



## Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması\*

Hurrem Turan AKKOYUN<sup>1✉</sup>, Nursel DOSTBİL<sup>2</sup>

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

2. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Van.

**Özet:** Bu çalışmada Na-tellurit bileşiğinin toprak bakterilerinden alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarında inhibitör etkisi araştırıldı. Bakteriler, Na-tellurit bileşiğine karşı 1-180 µg/ml artan konsantrasyonlarda denendi. Na-tellurit bileşiğinin 1-60 µg/ml konsantrasyonlardaki denemesinde izolatların çoğunluğunun ürediği gözlemlendi. 70-180 µg/ml olarak denenen konsantrasyonlarda ise hassasiyet profilinin arttığı saptandı. 180 µg/ml konsantrasyonlarda ise % 100 hassasiyet gözlemlendi. Ayrıca, izolatlar için MICs değeri 0.8 µg/ml olarak belirlendi. İzolatların Na-tellurit bileşiğine karşı plasmid kodlu dirençliliğinin saptanması için acridine orange (20 µg/ml) ve ethidium bromid ( $10^{-5}$  M) ile plasmid eliminasyonu yapıldı. İzolatlar'da *Bacillus spp.*'ye ait % 60.86 Na-tellurit bileşiğine hassasiyet, % 39.13 dirençlilik fenomeni ve % 21.10 oranında da plasmid kodlu Na-tellurit dirençliliği bulundu. Na-tellurit bileşiğine ve antibiyotiğe karşı dirençlilik genini taşıyan plasmidler (*B. cereus* T112-Na-Te<sup>R</sup>), Na-tellurit bileşiğine ve antibiyotiğe hassasiyet gösteren suşa (*B. megaterium* DSM 32-Na-Te<sup>S</sup>) protoplast transformasyonu yoluyla aktarıldı ve  $10^8$  transformant elde edildi. Agaroz jel elektroforez seperasyonu sonucunda plasmidin 22.514 bp moleküler ağırlığa sahip olduğu saptandı.

**Anahtar kelimeler:** Alkalifilik *Bacillus spp.*, Na-tellurite, Plasmid, Protoplast transformasyonu.

### Investigations upon the Likelihood of Transformation and Resistance of Na-Tellurite Originated Plasmide at the Soil Bacteria Isolated from Natural Environment

**Absrtact:** In this study, the inhibitory effects of Na-tellurit compound at the Alkalophilic *Bacillus spp.* strains isolated from the soil bacteria were investigated. Bacteria were tested against the increasing concentrations of Na-tellurite at 1-180 µg/ml. The isolates of Na-tellurite at the 1-60 µg/ml concentrations mostly showed resistance, but sensitivity was determined at 70-180 µg/ml. Complete (100 %) sensitivity was observed at 180 µg/ml. For *Bacillus spp.*, the MICs of Na-tellurit were found to be 0.8 µg. Plasmid elimination was made using acridine orange (20 µg/ml) and ethidium bromide ( $10^{-5}$  M) for determination of the isolate resistance originated from plasmid against Na-tellurite. In the isolates of *Bacillus spp.*, there were 60.86 % sensitivity, 39.13 % resistance phenomenon and 21.10 % ratio of resistance originated from plasmid against Na-tellurite. Plasmids of *B. cereus* T112-Na-Te<sup>R</sup>, carrying the resistance gene against the antibiotic and Na-tellurite, were transferred by protoplast transformation to *B. megaterium* DSM 32-Na-Te<sup>S</sup> strain showing sensitivity against antibiotic and Na-tellurit. A number of  $10^8$  transformants from the soil isolates were obtained by protoplast transformation. The seperation of plasmid was made by agarous gel electrophoresis and, finally it was determined that the plasmid had 22,514 bp of molecular weight.

**Key words:** Alkalophilic *Bacillus spp.*, Na-tellurite, Plasmide, Protoplast transformation.

✉ Hurrem Turan AKKOYUN

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, e-posta: takkoyun@hotmail.com

\*Bu çalışma Hurrem Turan AKKOYUN'ın "Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

## GİRİŞ

Günümüzde kimyasal maddeler ve beraberinde getirdiği olumsuz etkileri sağlığı tehdit edici boyutlara kadar ulaşmıştır. Toksik etkiye sahip olan kimyasal maddelerle ve çevre kirliliğinin daha üst boyutlara kadar ulaşması, ekolojik anlamda denge unsurunun ortadan kalkması ile birlikte birbirine zincirleme bağlı olan biyotik ve abiyotik faktörlerin bozulması anlamına gelmektedir.

