

***Escherichia coli*'de OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİLİ GENLERİN
METAL DİRENCİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İkbal MACİT

**YÜKSEK LİSANSTEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MART 2016
AMASYA**

İkbal MACİT tarafından hazırlanan *Escherichia coli*'de Oksidatif Stres İle İlişkili Genlerin Metal Direncindeki Rollerinin Araştırılması adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Önder İDİL
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Önder İDİL
Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Doç Dr. Tuğba YILDIRIM
Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Doç Dr. Cihan DARCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, B.Ü.

Tarih .../.../2016

Bu tez Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Mehmet KARA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

imza

İkbal MACİT

***Escherichia coli*'de OKSİDATİF STRES İLE İLİŞKİLİ GENLERİN METAL
DİRENCİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

İkbal MACİT

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2016

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, bazı metallerin sebep olduğu stres altında, *Escherichia coli*'nin yaşamında oksidatif stres genlerinin rollerinin belirlenmesidir.

Escherichia coli, doğada birçok stres faktörü ile başa çıkmak zorundadır. En önemlilerinden biri olan oksidatif stres, canlıların doğada ve aerob metabolizmalarının gereği oldukça sık karşılaştıkları bir stres faktörüdür. Bu stres ile başa çıkabilmek için birçok enzimatik ve enzimatik olmayan korunma mekanizmalarına sahiptir.

Çalışmada *Escherichia coli*'nin oksidatif strese karşı korunmada rol alan *sodA*, *sodB*, *sodC*, *katE*, *katG*, *ahpC*, *zwf*, *btuE* enzimleri ile bu enzimlerin regülasyonunda görev alan *oxyR*, *soxR*, *soxS* düzenleyici genlerine sahip mutant bakteriler kullanılmıştır. Japon Ulusal Genetik merkezinden temin edilen *Escherichia coli* BW25113 mutantlarından P1 transdüksiyon ile mutasyon bölgeleri *Escherichia coli* W3110 bakterisine aktarılarak, mutant genlere sahip *E. coli* W3110 elde edilmiştir. Aynı şekilde Japonyadan temin edilen plazmitler doğrulama testleri için bu mutantlara transformasyon ile aktarılmıştır. Belirtilen genlerin metal direncindeki rollerinin analizi için; Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Al, Pb, Cd, Cr, Mo, Hg metallerinin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu testleri, fosfat tamponunda Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu değerinin

yarısı ile metal varlığında yaşam deneyleri, farklı konsantrasyonlarda çeşitli metallerin bulunduğu katı besiyerlerinde ise farklı sayılarda bakteriler ile üreme testleri yapılmıştır. Önemli rol oynadığı belirlenen genlerin doğrulaması için plazmit transformasyonu yapılmış genlere sahip mutantlar ile aynı testler tekrarlanmıştır.

Çalışma sonucunda, metal stresi altında oksidatif stres genlerinden *sodB* ve *katE*'nin metal direncinde en önemli gen bölgeleri olduğu belirlenmiştir. Bu ilişki ile literatüre, metal stresine karşı korunmada global mekanizmanın nasıl olduğuyla ilgili katkı sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, Metal stresi, Reaktif oksijen radikali

**INVESTIGATION OF OXIDATIVE STRESS RELATED GENES IN
Escherichia coli METAL RESISTANCE**

İkbal MACİT

**AMASYA UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

March 2016

ABSTRACT

The purpose of this work is to determine the roles of the oxidative stress genes in the survival of *Escherichia coli* under the effect of some metals that cause stress.

