

Krom'un *Deinococcus radiodurans* ve Rekombinantlarına Etkisi

Elif ÖZBEY¹ Dilek ASMA^{1*}

ÖZET: Ağır metaller düşük konsantrasyonlarda bulunmaları durumunda bile canlı organizmalar için toksik etkiye sahip olabilirler. Canlı metabolizmasında önemli bir yeri olan krom, genellikle Cr (III) formunda bulunmaktadır. Cr (VI) ise endüstriyel faaliyetler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle bu maddeleri daha zararsız bileşiklere çevirmek için gerekli olan genetik bilgiye sahip bakteri türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği anlaşılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, yabanıl *Deinococcus radiodurans* ile *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) geni klonlanmış rekombinantı ve kontrol olarak da *vgb*⁻ rekombinant suşu kullanılmıştır. Bu sayede *D. radiodurans* ve rekombinantlarının üreme potansiyelleri üzerine Cr'un etkisi araştırılarak bakterilerin metal uygulaması öncesi ve sonrası morfolojik değişimleri SEM fotoğrafları ile saptanmıştır. Bunlara ek olarak bakteriye daha fazla oksijenli ortam sağlayan *vgb* geninin, bakterinin üreme yeteneğine yapacağı katkı araştırılmıştır. Çalışmamızın sonunda, bakterilerin üreme potansiyelleri üzerinde *vgb* geninin bakteriye daha fazla oksijenli ortam yaratıp daha fazla üremesini sağlayarak meydana getirdiği olumlu etkiler gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Deinococcus radiodurans*, krom (Cr), *Vitreoscilla* hemoglobin.

The Effect of Chrome on *Deinococcus radiodurans* and Recombinants

ABSTRACT: Heavy metals can have toxic effects on living organisms even in low concentrations. Having an important place in the living metabolism, the chromium is generally in Cr (III) form. As per the Cr (VI), it emerges as a result of industrial activities. In recent years, intensive research studies have been conducted about heavy metals causing serious environmental problems and detoxification of xenobiotics. It is appeared that the bacteria species, which are equipped with genetic information necessary for breaking down particularly these substances into less harmful compounds, can be an alternative area of use. In our study, we used cloned recombinant *Vitreoscilla* hemoglobin (*vgb*) gene with wild *Deinococcus radiodurans* and *vgb*⁻ recombinant strain as control. By this means, the effect of Cr on the reproductive potential of *D. radiodurans* and its recombinants were examined. The morphological changes of the bacteria before and after the metal application were detected through SEM photos. In addition to these, the contribution of *vgb* gene, which provides a more aerobic (oxygenated) environment for the bacteria, was examined. As the conclusion of our study, positive effects of *vgb* genes on the reproductive potentials of the bacteria were observed, which ensured a higher reproduction rate through providing a more oxygenated environment for the bacteria.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, chromium (Cr), *Vitreoscilla* hemoglobin.

¹ Elif ÖZBEY (Orcid ID: 0000-0001-7215-1922), Dilek ASMA (Orcid ID: 0000-0002-3866-3016), İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, Türkiye

*Sorumlu Yazar: Dilek ASMA, e-mail: dilekasma@inonu.edu.tr

* Bu çalışma Elif ÖZBEY'in Doktora tezinin bir bölümüdür. Makalenin bir bölümü 23-27 Haziran 2014 tarihinde Eskişehir'de düzenlenen 22.Ulusal Biyoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Sucul ekosistemler için en büyük tehlike endüstriyel atık sularındaki ağır metal kirliliğidir. Endüstriyel aktivitelerinin artması çevredeki ağır metallerin de hızla artışına yol açmaktadır. Ağır metaller çevreye, hayvanlara, insanlara ve mikroorganizmalara ciddi toksik etkilerde bulunmaktadır. Metaller diğer toksik kirleticilerden farklı olarak biyolojik parçalanmaya dayanıklıdır ve canlı dokular içerisinde birikebilir ve sonuç olarak da besin zincirinde yoğun olarak bulunabilirler. Metallerin toksik etkileri, her metalin özelliğine göre değişmektedir. Metallerin oksidasyon basamağı ve bileşik durumları da toksik etkilerini değiştirmektedir. Örneğin Cr^{6+} bileşiklerinin Cr^{3+} den daha toksik olduğu bilinmektedir. Birçok metal canlılar için esansiyel olmalarına rağmen, vanadyum, krom, mangan, demir, kobalt, bakır, molibden ve çinko gibi bazıları da, çeşitli fonksiyonlar için gerekli eser elementlerdir. Bu metallerin yetersiz olduklarında olduğu gibi, fazla miktarlarda alındıklarında da homeostazı bozarak zararlı etki yapmaktadır (Bruins ve ark., 2000; Ceribasi ve Yetis, 2001).

Metaller, mikroorganizmaların hücre membranını ve sitoplazmasını olumsuz yönde etkileyerek, metabolizmada sorunlara neden olurlar. Transkripsiyon ve translasyonun inhibisyonu, DNA'nın ve hücre zarının bozulması, hücre bölünmesinin durması ve protein denatürasyonu gibi metabolik bozulmalara neden olurlar (Nies, 1999; Bruins ve ark., 2000) Atık sularındaki ağır metallerin uzaklaştırılmasında çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ancak bu yöntemler, reaktif ihtiyacının fazlalığı ve toksik çamur üretimi gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, ağır metallerin gideriminde bakteri, fungus ve alg gibi yeni çevre dostu ve ekonomik biyomateryaller üzerinde odaklanılmıştır

(Kahraman ve ark., 2005; Bozanta ve Ökmen, 2011).