Tellurium bileşiğinin mikroorganizmaların yaşam periyodu için mutlak gerekli bir besin kaynağı olmadığı ancak kısmen de olsa, kimyevi atık maddelerin bulunduğu ortamlarda kirlilik oluşturduğu bilinmektedir. Nadirde olsa organizmalar için toksik bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Berks ve ark., 1994; Taylor, 1996). Klinik bulgulara göre toksisitenin çok düşük konsantrasyonda bile meydana geldiği gözlenmiştir (Jobling ve Ritchie, 1987). Tellurit ve bileşiklerine karşı gerek kromozomal, gerekse ekstra kromozomal dirençliliğin moleküler mekanizması bilinmemektedir. Ancak Gram negatif bakterilerde Gram pozitif bakterilere göre tellurit dirençliliğinin daha sık olduğu gözlenmiştir (Summers ve Jacoby, 1977; Lloyd-Jones ve ark., 1994; Suzina ve ark., 1995; Turner ve ark., 1995). Yapılan bir çalışmada, Tellurium bileşiğinin elektrolitik indirgenme sonucu elde edildiğini ve  $\text{Na}_2\text{TeO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Te} + 2\text{NaOH} + \text{O}_2$  şeklinde formüle edildiğini vurgulamışlardır. Obligat aerobik fotosentetik bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada ise bakteri suşlarının tellurite direnç gösterdiklerini ve metalik tellurium kristallerini de biriktirdikleri gözlenmiştir (Yurkov ve ark., 1996). Romero ve ark., (1998) yaptıkları bir çalışmada potansiyel olarak çevresel atıkların bulunduğu ortamlarda toksisite gösteren potasyum tellurit bileşiğine karşı direnç sağlanması, *Pseudomonas sp.* suşlarının genetik manipulasyonları sırasında plasmidlerin vektör olarak kullanımı için, selektif bir marker özelliğinde olan ve önemli bir görev yapan genlerin var olduğuna işaret etmişlerdir. Taylor (1999), yaptığı bir çalışmada *E. coli* suşları için Na-tellurit bileşiğinin

yaklaşık MIC değerinin 1 µg/ml olduğunu belirtmiştir. İzolatların tellurite dirençliliklerinin kaydedilerek daha yüksek konsantrasyonlardaki denemelerinin devam ettiğini vurgulamıştır. Mikroorganizmalarda tellurium bileşiğine karşı dirençli suşlar araştırılırken hem kromozomal DNA'ya hem de ekstra-kromozomal DNA'ya bağlı dirençlilik geni taşıyan *E. coli* suşu tanımlamıştır. Bu olayda integral membran proteinlerinin de rol oynadığını gözlemişlerdir. Tellurit bileşiğinin bulunduğu ortamlarda, üreme davranışı gösteren bakteri hücrelerinde siyah renklenme gözükür. Bu hücre içi biriktirme olayı, metalik telluriumdeki telluritin indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak mikroorganizmalarda bu şekilde meydana gelen biriktirme elektron mikroskopuyla tespit edilebilmektedir (Guzzo ve Dubow, 2000). Endüstriyel suşların manipulasyonu, üremesi ve diğer türlerde farklı kaynaklardan gelen genetik materyalin belirlenmesi mikrobiyoloji teknolojisinin günümüzde ve gelecekte gelişmesi için çalışılması gereken konuların başında gelmektedir.

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojileri arasında önemli yer tutan ve verim açısından ön planda olan transformasyon metoduyla yeni bakteriyel rekombinantların ve selektif marker özelliği taşıyan suşların üretimi amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve METOT

Alkalifilik *B. spp.* suşlarının topraktan izolasyonlarında ve saf kültür olarak seçilmiş suşların stok kültürlerinin hazırlanmasında, Nutrient agar, LB agar, N1 besi yeri ve Medium 1 agar kullanılmıştır (Anonymous, 1978; Horikoshi ve Akiba, 1982; Gerhardt ve ark., 1994).