***Escherichia coli* has to cope with the stress factor in nature. Oxidative stress is a common stress factor that microorganisms often encounter in nature and related to their aerobic metabolisms. They have various enzymatic and nonenzymatic protection mechanisms to overcome this stress.**

In this study, to research of the roles of *sodA*, *sodB*, *sodC*, *katE*, *katG*, *ahpC*, *zwf*, *btuE* enzymes and *oxyR*, *soxR*, *soxS* regulation genes on the protection of *Escherichia coli* against oxidative stress the relation with metals, mutant bacteria were used. The mutant genes of *Escherichia coli* BW25113 obtained from Japan National Genetic Center were transferred with P1 transduction *Escherichia coli* W3110 bacteria, and *E. coli* W3110 that have a mutant gene were obtained. Plasmids that obtained from Japan were transferred to these mutants for complementation tests. For the analyses of metal resistance of these genes, Minimal Inhibitory Concentration tests in microplates of Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Al, Pb, Cd, As, Cr, Mo, Hg metals, the viable experiments in metal existence with the half of Minimal Inhibitory Concentration values in phosphate buffer, the reproduction tests are carried out with various amount of bacteria in nutrient agar with the concentration of different metals. At the end of the

studies, the same tests are repeated with the mutants that have the plasmid transformation genes for the accuracy of the genes that play an important roles.

At the end of the study, the role of the oxidative stress genes relation with the metal stress, and what genes play roles on the metal resistance under different conditions were determined. It is aimed to contribute global mechanisms to protect against metal stress in literature with the help of this project.

Keywords: *Escherichia coli*, metal stress, reactive oxygen radicals



TEŞEKKÜR

Tezimin konusunun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, laboratuvar çalışmalarında, yönümü belirleyebilmemde ve tamamlayabilmemde kısacası ihtiyacım olduğu her anda destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Önder İDİL'e,

Bilgi birikimlerini benden esirgemeyen ve çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Cihan DARCAN, Yrd. Doç. Dr. Arif AYAR ve Doç. Dr. Tuba YILDIRIM hocama,

Amasya Üniversitesi hazırlık ve uygulama laboratuvarında çalışmalarımı rahatlıkla yapabilmem için her türlü imkanı sağlayan değerli Rektörümüz Prof. Dr. Metin ORBAY'a,

Laboratuvar çalışmalarında desteğini esirgemeyen Özge KAYGUSUZ ve Gülçin ÇETİN'e

Yüksek lisans arkadaşlarım Gülşah GÜNDOĞDU, Ali TOKATLI, Dilber ÖZGÜN, Elif AYAR, İbrahim TÜRKEL ve Hamdi ÖZKUL'a,

Gösterdikleri sabır verdikleri her türlü destek için babam Bekir MACİT, abim Ahmet Safa MACİT ve ablam Hilal MACİT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TÜBİTAK 3001-Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programı tarafından 113Z607 numaralı proje olarak kabul görmüştür.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 <i>Escherichia coli</i>	8
2.1.1 Morfoloji ve kimyasal özellikleri.....	8
2.1.2 Virülans faktörleri.....	9
2.1.3 Direç.....	9
2.2 Oksidatif Stres.....	10
2.2.1 Serbest radikaller.....	10
2.2.1.1 Süperoksit radikali	11
2.2.1.2 Hidrojen peroksit.....	11
2.2.1.3 Hidroksil radikali	12
2.2.1.4 Singlet oksijen	12
2.2.2 Antioksidanlar	13
2.2.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	13
2.2.2.2 Katalaz (Catalaze)	14
2.2.2.3 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	14
2.2.2.4 Glutasyon redüktaz	15
2.2.2.5 Glutasyon s-transferazlar (GST)	15
2.2.3 Oksidatif stres regülatörleri	15
2.2.3.1 OxyR regülону	15
2.2.3.2 SoxRSregülону	16
2.3 Ağır Metaller.....	16
2.3.1 Mikroorganizmalarla ağır metal adsorblanma mekanizması.....	17