Mikroorganizmalar, farklı yollarla maruz kaldıkları bu ağır metallerin toksik etkilerinden korunmak için bazı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmaları arasında; pozitif yüklü ağır metallerin negatif yüklü hücre zarına bağlanması, bu metallerin hücre dışı polimerik maddelere bağlanması, hücre içinde indirgeme, moleküler pompa, hücre içinde biriktirme, sitoplazmada metalotiyonein proteinleri ile bağlanması, sitoplazmada metal tuzları olarak çöktürülmesi yer almaktadır (Bozanta ve Ökmen, 2011). Ağır metallerden birincil olarak bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalar etkilenmektedirler. Bu nedenle mikroorganizmaların bu kirleticilerle baş edebilecekleri sistemlerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar çok fazla önem kazanmıştır. Ayrıca moleküler teknikler kullanılarak bu toksik etkinliği olan maddeleri daha zararsız bileşiklere dönüştürmek için gerekli olan genlere sahip bakteri türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği saptanmıştır (Chung ve ark., 2001, Stark ve ark., 2011).

Ağır metaller kavramı, fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g cm^{-3} değerinden daha büyük olan ve moleküler ağırlıkları 63.5 ve 200.6 g olan metaller için kullanılır. Bu grup içerisinde kurşun, kadmiyum, krom demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'dan fazla metal yer almaktadır (Kahvecioğlu ve ark., 2009). Krom çok farklı formlarda bulunmasına rağmen, üç değerlikli Cr (III) ve altı değerlikli Cr (VI) türleri en yaygın ve kararlı formlarıdır. Krom, çevrede doğal olarak trivalan (+3) formuyla Cr_2O_3 şeklinde bulunmaktadır (Muter ve ark., 2001). Krom pek çok canlı organizmada yağ ve karbonhidrat metabolizması için gerekli olan elementlerden biridir. Kromun biyolojik etkileri, oksidasyon basamaklarına göre değişmektedir. Cr^{6+} çoğu organizmalar için

oldukça toksikken Cr^{3+} 'un toksisitesi maruz kalma potansiyeline bağlı olarak değişmektedir. (Wong ve Trevors, 1988; Katz ve Salem, 1993). Cr^{6+} 'un toksik etkisi Cr^{3+} 'un yaklaşık yüz katı fazladır (Şanlı, 2002). Cr (III) yeraltı suyunda çok az çözünmesi, toprak tarafından kuvvetlice tutulması ve çözünürlüğünün yok denecek kadar az olması çevrede yaratacağı toksik etkiyi de azaltmaktadır. Krom (III) proteinler ve özellikle nükleik asitlerle etkileşime girerek DNA kararlı yapısını bozmakta ve erime sıcaklığını düşürmektedir. Krom klorür ($CrCl_3$) ile yapılan çalışmalarda, nükleik asit sentezinde gecikmelere bağlı nükleik asit içeriğinde azalmalar saptanmıştır. Krom klorürdeki Cr (III), DNA'daki negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanarak, bazlar arasındaki zayıf H bağlarının kopmasına neden olmaktadır (Cervantes ve ark., 2001; Mohan ve Pittman 2006). Krom toksisitesi Cr^{6+} 'nın daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesi ile ilişkilidir. Kromun DNA üzerindeki hasarı özellikle gen üzerinde toksik etki göstermesidir. Cr^{3+} enzimlerin karboksil ve sülfidril grupları ile reaksiyona girerek yapı ve aktivitelerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Levis ve Bianchi, 1982). DNA polimeraz ve diğer enzimlerin aktivitelerinin modifikasyonu sonucunda magnezyum iyonları ile Cr^{3+} yer değiştirebilir (Snow, 1994; Carlos ve ark., 2001).

Ağır metaller, tarımda verimi artırmak için kullanılan pestisit ve gübrelerin kullanımı, fosil yakıt kullanımı ve endüstriyel aktiviteler gibi çok çeşitli kaynaklardan çevreye yayılabilmektedirler (Alloway, 1995). Günümüzde ağır metallerin en önemli kaynağını endüstriyel aktiviteler oluşturmaktadır. Ağır metallerin çevreye yayılmasında etkili olan en önemli endüstriyel faaliyetler arasında maden endüstrisi, metal endüstrisi, sanayi tesisleri atık suları, çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam sanayi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir (Kahvecioğlu ve ark., 2009).

Ağır metal içeren endüstriyel atık sular, biyolojik oksijen ihtiyacı değeri düşük, genellikle asidik, suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlılar için ve en önemlisi de biyoremediasyondan sorumlu olan mikroorganizmalara toksik etkili inorganik karakterli sulardır (Türkman ve ark., 2001).