Sodyum tellurit dirençliliği gösteren *B. spp.* için bir dizi hareket, glukozdan gaz oluşumu, mannitolden gaz oluşumu, yüzey zarı oluşturma, uçucu indol oluşumu, voges-proskauer testi, simmons-sitrat testi, hemoliz testi, katalaz testi, lesitin hidrolizi testi, ürenin hidrolizi, jelatinin

hidrolizi, nişastanın hidrolizi, kazeinin hidrolizi, bir dizi karakteristik testler uygulanmıştır (Jin ve ark., 1990; Mc Faddin, 2000). Na-tellurit bileşiğinden öncelikle 25 mg/ml konsantrasyonda stok bir çözelti hazırlandı. Daha sonra 0.45 µm çaplı milipore filtreden geçirilerek steril edildi. Çalışmada Na-tellurit bileşiği maksimum 180 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı ve sterilizasyondan sonra besi yerine eklendi. Çalışmada Na-tellurit bileşiğinin MICs değerinin araştırılması Turner ve ark., (1995)' na göre yapıldı. Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarından plasmid izolasyonu alkali lizi yöntemi ve ekstrakromozomal DNA moleküllerinin seperasyonu Maniatis ve ark., (1982)'na göre yapılmıştır. Çalışmada, protoplast transformasyonu metodu Sanders ve Nicholson (1987)' a göre yapılmıştır.

## SONUÇ

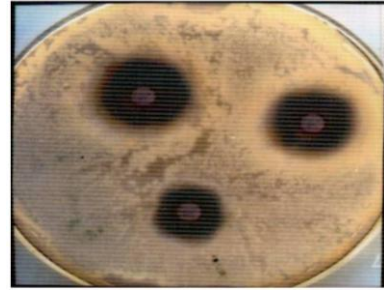
### Toprakta İzole Edilen Alkalifilik *Bacillus spp.* Bakterilerine Ait Bulgular

Doğal ortamlardan alınan toprak örneklerinden toplam 787 alkalifilik *Bacillus spp.* suşu izole edilmiştir. 479 adet bakteri suşunun Na-tellurit bileşiğine % 60.86 oranında hassas olduğu tespit edilmiştir. Toplam 308 bakteri suşunun ise uygulanan Na-tellurit bileşiğine % 39.13 oranında dirençli olduğu gözlenmiştir. İzolatlar arasında ise toplam 65 suşun % 21.10 plasmid kodlu dirençlilik taşıdıkları test edilmiştir.

Çalışmada plasmid kökenli dirençlilik geni taşıyan test suşlarına 178 µg/ml konsantrasyonda denenen Na-tellurit bileşiğinden 30 µl Watmann: 1.6 mm çaplı kağıt disklere emdirilerek disk diffüzyon metodu uygulanmıştır. Uygulama sonucunda inhibisyon zonları gözlenmiştir (Şekil 1).

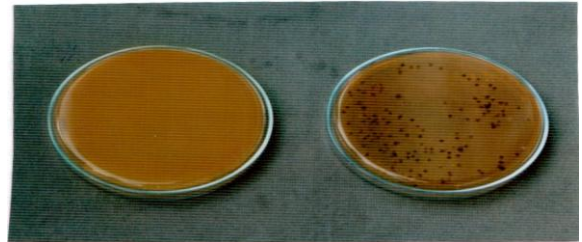
Protoplast transformasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen transformasyon çalışmasında Na-tellurit bileşiğine plasmid kodlu dirençlilik geni taşıyan ve donör olarak seçilen *Bacillus cereus* T112 bakterisi kullanılmıştır.

Aynı şekilde Na-tellurit bileşiğine hassasiyet gösteren standart *B. megaterium* DSM 32 suşu alıcı olarak kullanılmıştır. Transformasyondan sonra resipient olarak kullanılan *Bacillus megaterium* DSM 32 suşunun Ethidium bromid ile muamele edilmesiyle Na-tellurit bileşiğine hassasiyet göstermiştir. Bu durumda transformantlardaki Na-tellurit dirençliliğinin plasmid kodlu olduğunu göstermektedir.



**Şekil 1.** Besi ortamında alkalifilik *Bacillus cereus* T112 ve *Bacillus spp.* suşlarının Na-tellurit bileşiğine bağlı olarak disk diffüzyon metodu ile gösterdiği inhibisyon zonları.