2.3.2	Ağır metallein özellikleri.....	18
2.3.2.1	Bakır (Cu)	18
2.3.2.2	Kobalt (Co)	19
2.3.2.3	Nikel (Ni).....	19
2.3.2.4	Çinko (Zn).....	20
2.3.2.5	Alimünyum (Al).....	21
2.3.2.6	Kadmiyum (Cd)	21
2.3.2.7	Civa (Hg)	21
2.3.2.8	Manganez (Mn).....	22
2.3.2.9	Molibden (Mo).....	22
2.3.2.10	Kurşun (Pb)	22
2.3.2.11	Krom (Cr).....	23
3.	MATERYAL VE METOD	24
3.1	Kullanılan <i>Escherichia coli</i> Suşları	24
3.2	Besiyerleri	24
3.2.1	Nutrient agar besiyeri	24
3.2.2	Nutrient broth besiyeri	24
3.2.3	LB agar besiyeri	24
3.2.4	LB broth besiyeri	25
3.2.5	Soft agar	25
3.2.6	DM agar	25
3.2.7	SOB medium	25
3.2.8	SOC medium	26
3.2.9	IPTG ve X-GAL'li besiyeri hazırlama	26
3.3	<i>Escherichia coli</i> W3110 Mutantlarının Eldesi	28
3.3.1	P1kc Fajı ile transdüksiyon	28
3.3.1.1	Yıkama tamponu.....	29
3.3.2	Transformasyon	29
3.3.2.1	Plazmid izolasyonu	29
3.3.2.2	Miktar tayini	30
3.3.2.3	Transfotmasyon yapılışı.....	30
3.3.3	Primer sulandırma	31

3.3.4	Koloni PCR	31
3.3.5	Agaroz jel elektroforezi	33
3.4	Stok Madde Hazırlama	33
3.4.1	TBE hazırlama.....	33
3.4.2	TE hazırlama	33
3.4.3	Tris-HCl hazırlama	33
3.4.4	Fosfat tamponu hazırlama	34
3.4.5	IPTG hazırlama (izopropil β -D-1- tiogalaktopiranosid)	34
3.4.6	IPTG ve X-GAL'li besiyeri hazırlama	34
3.5	MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerinin Belirlenmesi	34
3.5.1	Kimyasalların hazırlanması	34
3.5.2	Bakterilerin inkübasyonu	34
3.5.3	Seri sulandırma	35
3.6	Farklı Ph Lardaki Fosfat Tamponunda Yaşam Deneyleri	35
3.7	Katı Besiyerinde Metallerin Etkisi	36
4.	BULGULAR.....	37
4.1	Mutantların Elde Edilmesi	37
4.2	MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerleri	46
4.3	Yaşam Deneyi Sonuçları	47
4.4	Katı Besiyerinde Metallerin Etkisi.....	102
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
6.	KAYNAKÇA	116
	ÖZGEÇMİŞ	124

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1.Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> yabancı tip ve mutant suşları	27
Tablo 3.2. Bir örneklik koloni PCR reaksiyon karışımı.....	32
Tablo 3.3.PCR reaksiyonunda kullanılan primerler	32
Tablo 4.1.Çalışılan mikroorganizmalar için metallerin mıc değerleri (mg/ml).....	46
Tablo 4.2. Kadmilyum sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	47
Tablo 4.3. Kadmilyum sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	48
Tablo 4.4 Kadmilyum sülfatın <i>E.coli</i> ve komplemantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	49
Tablo 4.5. Kadmilyum sülfatın etkisi altında komplemantların t_{99} değerleri	50
Tablo 4.6. Bakır sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	52
Tablo 4.7. Bakır sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	53
Tablo 4.8. Bakır sülfatın <i>E.coli</i> ve komplemantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	54
Tablo 4.9. Bakır sülfatın etkisi altında komplemantların t_{99} değerleri	55
Tablo 4.10. Manganaz sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	57
Tablo 4.11. Manganaz sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	58
Tablo 4.12. Manganaz sülfatın <i>E.coli</i> ve komplemantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	59
Tablo 4.13. Manganaz sülfatın etkisi altında komplemantların t_{99} değerleri	60
Tablo 4.14. Nikel sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	62
Tablo 4.15. Nikel sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	63
Tablo 4.16. Nikel sülfatın <i>E.coli</i> ve komplemantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	64
Tablo 4.17. Nikel sülfatın etkisi altında komplemantların t_{99} değerleri	65