D. radiodurans ise bu toksik inorganik karakterli atık sularda etkin bir şekilde kullanılan bakterilerden biridir. *D. radiodurans*, yüksek seviyede iyonize radyasyon ve UV radyasyon, kuraklık ve DNA'ya zarar veren kimyasallar gibi birçok ajan ve koşula olan direnciyle iyi bilinen poliekstremofil bir bakteridir. Aynı zamanda çeşitli ağır metalleri ve radyoaktif metalleri yıkabilme özelliğine de sahiptir. *D. radiodurans* aerobik, kırmızı pigmentli, spor oluşturmeyen, patojenitesi olmayan ikili ya da dördü hücre kümeleri şeklinde bulunan Gram (+) bir bakteridir. Ortalama bir hücre çapı $1\mu m$ ($0.5-3.5\mu m$) kadardır (Murray, 1986). $32^\circ C$ 'de optimum üreyen mezofil bir bakteridir. Bakterinin jenerasyon süresi yaklaşık olarak 100-110 dakika olduğu için kolonilerin yeteri kadar gelişmesi 3 gün sürmektedir. *D. radiodurans*, ilk kez Anderson ve arkadaşları tarafından Oregon'da gama ışınları uygulanmış konserve etten izole edilmiştir (Anderson ve ark., 1956). *D. radiodurans* Gram (+) olmasına rağmen hücre örtüsünün çok tabakalı yapısı (Lancy ve Murray, 1978; Thornley, 1965) ve lipid kompozisyonundan (Knivett, 1965; Work, 1964) dolayı Gram (-)'leri anımsatmaktadır. *D. radiodurans*'ın hücre örtüsü, kalınlığı 150 nm'dir. İç membran üzerinde peptidoglikan içeren holey tabaka, bölmeli tabaka ve hegzagonal paketlenmiş alt birimlerden oluşan S-layer gibi (Lancy ve Murray, 1978; Work ve Griffiths, 1968) çok sayıda tabakalara sahiptir.

D. radiodurans, özellikle iyonize radyasyon ve UV radyasyon gibi DNA'ya zarar veren ajanların öldürücü etkilerini ve dolayısıyla oksidatif stresi tolere edebilme yeteneğine

sahiptir (Battista, 1997). *D. radiodurans*, iyonize radyasyon ve kuraklığın neden olduğu çift zincir kırıkları (DSBs), tek zincir kırıkları (SSBs) ve baz zararı gibi DNA'ya farklı şekillerde zarar veren çeşitli ajanlara karşı direnç göstermektedir. *D. radiodurans*, iyonize radyasyona *E. coli*'den 30 kat ve insandan 1000 kat daha dayanıklıdır. Bu dayanıklılığın sebebi, bakterinin genom başına yaklaşık 200 bazlık çift zincir kırıklarını hiç canlılık kaybı olmaksızın tamir edebilmesinden kaynaklanmaktadır (Battista, 1997; Harsojo ve ark., 1981; Kitayama, 1982; Moseley ve Copland, 1975).

Hemoglobinler, 1986 yılına kadar ökaryotik orjinli proteinler olarak bilinmekteydi. Ancak Dr. Webster ve arkadaşları Gram (-) bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*'nın doğal olarak hemoglobin içerdiğini tespit etmişlerdir (Wakabayashi ve ark., 1986). Bu bakteri zorunlu aerob olmasına rağmen doğal yaşam alanı oksijeni düşük ortamlardır ve bu koşullarda yaşamını sürdürebilmek için hemoglobinin (*vgb*) genini sentezlemektedir (Woose ve ark., 1984). *V. stercoraria*'dan alınan bakteri hemoglobin geni, hipoksik koşullarda yaşayan bakterilere aktarıldığında bu bakterilerin gelişimi, protein sentezi, metabolit üretimi, strese direncini geliştirmekte ve bakteri için faydalı ürünlerin üretimini arttırmaktadır (Zhang, 2007; Khosla ve Bailey, 1988). Ayrıca zararlı bileşiklerin etkisinin azaltılmasında da önemli etkisinin olması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar için çok büyük önem taşımaktadır (Stark ve ark., 2011).

MATERYAL VE YÖNTEM

Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan TGY agar (Trypton Glukoz Yeast Extract agar) ve TGY broth (Trypton Glukoz Yeast Extract broth) besiyerleri ile ağır metal uygulamalarında kullanılan CrCl_3 (krom triklorür) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan besi yerleri ve içerikleri

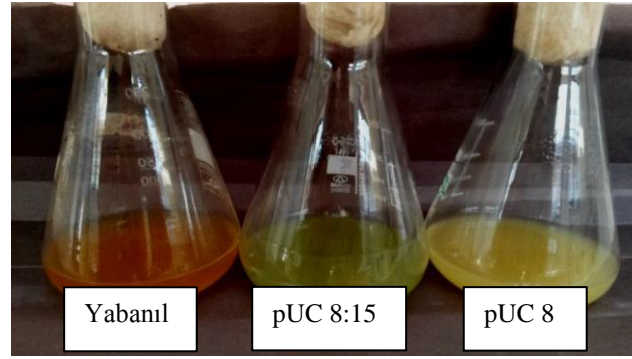
Çalışmamızda *D. radiodurans*'ın büyüme ortamı olarak TGY agar (10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Maya özütü, 1 g L⁻¹ Glikoz, 15 g L⁻¹ agar) ve TGY broth (10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Maya özütü, 1 g L⁻¹ Glikoz) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan *Deinococcus radiodurans* ve rekombinantları