**Figure 1.** Depending on the strains of Na-Tellurite compound shown by the method of disc diffusion inhibition zones alkaliphilic *Bacillus cereus* and *Bacillus spp* in fattening T112.



**Şekil 2.** *Bacillus cereus* T112 suşunun protoplast transformasyon tekniğine göre gerçekleştirilmiş transformasyon bulguları.

**Figure 2.** Protoplast transformation technique carried out according to the transformation of *Bacillus cereus* strain T112 findings.

Elektroforez işleminde % 0.8'lik agaroz ve 5 V/cm akım uygulanmıştır. Jelde örnek yükleme slotlarına 25 µl DNA sükröz karışımı konmuştur. 1 numaralı sütunda EcoRI ve HindIII restriksiyon

enzimleriyle kesilmiş lamda DNA'sı bulunmaktadır. 2 numaralı sütunda alıcı suş: *Bacillus megaterium* DSM 32, 3 numaralı sütunda ise verici suş: *Bacillus cereus* T112 bulunmaktadır.



**Şekil 3.** Transformasyonda kullanılan verici ve transformant suşlara ait elektroforez bulguları.

**Figure 3.** Donor and transformant strains used in the transformation of the electrophoresis results.

Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarının Na-tellurit bileşiğine muamelesinde MICs değeri ve 0.8 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan transformasyon çalışması sonucunda bakteride  $8 \times 10^6$  transformant frekansı elde edilmiştir.

## TARTIŞMA

Günümüzde kimyasal maddeler ve beraberinde getirdiği olumsuz etkiler canlı sağlığını tehdit edici boyutlara ulaşmıştır. Toksik etkili kimyasal maddelerle ve çevre kirliliğinin daha üst boyutlara kadar varmış olması, ekolojik anlamda denge unsurunun ortadan kalkması ile birlikte birbirine zincirleme bağlı olan biyotik ve abiyotik faktörlerin bozulması anlamına gelmektedir.

Özellikle toprakta Gram (+) *Bacillus* cinsi bakteriler, toprağın doğal fauna grubunu oluşturması nedeniyle çevresel koşullardan en üst düzeyde etkilenen grup içerisine girmektedir. *B. steirotomophilus*, *B. Subtilis* ve *B. cereus* gibi bakteriler toprak bakterileri içerisinde sayılmaktadır (Robson ve Chambliss., 1984). *Bacillus spp.* suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü genellikle çevresel faktörlerle değişir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin değişmesi ile kültürün kendisinde de bir takım

değişiklikler olur. Yalnızca küçük koloni formlarını suşların dışında koloni çapı, besi yeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Lennete ve ark., 1985). Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarının izolasyonunda mukoid, kuru hareketli olduğu gözlenmiştir. Alınan toprak örneklerinin farklı yerlerden olması denemelerimizde alınan sonuçların farklı düzeylere çekmiştir. *S. faecalis* ve *Enterococcus* suşları arasında plasmid kodlu tellurit dirençliliği gözlenirken *S. faecium* türlerinde plasmid kodlu tellurit dirençliliği bulunamamıştır (Summers ve Jacoby, 1977).

Çalışmamızda *Bacillus* türlerinin bir kısmının plasmid kodlu dirençlilik geni taşıdığı bir kısmının ise taşımadığı gözlenmiştir. Ayrıca plasmid çalışmalarında bakteri hücrelerinden yüksek saflıkta alkalik ekstraksiyon yöntemiyle plasmid DNA'sının izolasyonu için bir prosedür geliştirmişlerdir (Marko ve ark., 1981). Çalışmada *Bacillus cereus* T112 suşundan alkali lizi yöntemiyle plasmid ekstraksiyonu yapılmıştır. *E. coli* suşları için sodyum tellurit bileşiğinin yaklaşık olarak MIC 1 µg/ml olduğu belirlenmiştir. İzolatların tellurite dirençlilikleri kaydedilerek (Taylor, 1999) daha yüksek konsantrasyonlardaki denemeler devam etmektedir. Ancak tellurit dirençliliği ile ilgili çalışmalarda bir çok mikroorganizmada dirençliliğin kromozomal DNA (Chiong ve ark., 1988; Chiong ve ark., 1988; Kinkle ve ark., 1994; O'Gara ve ark., 1997) ya da plasmid üzerinde olduğu vurgulanmıştır. Plasmid kodlu dirençlilik mikroorganizmalarda nadiren görülmektedir. Yaptığımız çalışmada izolatların MICs değeri Na-tellurit bileşiği için 0.8 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Toplam *Bacillus sp.* suşlarının (% 21.10) Na-tellurit bileşiğine plasmid kodlu direnç geni taşıdığı gözlenmiştir. Dirençli izolatlar arasında bir kısmının plasmid kodlu dirençliliğin yanı sıra diğerlerinde kromozomal dirençlilik paralelinde olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla yapılan çalışma, literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda 1-180 µg/ml arasındaki parametelerde Na-tellurit bileşiğinin kullanılması, literatüre göre birçok mikroorga-