Tablo 4.18. Çinko sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	67
Tablo 4.19. Çinko sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	68
Tablo 4.20. Çinko sülfatın <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	69
Tablo 4.21. Çinko sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	70
Tablo 4.22. Krom-2-klorürün <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	72
Tablo 4.23. Krom-2-klorürün etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	73
Tablo 4.24. Krom-2-klorürün <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	74
Tablo 4.25. Krom-2-klorürün etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	75
Tablo 4.26. Kobalt sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	77
Tablo 4.27. Kobalt sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	78
Tablo 4.28. Kobalt sülfatın <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	79
Tablo 4.29. Kobalt sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	80
Tablo 4.30. Alüminyum sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	82
Tablo 4.31. Alüminyum sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	83
Tablo 4.32. Alüminyum sülfatın <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	84
Tablo 4.33. Alüminyum sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	85
Tablo 4.34. Civa-2-klorürün <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	87
Tablo 4.35. Civa-2-klorürün etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri.....	88
Tablo 4.36. Civa-2-klorürün <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	89
Tablo 4.37. Civa-2-klorürün etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	90
Tablo 4.38. Kurşun sülfatın <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	92

Tablo 4.39. Kurşun sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	93
Tablo 4.40. Kurşun sülfatın <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	94
Tablo 4.41. Kurşun sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	95
Tablo 4.42. Molibdenin <i>E.coli</i> ve mutantların yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml)	97
Tablo 4.43. Molibdenin etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri	98
Tablo 4.44. Molibdenin <i>E.coli</i> ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi (Log sayı-cfu/ml).....	99
Tablo 4.45. Molibdenin etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri	100
Tablo 4.46. Kadmiyumun katı besiyerinde bakterilere etkisi	102
Tablo 4.47. Manganın katı besiyerinde bakterilere etkisi	103
Tablo 4.48. Nikelinkatı besiyerinde bakterilere etkisi	104
Tablo 4.49. Çinkonunkatı besiyerinde bakterilere etkisi	105
Tablo 4.50. Kobaltın katı besiyerinde bakterilere etkisi	106
Tablo 54. Bakırınkatı besiyerinde bakterilere etkisi	107
Tablo 55. Kromunkatı besiyerinde bakterilere etkisi	108
Tablo 56. Civanınkatı besiyerinde bakterilere etkisi	109
Tablo 57. Molibdenin katı besiyerinde bakterilere etkisi	110
Tablo 58. Kurşununkatı besiyerinde bakterilere etkisi	111
Tablo 59. Alüminyumunkatı besiyerinde bakterilere etkisi.....	112

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>sodA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	37
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>sodB</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	38
Şekil 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>sodC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	38
Şekil 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ahpC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	38
Şekil 4.5. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>btuE</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	39
Şekil 4.6. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>katE</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	39
Şekil 4.7. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>katG</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	39
Şekil 4.8. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>oxyR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 4.9. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>soxS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 4.10. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>soxR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 4.11. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>zwf</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	41
Şekil 4.12. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::sodA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	42
Şekil 4.13. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::sodB</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	42
Şekil 4.14. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::sodC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	42
Şekil 4.15. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::ahpC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	43
Şekil 4.16. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::btuE</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	43
Şekil 4.17. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::katE</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	43
Şekil 4.18. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::katG</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	44
Şekil 4.19. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::oxyR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	44
Şekil 4.20. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::soxS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	44

Şekil 4.21. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::soxR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	45
Şekil 4.22. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::zwf</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	45