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

Bakteri stoklarının hazırlanması

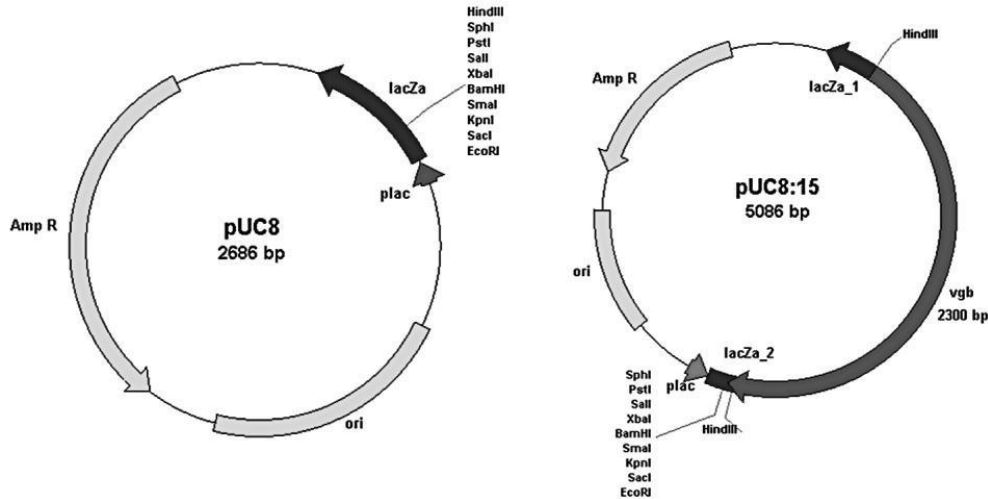
Bu çalışmada kullanılan bakterilerin uzun süreli stokları %20 gliserol (v/v) içeren TGY sıvı besiyerinde hazırlanarak -20°C'de muhafaza edildi. Ancak her çalışmada kullanılan *D. radiodurans* ve rekombinantları TGY agar içeren petrilerde üretilmiş ve +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Buzdolabında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

Şekil 1. *D. radiodurans* ve rekombinantları

vgb klonları

Bu çalışmada kullanılan *D. radiodurans*'ın Dr[pUC8] ve Dr[pUC8:15] rekombinantları İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hikmet

Geçkil'den temin edilmiştir. pUC8 plazmiti 2.7 kb büyüklüğünde olup işlevsel bir lacZ geni taşımaktadır. pUC8:15 plazmiti ise, 5 kb büyüklüğündedir ve multi klonlama bölgesine 2.3 kb uzunluğundaki *vgb* geni yerleştirilmiştir.



Şekil 2. pUC8 ve pUC8:15 plazmitlerinin fiziki haritası (Kurt ve ark., 2009)

Bakterilere ağır metal (Cr) uygulaması

D. radiodurans ve rekombinantlarının Cr varlığındaki üreme potansiyellerini saptamak amacıyla her üç bakteri için TGY sıvı besiyerleri ve Cr uygulaması için de 5000 ppm'lik Cr stoğu hazırlanmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda Cr için doz aralığımız 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm ve 2000 ppm olarak kararlaştırılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine belirlenen dozu sağlamak amacıyla belli miktarlarda Cr eklenmiş (100 µl, 200 µl, 400 µl, 600 µl ve 800 µl) ve stok kültürlerden bakteri ekimleri yapılarak 0. saatten itibaren 1., 2., 3., 4., 5., 6., 12. ve 24. saatlerde spektrofotometrede

600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek, üreme potansiyelleri saptanmıştır.

Bakterilerin metal uygulaması öncesi ve sonrası SEM fotoğrafları

D. radiodurans ve rekombinantları, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimleri saptamak amacıyla İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Laboratuvarı, bünyesinde bulunan Leo Evo 40 marka Taramalı Elektron Mikroskopu kullanılmıştır. Bir lam üzerine yayılıp kurutulularak hazırlanan preparatların üzeri altın-paladyum ile kaplanarak SEM' de incelenmiştir.

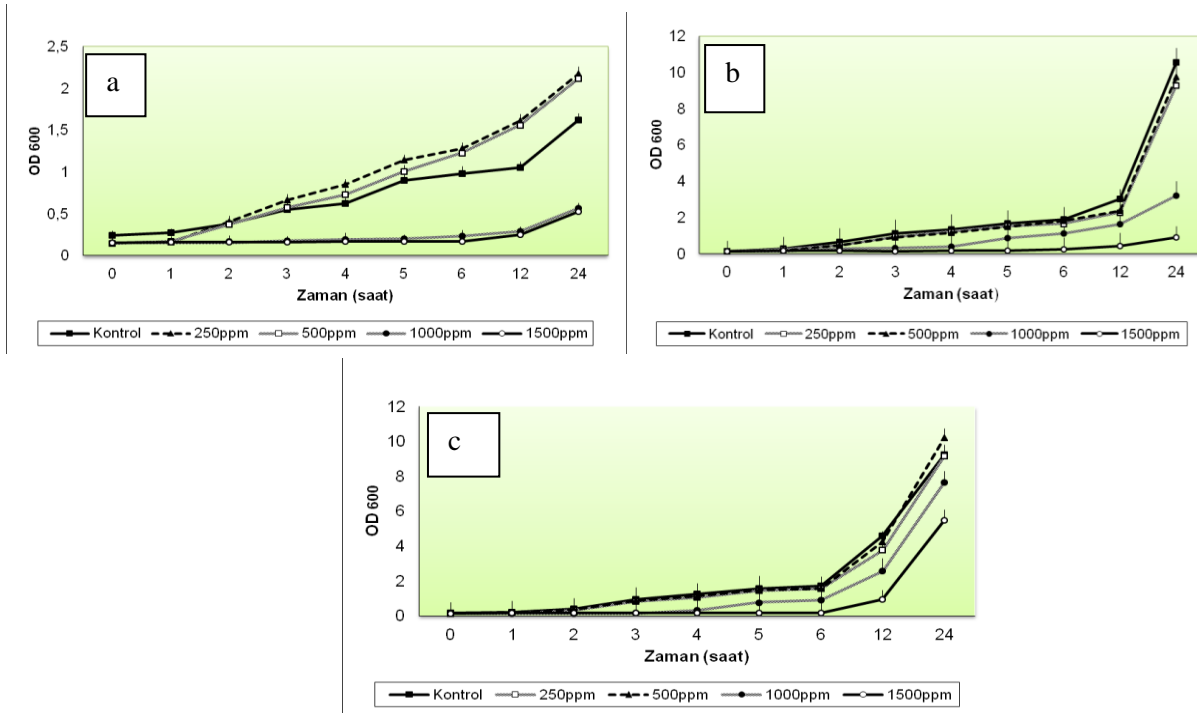
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bakterilerin Cr (III) varlığındaki üreme potansiyelleri

