., Milsin G. L. A., Schalk I. J., (2009), “The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity”, Journal of Bacteriology, 191**,** 5317–5325.

Brunke M., (1993), “Microbial retention of Mercury from waste streams in a laboratory column containing mer A gene bacteria”, FEMS Microbiology Reviews, 11, 145-152.

Bsat N., Herbig A., Casillas-Martinez L., Setlow P., Helmann J. D., (1998), “Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors”, Molecular Microbiology, 29, 189-198.

Challis G. L., (2005), “A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases”, Chembiochem, 6, 601-611.

Chen Y., Jurkewitch E., Bar-Ness E., Hadar Y., (1994), “Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals”, Soil Science Society of America Journal, 58, 390–396.

Chenault S. S., Earhart C. F., (1991), “Organization of genes encoding membrane proteins of the Escherichia coli ferrienterobactin permease”, Molecular Microbiology, 5, 1405– 1413.

Chu B. C., Garcia-Herrero A., Johanson T. H., Krewulak K. D., Lau C. K., Peacock R. S., (2010), “Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird’s eye view”, Biometals, 23, 601–611.

Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M. A., Brick P., (1997), “Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin”, Embo Journal, 16, 4174-4183.

Cracan V., Banerjee R., (2013), “Metal Ions in Life Sciences”, 12th Edition, Springer Netherlands.

Crosa J. H., Walsh C. T., (2002), “Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria”, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 223-249.

Csaky Z. T., (1948), “On the Estimation of Bound Hydroxylamine in Biological Materials”, Acta Chemica Scandinavica, 2, 450- 454

Cuiv P. O., Clarke P., Lynch D., O’Connell M., (2004), “Identification of rhtX and fptX, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by Sinorhizobium meliloti and pyochelin by Pseudomonas aeruginosa, respectively”, Journal of Bacteriology, 186, 2996–3005.

Dave B. P., Dube H. C., (2000), “Regulation of siderophore production by Fe(III) in certain fungi and fluorescent Pseudomonas”, Indian Journal of Experimental Biology, 38, 297-299.

De Lorenzo V., Giovannini F., Herrero M., Neilands J. B., (1988), “Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30”, Journal of Molecular Biology, 203, 875- 884.

Djibaoui R., Ahmed B., (2005), Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by Pseudomonas fluorescens”, African Journal of Biotechnology, 4, 697-702.

Duffus J. H., (2002), "Heavy metals a meaningless term?", Pure and Applied Chemistry, 74, 793-807.

Favret M. E, Yousten A. A. J., (1985) “Insecticidal activity of Bacillus laterosporus”, Invertebrate Pathology, 45 (2), 195-203.

Fiedler H. P., Krastel P., Müller J., Gebhardt K., Zeeck A., (2001), “Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by Streptomyces species”, FEMS Microbiology Letter, 196 (2), 147-151.

Fischbach M. A., Walsh, C. T., (2006), “Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms”, Chemical Reviews, 106, 3468-3496.

Fraenkel G. S., (1959), “The raison d'Etre of secondary plant substances”, Science, 129 (3361), 1466-1470.

Francis J., Madinaveitia J., Macturk H. M., Snow G. A., (1949), “Isolation from acid-fast bacteria of a growth factor for Mycobacterium johnei and of a precursor of Phthiocol”, Nature, 163, 365-366.

Glendinning K. J., Macaskie L. E., Brown N. L., (2005), “Mercury tolerance of thermophilic Bacillus sp. and Ureibacillus sp.”, Biotechnology Letters, 27 (21), 1657-62.

Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H., (1973), “Agriculture Handbook”, 1st Edition, Agricultural Research Service.

Hannauer M., Barda Y., Mislin G. L., Shanzer A., Schalk I. J., (2010), “The ferrichrome uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa involves an iron release mechansim with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome”, Journal of Bacteriology, 192, 1212–1220

Hernlem B. J., Vane L. M., Sayles G. D., (1996), “Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations”, Inorganic Chimica Acta, 244, 179–184.

Hersman L., Lloyd T., Sposito G., (1995), “Siderophore promoted dissolution of hematite”, Geochimica Cosmochimica Acta, 59, 3327–3330.

Hider R. C., Kong X., (2010), “Chemistry and biology of siderophores”, Natural Product Reports, 27, 637–657.

Kalinowski B. E., Liermann L. J., Givens S., Brantley S. L., (2000), “Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches”, Chemical Geology, 169, 357–370.

Keating T. A., Marshall C. G., Walsh C. T., Keating A. E., (2002), “The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains”, Natural Structural and Molecular Biology, 9, 522-526.

Koster W., Braun V., (1989), “Iron-hydroxamate transport into Escherichia coli K12: localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane”, Molecular Genetics and Genomics, 217, 233–239.