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler**Açıklama**

°C

Santigrat derece

cfu

Koloni oluşturan birim

g

Gram

H₂O₂

Hidrojen peroksit

kDa

Kilo dalton

km

Kanamisin

L

Litre

log

Logaritma

M

Molar

ml

Mililitre

mm

Milimetre

mM

Milimolar

rpm

Dakikadaki devir sayısı

μM

Mikromolar

μl

Mikrolitre

Kısaltmalar

ATCC

DNA

EDTA

GSH-Px

GST

IPTG

MIC

PCR

SOD

TBE

Açıklama

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

Deoksiribo Nükleik Asit

Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

Glutasyon peroksidaz

Glutasyon S-transferazlar

Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Süperoksit dismutaz

Tris-Borik Asit-EDTA

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar çevrelerindeki değişimlere kendilerini bir seri biyokimyasal ve genetik cevap ile adapte etmek zorundadırlar. Her bir farklı stres faktörüne karşı, özel korunma yollarına sahiptirler. Bireysel stres cevapları birçok kez tek bir çevresel sinyal ile tetiklenmektedir. Ancak doğadaki yaşam sırasında birden fazla stres şartına aynı anda maruz kalan mikroorganizmalarda global düzenleme ile, ilgili olmayan stres şartlarında rol oynayan gen gölgelerinde indüklendiği görülmektedir. Bu şartlarda farklı birçok mekanizma devreye girmektedir. Bu global düzenleme çapraz cevap olarak adlandırılır. Çapraz düzenlemeler ve global ağ ile ilgili bir çok çalışma farklı prokaryotlarda yapılmıştır (Moore ve Helmann, 2005; Uzzau ve ark., 2002).

Esansiyel metaller organizmaların büyümesi ve gelişimi için hayati mikroelementler olarak görev alırlar. Bu metaller arasında kalsiyum (Ca), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), çinko (Zn) sayılabilir. Bu mikroelementler mikroorganizmaların birçok metabolik faaliyeti için gereklidir. Bu nedenle esansiyel metaller için bakterilerde taşıma sistemleri vardır (Babai ve Ron, 1998). Hayati metaller biyokimyasal reaksiyonlar için katalist, protein yapıları ve bakteriyel hücre duvarı için stabilizer, osmotik dengenin sağlanmasında, redoks yollarında görev almaktadırlar. Magnezyum (Mg) ve çinko(Zn) gibi bazı metaller DNA'nın elektrostatik gücünde ve çeşitli enzimlerin stabilizasyonunda görev almaktadır. Ancak bu elementler yüksek seviyelerde olduğunda toksik etki gösterdikleri için, bu metallerin fazla olduğu durumlarda hücreleri korumak için farklı düzenleme mekanizmaları bulunmaktadır. Hayati olmayan metaller, taşıma sistemlerinin spesifikliğine rağmen hücrelere girebilmekte ve zarar verebilmektedir. Bu metaller ise arsenik (As), kadmiyum (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb) ve civa (Hg) olarak örnek verilebilir (Konopka ve Zakharova, 1999; Lım ve ark., 2009).

Metallerin etkileri ve hücre içi konsantrasyonlarının ayarlanması ve toksik özelliklerinin elemine edilmesi ile ilgili moleküler mekanizmalar, son 10 yılda yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Bu mekanizmaların aydınlatılması hem bakteriyel metabolizmanın anlaşılması hem de bakterilerle mücadelede kullanılması için

oldukça önemlidir. Ayrıca insan vücudunda patojen olan mikroorganizmalara karşı, vücudumuzun koruma yollarından biriside patojenlerin ihtiyaç duyduğu metal düzeyini düşürmek için bazı proteinlere sahip olmasıdır. Patojenlerin kendilerini korumak için sahip oldukları metal eksikliğini giderme yollarının ve moleküler mekanizmalarının hastalıklarla mücadele için de aydınlatılması gerekmektedir. Ağır metaller sucul ve karasal çevrelerde birçok canlıda fizikokimyasal seviyede çalışılmıştır. Ancak toksik özelliklerine karşı korunma mekanizmaları ve global düzenleme içerisinde bu korunma mekanizmalarının yeri moleküler düzeyde yeterli seviyede ortaya çıkarılamamıştır.