D. radiodurans (yabanıl) ve *vgb*⁺, *vgb*⁻ rekombinantlarının besi ortamına farklı dozlarda eklenen Cr varlığındaki üreme yoğunlukları Şekil 3'de verilmiştir. Buna göre *D. radiodurans* (yabanıl)'ın 250 ve 500 ppm gibi daha düşük Cr uygulamasının yapıldığı örneklerde kontrol grupları da dahil daha iyi bir üreme potansiyeli sergilediği gözlenmiştir. 1000 ve 1500 ppm'lik Cr uygulamasının yapıldığı örnekler ise benzer üreme eğrilerine sahip olup diğer gruplardan daha düşük bir üreme potansiyeline sahiptirler.

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

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



Şekil 3. *D. radiodurans* ve rekombinantlarının Cr varlığında üreme potansiyelleri a) *D. radiodurans* (yabanıl), b) *D. radiodurans* (*vgb*) rekombinantı: Dr[pUC8:15], c) *D. radiodurans* (*pUC8*) rekombinantı: Dr[pUC8]

VHb/*vgb* sistemi, ortam oksijenini tamponlayarak, besiyerindeki yaşlı hücrelerin daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağlamasında önemli bir avantaj sağlamaktadır (Qazi ve ark., 1993). Bakterinin bu avantajı kullanabilmesi onun herhangi bir stres faktörüne karşı adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır. Çünkü *vgb* geninin ifade edildiği bakterilerin üreme hızlarında bir artış olduğu

saptanmıştır (Liu ve ark.,1995). Bakterilerin bilinen jenerasyon sürelerini kıyasladığımızda (110 dk /20 dk) ortalama 5.5 katlık bir fark bulunmaktadır. Biz de yaptığımız çalışmada 24 saatlik *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ suşlarının yabanıl suş ile karşılaştırdığımızda üreme hızının yaklaşık 5.46 kat daha yüksek olduğunu saptadık.

Cr³⁺ uyguladığımız yabanıl ve rekombinant bakteriler uygulama dozuna bağlı

olarak metalin toksisitesinden etkilenmiş fakat bu durum bakterilerin normal üreme potansiyellerini çok değiştirmemiştir. Çünkü Cr^{3+} ; Cd, Pb ve As gibi diğer toksik metallere nazaran daha az toksik bir metaldir (Duffus, 1980; Mertz, 1987) ve bu yüzden de hem yabancı hem de rekombinant bakteriler, bu metalin toksisitesinden oldukça az etkilenecek normal üreme döngülerine devam etmişlerdir.

Kromun biyolojik etkileri, oksidasyon basamaklarına göre değişmektedir; Cr^{6+} çoğu organizmalar için oldukça toksikken Cr^{3+} 'un toksisitesi maruz kalma potansiyeline bağlı olarak değişmektedir (Wong ve Trevors, 1988; Katz ve Salem, 1993). Örneğin, Brady ve arkadaşları (1994) *Scenedesmus* ve *Selenastrum* alg kolonisi büyümesinin, 100 ppm Cr (III)'den etkilenmediğini ancak 100 ppm Cr^{6+} 'da büyümenin gerçekleşmediğini kaydetmişlerdir. Bu mekanizma alglerin kroma karşı farklı hassasiyetleri olduğunu açığa çıkarmaktadır. *Euglena gracilis*'te Cr^{6+} varlığında lag safhası uzamış, Cr (III) varlığında büyüme hızı azalmıştır (Brochiero ve ark., 1984). Krom tarafından *Chlorella* (Wong ve Trevors, 1988) ve *Scenedesmus*'da (Corradi ve ark., 1995) fotosentezin engellendiği kaydedilmiştir (Carlos ve ark., 2001).

Chlorella vulgaris, gelişmesi 45-100 ppm Cr^{3+} veya Cr^{6+} 'dan etkilenmezken, 15ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarda *Scenedesmus acutus*'da hiçbir gelişme meydana gelmemektedir (Traviesco ve ark., 1999).

Canlılar, bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genomlarında bir direnç mekanizması varsa, mevcut stres faktörüyle mücadeleyle ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Maruz kaldıkları stres