Kraemer S., M., (2006), “Siderophores in Plant Iron Acquisition: Geochemical Aspects”, Advances in Agronomy, 91, 1–46.

Kulkarni R. M., Srinikethan G., Vidyashetty K., (2013), “Prospects in Bioscience”, 1st Edition, Springer India.

Lankford C. E., (1973), “ Bacterial assimilation of iron”, Critical Reviews in Microbiology, 2, 273-331

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1982), “Molecular Cloning”, 3rd Edition, Cold Spring Harbor.

Matzanke B. F., Müller G. I., Raymond K. N., (1984), “Hydroxamate siderophore mediated iron uptake in E. coli: stereospecific recognition of ferric rhodotorulic acid”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 121**,** 922-930

May J. J., Wendrich T. M., Marahiel M. A., (2001), “The dhb operon of Bacillus subtilis encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester Bacillibactin”, Journal of Biological Chemistry, 276, 7209-7217.

May J. J., Kessler N., Marahiel M. A., Stubbs M. T., (2002), “Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A, 99, 12120-12125.

Meiwes J., Fiedler H. P., Haag H., Konetschny-Rapp S., Jung G., (1990), “Isolation and characterization of Staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from Staphylococcus hyicus DSM 20459”, FEMS Microbiology Letters, 67, 201-205.

Meneely K. M., (2007), “The Biochemistry of Siderophore Biosynthesis”, Phd Thesis, University of Kansas.

Meyer J. M., (2000), “Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species”, Archives of Microbiology, 174,135-142.

Michel L., Bachelard A., Reimmann C., (2007), “Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in Pseudomonas aeruginosa”, Microbiology, 153, 1508–1518.

Miethke M., Marahiel M. A., (2007), “Siderophore-based ıron acquisition and pathogen control”, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71, 413-451.

Nascimento A. M. A., Chartone-Souza E., (2003), “Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments”, Genetics and Molecular Research, 2 (1), 91-101.

Neilands J. B., (1995), “ Siderophores: Structure and function of microbial ıron transport compounds”, Journal of Biological Chemistry, 270, 26723-26726.

Neilands J. B., (1952). "A Crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (Ustilago sphaerogena)". Journal of American Chemical Society, 74 (19), 4846–4847.

Neilands J. B., (1982), “Microbial envelope proteins related to iron”, Annual Review of Microbiology, 36, 285–309.

Neubauer U., Nowack B., Furrer G., Schulin R., (2000), “Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B”, Environmental Science and Technology, 34, 2749–2755.

Noinaj N., Guillier M., Barnard T. J., Buchanan S. K., (2010), “TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function”, Annual Review of Microbiology, 64, 43-60.

Nomoto K., Sugiura Y., Takagi S., (1987), “Dynamic state of mugineic acid and analogous phytosiderophores in Fe- deficient barley”, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 10, 1003-1011.

Ochsner, U. A., Vasil A. I., Vasil M. L., (1995), “Role of the ferric uptake regulator of Pseudomonas aeruginosa in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters” Journal of Bacteriology, 177, 7194-7201.

Olson R., Sun Y., Horning M., Armstrong N., Mayer M., Gouaux E., (2002), Mechanism of glutamate receptor desensitization”, Nature, 417, 245-253.

Otto B. R., Verweij-van Vught A. M., MacLaren D. M., (1992), “Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria”, Critical Reviews in Microbiology, 18, 217- 233.

Payne S. M., (1988), “Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae”, Critical Reviews in Microbiology, 16 (2), 81–111.

Payne S. M., (1994), “Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores”, Methods in Enzymology, 235, 329-344.

Pollack J. R., Ames B. N., Neilands J. B., (1970), “Iron transport in Salmonella typhimurium: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin”, Journal of Bacteriology, 104(2), 635–639.

Poole K., McKay G. A., (2003), “Iron acquisition and its control in Pseudomonas aeruginosa: many roads lead to Rome”, Frontiers in Bioscience, 8, 661-686.

Quadri L. E., (2000), “Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases”, Molecular Microbiology, 37, 1-12.

Quadri L. E., Weinreb P. H., Lei M., Nakano M. M., Zuber P., Walsh C. T., (1998), “Characterization of Sfp, a Bacillus subtilis phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases”, Biochemistry, 37, 1585-1595.

Ranganathan A., Shruthi V. N., Thilagaraj R., (2008), “Heavy Metal Tolerance Of Bacillus Sp. Isolated From Lignite” Bachelor of Technology Thesis, SRM University.

Ratledge C., Laskin A. I., and Lechevalier H. A., (1982), “Mycobactins and Nocobactins in Handbook of Microbiology”, 2nd Edition, CRC Press.

Raymond K. N., Dertz E. A., Kim S. S., (2003), “Enterobactin: an archetype for microbial iron transport”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100, 3584–3588.