nizma türü için oldukça toksik bir etkinin olduğu belirtilirken çalışmada kullanılan *Bacillus cereus* T112 yerel suşunun genetik açıdan farklı özellik taşıyan bir yapıda olduğu düşünülmektedir.

Bakterilere kromozomal ya da ekstra-kromozomal DNA'nın verilmesi, farklı genetik özelliği olan genlerin diğer mikroorganizmalara kazandırılması, bu mikroorganizmaların kimyasal yapısının daha kolay incelenmesine aracılık eder. Osmotik stabilitenin varlığında lizozim yardımıyla hücre duvarının parçalanıp bakteri hücresinden ayrılmasıyla protoplast elde edilebilir. Bu teknik sadece birbiri ile ilişkili olan türler arasında vaki olmadığı için rekombinasyon gerçekleşir. Ancak bu teknik aralarında ilişki olmayan türlerde uygulanmakta endüstriyel suşların geliştirilmesinde ve üretilmesinde çok büyük imkan sağlamaktadır (Gökhale ve ark., 1993).

Çalışmada transformasyon verimini arttırmak için rejenerasyon besi ortamlarında transforme bakterilerin tekrar üremesine olanak sağlanmıştır. Ancak bunun için % 16 sorbitol veya % 20 sükröz çözeltisi kullanılmıştır. Bu şekilde transformant bakterilerin yeni rekombinasyonu meydana getirdiği gözlenmiştir.

Tellurium bileşiğinin mikroorganizmaların yaşam periyodu için mutlak gerekli bir besin kaynağı olmadığı ancak relativ olarak kimyevi atık maddelerin bulunduğu ortamlarda kirlilik oluşturduğu bilinmektedir. Ekstrem olarak da organizmalar için toksik bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Berks ve ark., 1994; Taylor, 1996). Klinik bulgulara göre toksisitenin çok düşük konsantrasyonda bile meydana geldiği gözlenmiştir (Jobling ve Ritchie., 1987).

Çalışmada Na-tellurit bileşiğinin konsantrasyonu yükseldikçe mikroorganizma üzerinde inhibitör etki artmıştır. Dolayısıyla 180 µg/ml Na-tellurit kullanılması denenen test suşlarının tamamının çoğalma davranışı göstermediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmada protoplast transformasyon

metodunun kullanılmasının nedeni transformant veriminin diğer metotlara göre daha yüksek bulunmasına dayanmaktadır. Bu bağlamda, endüstriyel atıklarla veya toksisiteye sahip kimyasal maddelerle kirlenmiş çevrelerde Na-tellurit düşük konsantrasyonda bile bulunması mikroorganizmada akümülyasyon olayını meydana getirmektedir. Mutant hale gelmiş canlılar arasında spontan olarak transformasyon oluşabileceği gibi toprak faunasının ekolojik dengenin bozulması ile birlikte insan sağlığını da tehdit edici bir unsur olacaktır.