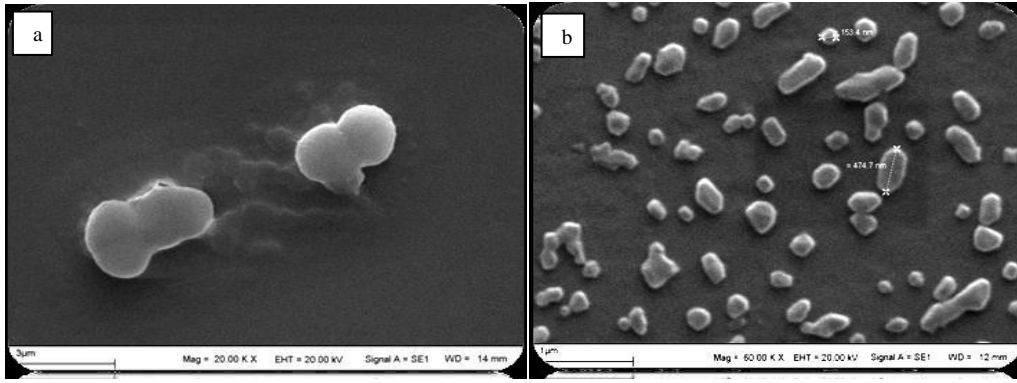
sonucunda organizmanın DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve bu mRNA ribozomlarda translasyon sonucunda ilgili stresi düzenleyici şok proteinlerini sentezler. Sentezlenen düzenleyici şok proteini canlının, uygulanan stres ile mücadelesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşıda etkili olabilmektedir. Ayrıca her canlının bir strese karşı aktive ettiği direnç mekanizmaları aynı olabildiği gibi farklı da olabilmektedir. Hatta aynı canlının farklı gelişim evrelerindeki (lag faz, log faz, statik faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (Neidhardt ve VanBogelen, 2009, Yousef ve Courtney 2003, Arsene ve ark., 2000, Cronan 2002).

Bakterilerin metal uygulaması öncesi ve sonrası SEM fotoğrafları

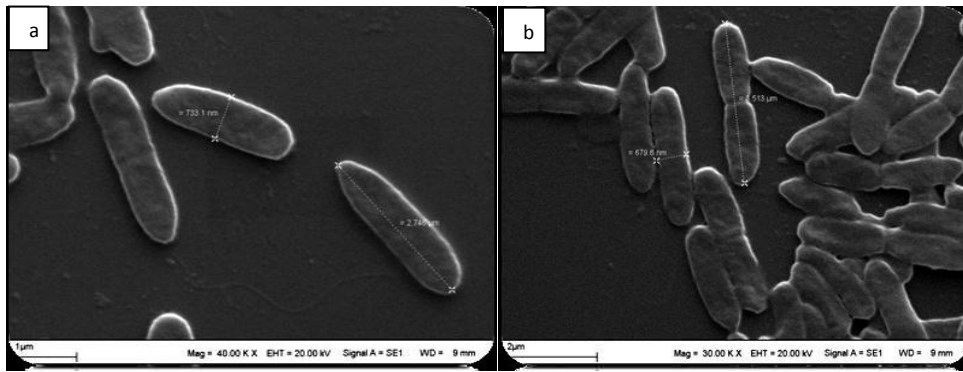
D.radiodurans (yabancıl) ve rekombinantlarının, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası hücre morfolojilerindeki değişimler taramalı elektron mikroskopunda yaptığımız incelemeler sonucunda tespit edilmiştir.

D. radiodurans (yabancıl), kok şeklinde ve genel olarak ikili veya dördü hücre kümeleri şeklinde bulunurlar. 1500 ppm Cr uygulaması sonrası SEM fotoğraflarını kıyasladığımızda bakterinin ikili hücre yapılarında bozulmalar tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücre yapısında da deformasyonlar gözlenmiştir.

D. radiodurans (*vgb*) rekombinantı Dr[pUC8:15], yabancılarından farklı olarak uzun basil şeklindedir. Cr uygulamasından sonra hücre yapısında ve boyutunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



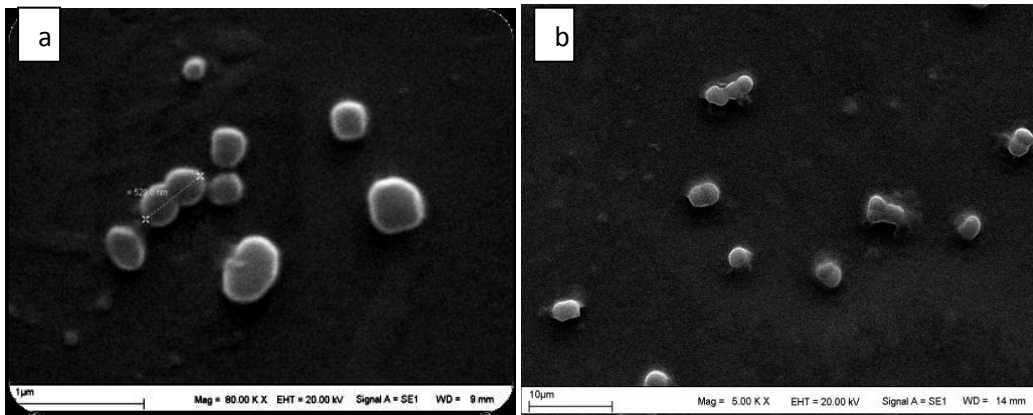
Şekil 4. *D. radiodurans* (yabani)' in 1500 ppm Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (yabani)' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi



Şekil 5. *D. radiodurans* (vgb) rekombinantı: Dr[pUC8:15]' in 1500 ppm Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (vgb) rekombinantı: Dr[pUC8:15]' in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi

D. radiodurans (pUC8) rekombinantı: Dr[pUC8], yapı olarak yabancıla benzemekle birlikte boyut olarak çok daha küçüktür. Ortalama bir hücre 500 nm ile 1.2 µm arasında değişmektedir. 1500 ppm'lik Cr uygulamasından sonra ise hücre yapısında ve boyutunda herhangi

bir farklılığa rastlanmamıştır. Çünkü, VHb/vgb sistemi, ortam oksijenini tamponlayarak, Cr³⁺ varlığında rekombinant bakterilere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneğinde avantaj sağlamıştır.