Rivers D. B., Vann C. N., Zimmack H. L., Dean D. H. J., (1991), “Mosquitocidal activity of Bacillus laterosporus”, Invertebrate Pathology, 58(3), 444-7.

Rombel I. T., McMorran B. J., Lamont I. L., (1995), “Identification of a DNA sequence motif required for expression of iron-regulated genes in pseudomonads”, Molecular Genetics and Genomics, 246, 519-528.

Samuni-Blank M., Izhaki I., Dearing M. D., Gerchman Y., Trabelcy B., Lotan A., Karasov W. H., Arad Z., (2012), “Intraspecific directed deterrence by the mustard oil bomb in a desert plant”, Current Biology, 22,1-3.

Sangram S., Mukherjee S. K., (2008), “Cadmium–Induced siderophore production by a high Cd-Resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization”, Current Microbiology, 56, 55–60.

Schalk I. J., Abdallah M. A., Pattus F., (2002), “Recycling of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin uptake and dissociation in Pseudomonas aeruginosa”, Biochemistry, 41, 1663–1671.

Schalk I. J., Hannauer M., Braud A., (2011), “New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance UMR7242”, Environmental Microbiology, 13 (11), 2844–2854.

Schauer K., Gouget, B., Carriere M., Labigne A., deReuse H., (2007), “Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ ExbD machinery”, Molecular Microbiology, 63, 1054–1068.

Scwyn B., Neilands J. B., (1987) “Universal chemical assay fort he detection and determination of siderophores” Analytical Biochemistry, 160, 47-56.

Shida O., (1996), “Proposal for Two New Genera, Brevibacillus gen. nov. and Aneurinibacillus gen. nov.”, International Journal of Systematic Bacteriology, 4, (46), 939-946.

Silver S., (1996), “Bacterial resistance to toxic metal ions” Gene, 179, (1), 9-10.

Smith M. J., Shoolery J. N., Schwyn B., Holden I., Neilands J. B., (1985), “Rhizobactin, a structurally novel siderophore from Rhizobium meliloti”, Journal of American Chemical Society, 107, 1739-1743.

Smith L. A., Means J. L., Chen A., Alleman B., Chapman C. C., Tixier J. S., Brauning S. E., Gavaskar A. R., Royer M. D., (1995), “Remedial Options for Metal-Contaminated Sites”, 1st Edition, Lewis Publishers.

Stephan U. W., Schmidke I., Stephan V. W., Scholz G., (1996), “The nicotianamine molecule is made to measure for complexation of metal micronutrients in plants” BioMetals, 9, 84-90.

Stingl K., De Reuse H., (2005), “Staying alive overdosed: how does Helicobacter pylori control urease activity?”, International Journal of Medical Microbiology, 295, 307–315.

Tailor A. J., Joshi B. H., (2012), “Characterization and optimization of siderophore production from Pseudomonas fluorescens strain isolated from sugarcane rhizosphere”, Journal of Environmental Research and Development, 6 (3), 688-694.

Thieken A., Winkelmann G., (1992), “Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes)”, FEMS Microbiology Letters, 94, 37-42.

Tseng T. T., Gratwick K. S., Kollman J., Park D., Nies D. H., Goffeau A., Saier M. H., (1999), “The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins”, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1, 107-125.

Valko M., Morris, H., Cronin M. T., (2005), “Metals, toxicity and oxidative stress.”, Current Medical Chemistry, 12, 1161–1208.

Wendenbaum S., Demange P., Dell A., Meyer J. M., Abdallah, M. A., (1983), “The Structure of Pyoverdine Pa, the Siderophore of Pseudomonas aeruginosa”, Tetrahedron Letters, 24, 4877-4880.

Williams K. M., Martin W. E., Smith J., Williams B. S., Garner, B. L., (2012), “Production of protocatechuic acid in Bacillus thuringiensis ATCC33679”, International Journal of Molecular Sciences, 13 (3), 3765-3772.

Williams J. W., Silver S., (1984), “Bacterial resistance and detoxification of heavy metals”, Enzyme and Microbial Technology, 6, 530-537.

Yılmaz E. İ., (2003), “Metal tolerance and biosorption capacity of Bacillus circulansstrain EB1.” Research in Microbiology, 154 (6), 409-415.

Yuqiang B., Hesterberg D. L., Duckworth O. W., (2010), “Siderophore- promoted dissolution of cobalt from hydroxide minerals”, Geochimica et Cosmochimica Acta, 74 (10), 2915-2925.

ÖZGEÇMİŞ

Bahadır AYDIN, 29 Ağustos 1986'da Giresun'da doğdu. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladıktan sonra Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstütüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ardından Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etti. Bahadır Aydın yüksek lisans eğitimini 2014 yılında tamamlamıştır.