Sonuç olarak toprak bakterilerinin morfolojik, fizyolojik, kimyasal ve biyokimyasal testleri yapıldığında yabancı tip yapılarının dışında beklenmeyen sonuçların oluştuğu ve mutajen etkiye maruz kaldıkları düşünülmektedir. Kimyasal maddelerin etkileri incelendiğinde artan dozlarda toprağın yapısında normal fauna olarak kabul edilen bakterilerin yaşam frekansını düşürdükleri ve toprakta birikim oluşturdıkları gibi canlıların bu bağlamda yaşam şansını minimuma çekmektedir. Metal bileşikleriyle yapılan çalışmalar doğada biyotik faktörler üzerine hangi düzeylerde etki ettiği yönünde bir ipucu verecektir. Çalışma, rekombinasyon çalışmaları alanında özellikle plasmid DNA yapılarının transfer edilerek resipient organizmalarda aktivite göstermelerini başarmış olması nedeniyle bu konuda yapılacak çalışmalar için verimli bir kaynak olması düşünülmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalara bir basamak oluşturacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 1978. *Microbiyologisches Handbuch E.*, Merck Darmstad
- Berks BC., Ricardson DJ., Robinson C., Reilly A., Aplin RT., Ferguson SJ., 1994. Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *thiosphaera pantotropha eur.* J. Biochem., 220, 117-124.

- Chiong M., Bara R., Gonzales E., Vazquez C., 1988. Resistance of thermus sp. To potassium tellurite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 610-612.
- Breadly DE., 1985. Detection of tellurite-resistance determinants in incp plasmid. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3135-3137.
- Gerhardt HC., 1994. The evolution of the vocalization in frogs and toads. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25, 293-324.
- Gökhale DV., Puntambekar US., De Obagkart DN., 1993. Protoplast fusion, A tool intergeneric gene transfer in bacteria. *Biotech. Adv.*, 111, 1999-217.
- Guzzo J., Dubow MS., 2000. A novel selenite and tellurite inducible gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4972-4978.
- Horikoshi K., Akiba T., 1982. *Alkalophilic Microorganisms*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. pp. 213.
- Jin DI., Petters RM., Im KS., 1994. Transgenic Livestock – Review. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, 7, 1-17.
- Jobling MG., Ritchie DA., 1987. Genetic and physiological analysis of plasmid genes expressing inducible resistance of tellurite in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 208, 288-293.
- Kinkle BK., Sadowski MJ., Johnstone K., Koskinen WC., 1994. Tellurium and selenium resistance in rhizobia and its potential use for direct isolation of rhizobium meliloti from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1674-1677.
- Lloyd-Jones G., Osborn AM., Ritchie DA., Strike P., Hobman JL., Brown NL., Rouch DA., 1994. Accumulation and intracellular fate of tellurite in tellurite resistant *E. coli*, A model for the mechanism of resistance. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 118, 113-120.
- Macfaddin JF., 2000. Hydrogen sulfide test. Chapter 15, *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd edition), Lippencott, Williams and Wilkins. Philadelphia, 205–220.
- Makro MA., Chipperfield R., Birnboim HC., 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Environ. Biochemistry*, 121, 182-187.
- Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J., 1982. *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor, New York, USA., 379.
- Ogara JP., Gomelsky M., Kaplan S., 1995. Identification and molecular genetic analysis of multiple loci contributing to high-level tellurite resistance, in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4713-4720.
- Robson LM., Chambliss GH., 1984. Characterization of the cellulolytic activity of bacillus isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1039-1046.
- Romero MS., Orejas RD., Lorenzo V., 1998. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulation of *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4040-4046.
- Sanders ME., Nicholson A., 1987. A method for genetic transformation of nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1730-1736.
- Summers AO., Jacoby GA., 1977. Plasmid-determined resistance to tellurium compounds. *J. Bacteriol.*, 129, 276-281.
- Suzina NE., Duda VI., Anisimova LA., Dmitriev VV., Boronin AM., 1995. Cytological aspects of resistance to potassium tellurite conferred on *Pseudomonas* cells by plasmids. *Arch. Microbiol.*, 163, 282-285.
- Taylor DE., Summers AO., 1979. Association of tellurium resistance and bacteriophage inhibition conferred by R plasmids. *J. Bacteriol.*, 137, 1430-1433.
- Taylor A., 1996. *Biochemistry of tellurium biology*. Trace Elementary Residual., 55, 231-239.
- Taylor DE., 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiology*, 7, 111-115.
- Turner RJ., Weiner JH., Taylor DE., 1995. The tellurite resistance determinants *tehA* and *klaA* have different biochemical requirements. *Microbiology*, 141, 3133-3140.
- Yurkov V., Jappe J., Vermeglio A., 1996. Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiology*, 62, 4195-4198.