Şekil 6. *D. radiodurans* (pUC8) rekombinantı: Dr[pUC8]' in 1500 ppm Cr varlığında hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler a) *D. radiodurans* (pUC8) rekombinantı: Dr[pUC8] in normal hücre yapısı, b) Cr varlığındaki hücre morfolojisi

Aynı zamanda *D. radiodurans* (yabani) ve rekombinantlarının, ağır metal uygulaması öncesi ve sonrası bakterilerin hücresel yapılarındaki değişimleri tespit ettiğimiz SEM'de yaptığımız incelemeler sonucunda, Cr³⁺ uygulamasının bakterilerin hücre yapılarında,

SONUÇ

Bu çalışmada, birçok stres faktörüne karşı direnç gösterebilen *D. radiodurans* ve bu bakterinin pUC8 plazmitini taşıyan rekombinantı ile aynı plazmitin *vgb* genini taşıyan formu olan pUC8:15 plazmitini taşıyan rekombinantı kullanılmıştır. Cr³⁺ gibi ağır metallerin bu bakterilerin hem üreme potansiyelleri üzerine etkisi tespit edilerek aynı zamanda *vgb* geninin bu stres koşulları altında organizmaya sağlayacağı katkı araştırılmak istenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların, zararlı metallerin toksisitesinin giderilmesi ve değerli metallerin kazanılmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Mikroorganizmalar ağır metallerle farklı kromozomal, transpozon, plazmid kodlu sistemler ile adapte olmaktadır. *V. stercoraria*'dan alınan bakteri hemoglobin geni, bakterilere aktarıldığında bakterilerin gelişimini, metabolit üretimini ve strese direncini geliştirmektedir. Ayrıca zararlı bileşiklerin toksisitesinin azaltılmasında da önemli etkisinin olması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar için çok büyük önem taşımaktadır. Ağır metal dirençliliğini kodlayan genler aynı zamanda antibiyotik dirençliliğinde de etkilidir. Bu nedenle bu mikroorganizmalar sadece biyoremediasyon, biyomadencilik gibi uygulamalar için değil sağlık alanında da önem kazanmaktadır. Yavuz ve Sarıgül, 2016'da yaptıkları çalışma sonucunda, ağır metal dirençliliği mekanizmalarının anlaşılması ile kirletilmiş çevrelerin etkin olarak temizlenebileceğini, çevre dostu teknolojiler kullanılarak düşük cevher içerikli madenlerden

yüksek dozlarda dahi kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık yapılan literatür taramalarında Cd ve Pb gibi ağır metallerin özellikle yüksek dozlarda bazı bakterilerin hücre boyutunda artış ve deformasyonlar yarattığı tespit edilmiştir (Özbey, 2014).

yüksek kalitede ürün elde edilebileceğini ve patojen mikroorganizmalara karşı etkin yeni ilaçlar geliştirilebileceğini bildirmişlerdir (Yavuz ve Sarıgül, 2016).

Bu ileri teknoloji kapsamında çeşitli gen sistemleri ile donatılmış organizmaların kullanımı, yıkımı zor toksik metallerin giderimi için büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda başta iyonize radyasyon ve ultraviyole radyasyon olmak üzere, genotoksik kimyasallar, oksidatif zararlar ve dehidrasyona karşı ekstrem dayanıklılığı ile Guinness rekorlar kitabına girmiş olan *D. radiodurans*'ın *vgb*/VHb sisteminin rekombinant suşlarında metal varlığında organizmanın bundan nasıl etkileneceği ilk kez araştırılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2012-192 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alloway BJ, 1995. Heavy Metals in Soils. No: XIV, 368, Springer Netherlands. Chapman & Hall, London.
- Anderson AW, Nordan HC, Cain RF, Parrish G, Duggan D, 1956. Studies on a radio-resistant micrococcus. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. Food Technology, 10: 575-577.
- Arsene F, Tomoyasu T, Bukau B, 2000. The heat shock response of Escherichia coli. International Food Microbiology, 55:3-9.
- Battista JR, 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annual Review of Microbiology, 51: 203-224.

- Bozanta E, Ökmen G, 2011. Biyosorpsiyon ve Mikroorganizmalar. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 4 (2):69-77.
- Brady D, Duncan JR, 1994. Bioaccumulation of Metal Cations by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41:149-154.
- Brochiero E, Bonaly J, Mestre JC, 1984. Toxic action of Hexavalent Chromium on *Euglena Gracilis* Strain Z Grown Under Heterotrophic Conditions. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 13: 603-608.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme, FW, 2000. Microbial resistance to metals in the enviroment. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 45: 198-207.
- Carlos C, Jesus CG, Silvia D, Felix GC, Herminia LT, Juan Carlos TG, Rafael MS, 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology Reviews, 25: 335-347.
- Ceribası IH, Yetis U, 2001. Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system – kinetics. Water SA, 27: 15–20.
- Cervantes C, Garcia J, Devars S, Corona F, Tavera H, Guzman J, Sanchez R, 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology, 25: 335-347.
- Corradi MG, Gorbi G, Ricci A, Torelli A. Bassi,AM, 1995. Chromium induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32: 12-18.
- Chung JW, Webster DA, Pagilla KR, Stark BC, 2001. Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in *Burkholderia* and *Pseudomonas* for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 27:27-33.
- Cronan JE, 2002. Phospholipid modifications in bacteria. Current Opinion in Microbiology, 5:02-205.
- Çabuk A, Akar T, Tunalı S, Tabak O, 2006. Biosorption Characteristics of *Bacillus* sp. AT5-2 Immobilized in Silica Gel for Removal of Pb(II). Journal of Hazardous Materials, 136: 317-323.
- Duffus JH, 1980. Environmental toxicology. Wiley, New York. 8. European Commission DG ENV. E3 Project ENV.E.3/ETU/2000/0058, “Heavy Metals in Waste” February 2002, Danimarka.
- Harsojo Kitayama S, Matsuyama A, 1981. Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. Journal of Biochemistry, 90: 877–880.
- Kahraman S, Asma D, Erdemoğlu S, Yesilada O, 2005. Biosorption of Copper (II) by Live and Dried Biomass of the White Rot Fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia trogii*. Engineering in Life Sciences, 5 (1): 72-77.
- Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S, 2009. Metallerin çevresel etkileri. Metalurji Dergisi, 136:47-53.
- Katz SA, Salem H, 1993. The Toxicology of Chromium with Respect to its Chemical speciation: a review. Journal of Applied Toxicology, 13, 217-224.
- Kitayama S, 1982. Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. Biochimica Biophysica Acta, 697: 381–384.
- Kurt AG, Aytan E, Ozer U, Ates B, Geckil H, 2009. Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bearing the *Vitreoscilla* hemoglobin gene. Biotechnology Journal, 4(7):1077-88.
- Khosla C, Bailey JE, 1988. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *E. coli*. Nature, 331:633–635.
- Knivett VA, Cullen J, Jackson MJ, 1965. Odd-numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*. Biochemical Journal, 96: 2–3.
- Lancy P, Murray RG, 1978. The envelope of *Micrococcus radiodurans*: isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. Canadian Journal of Microbiology, 24:162–176.
- Levis AG, ve Bianchi V, 1982. Mutagenic and cytogenic effects of chromium compounds: Biological and Environmental Aspects of Chromium. Elsevier,171-208.
- Liu SC, Webster DA, Stark BC, 1995. Cloning and expression of the *Vitreoscilla* Hemoglobine gene in *Pseudomonas*: Effect on cell growth. Applied Microbiology and Biotechnology, 44:3, 419-424.
- Mertz W, 1987. Trace Elements in Human and Animal Nutrition-15th Edition, Volume 1. Academic Pres, London.

- Mohan D, Pittman CU, 2006. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, 137: 762-811.
- Moseley BE, Copland HJ, 1975. Isolation and properties of a recombination deficient mutant of *Micrococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, 121:422-428.
- Murray RG, 1986. Family II. *Deinococcaceae*, 1035-1043. In P. H. A.
- Muter O, Lubinya I, Miller D, Grigorjeva L, Ventiya E, Rapoport A, 2001. Cr(VI) sorption by inact and Dehydrated *Candida utilis* cells in the presence of the other metals. *Process Biochemistry*, 38: 123-131.
- Neidhardt FC and VanBogelen RA, 2000. Proteomic analysis of bacterial stress response, in *Bacterial Stress Responses*. American Society for Microbiology Press, 445-452.
- Nies DH, 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 730-750.
- Qazi GN, Sharma NR, Parshad, 1993. Role of Dissolved-Oxygen as a Regulator for the Direct Oxidation of Glucose by *Erwinia herbicola* and *Gluconobacter oxidans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:4, 336-339.
- Özbeý E, 2014. *Deinococcus radiodurans* ve Rekombinantlarının UV-C, Ağır Metal Dirençliliği ve Biyosorpsiyon Yeteneği, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Snow ET, 1994. Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 3: 41-44.
- Stark BC, Dikshit KL, Pagilla KR, 2011. Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla*. *Biotechnology Letters*, 33 (9): 1705-1714.
- Şanlı Y, 2002. *Veteriner Klinik Toksikoloji*, Medipres, Güngör Matbaacılık, 2. Baskı, Ankara.
- Türkman A, Aslan Ş, Ege İ, 2001. Doğal zeolitlerle atıksulardan kurşun giderimi. *Dokuz Eylül Üniv., Mühendislik Fakültesi, Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3 (2), 13-19.
- Thornley MJ, Horne RW, Glauert AM, 1965. The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. *Archives of Mikrobiology*, 51: 267-289.
- Travieso L, Canizarez RO, Borja R, Benitez F, Dominguez AR, Dupeyron R, Valiente V, 1999. Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 144-151.
- Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA, 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*, 322(6078):481-483.
- Woese CR, Weisburg WG, Paster BJ, Hahn CM, Tanner RS, Krieg NR, Koops HP, Harms H, Stackebrandt E, 1984. The Phylogeny of Purple Bacteria: the Beta-Subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5: 327-336.
- Wong PT ve Trevors JT, 1988. Chromium toxicity to algae and bacteria. *Chromium in the Natural and Human Environments*, 305-315. Wiley, (New York).
- Work E, 1964. Amino acids of walls of *Micrococcus radiodurans*. *Nature*, 201:1107-1109.
- Work E, Griffiths H, 1968. Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, 95: 641-657.
- Yavuz O, Sarıgül N, 2016. Toprak ve sucul ortamlardaki ağır metal kirliliği ve ağır metal dirençli mikroorganizmalar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (1), 44-51.
- Yousef AE, Courtney PD, 2003. Basics of stress adaptation and implications in newgeneration foods. *Microbial Adaptation and Food Safety. Pres*, 1-25 (New York).
- Zhang L, Yang Q, Tang Y, 2007. Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNAdamagin agents due to change of free radicals scavenging ability. *Archives of Microbiology*, 188: 411-419.