Metaller kovalent ve iyonik bağlar ile hücresel çeşitli komponentler ile ilişkiye girmektedir. Yüksek miktarlarda bulunan metaller esansiyel olsun veya olmasın hücre membranlarına, enzim spesifisikliğine, DNA'nın yapısına hasar verdiği ve hücresel fonksiyonların dağılmasına neden olduğu belirlenmiştir. Fe, Cu, Cr, V, Co redoks döngü reaksiyonlarını sağlayarak toksik olurken, Hg, Cd, Ni glutatyon eksikliği ve proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak etki gösterir (Helbig ve ark., 2008). Arseniğin nitrik oksit oluşumunu teşvik ederek ve thiol gruplarına bağlanarak etki gösterdiği bilinmektedir (Valko ve ark., 2005). Ancak bakırın reaktif oksijen radikalleri üretimi ile etki gösterdiğine dair şüpheler bulunmaktadır (Valko ve ark., 2005). Bir çok metalin toksisitesinde reaktif oksijen radikalleri ile oluşan oksidatif stres oluşumunun oldukça önemli olduğu görülmektedir.

Oksidatif stres doğada ve hayvanların vücudunda mikroorganizmaların karşılaştıkları en önemli streslerden birisidir. Doğada güneş ışığının direkt etkisi veya fotosensitizerler vasıtasıyla meydana gelen fotooksidatif stres ile oluşan radikaller vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca oksijenli solunumun doğal ürünü olan radikaller, hücre için başa çıkılması gereken bir sorundur. Reaktif oksijen radikalleri aminoasitlere, proteinlere, DNA'ya ve lipitlere saldırarak ciddi hasarlar vermektedir (Jordı ve Ros, 2000). Makrofajlar bakterilerle mücadelede oksidatif stres ajanlarını kullanırlar. Bazı metallerin oksidatif stres ile ilişkili oldukları yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Brocklehurst ve Morby, 2000). Metal iyonlarının toksisitelerindeki farklılık çözünürlükleri, absorbe edilebilir olmaları, taşınmaları,

kimyasal reaktiflikleri ve hücre içinde oluşturdukları komplekslerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle metal toksisitesinin temel sebeplerinden birisi reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak oksidatif stres oluşumu sağlamalarıdır (Silver, 1996). Demir ve bakır reaktif oksijen radikal üretimine sebep olan metaller olarak en fazla çalışılan metallerdir (Touati, 2000). Demir, biyolojik makromoleküller ve oksijen arasındaki redoks reaksiyonlarını katalize edebilme özelliğine sahiptir. Mikroorganizmalar solunum zinciri, TCA döngüsünde, oksidatif stres enzimlerinde görev alan birçok proteinde kofaktör olarak demire ihtiyaç duyar. Demir oksijenli çevrelerde nötral pH civarında, zayıf çözünürlüğü nedeniyle doğada mikroorganizmaların kullanabileceği bir formda değildir. Bu nedenle mikroorganizmalar sideroforlar olarak adlandırılan küçük özel demir taşıma sistemleri bulundurmaktadırlar (Braun ve Killmann, 1999). Ancak demirin eksiliğinin zararlı olduğu gibi fazlasıda oldukça zararlıdır. Metal homeostazisi üzerine çalışmalar genelde demir üzerine yoğunlaşmıştır (Braun ve Killmann, 1999). Demir ADP, EDTA, histidin, sitrat ve diğer şelate edici ajanlar ile reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve lipit peroksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Demir fenton reaksiyonları için katalist olarak görev alır (Hantke, 2001). Fenton reaksiyonları süperoksit anyonunun dönüşümü ve hidrojen peroksitin lipit peroksidasyonunu başlatan bir radikal olan hidroksil radikale dönüşümüdür. Ancak demirin bu reaksiyonları gerçekleştirebilmesi için ya serbest ya da katalitik olarak aktif olması gerekmektedir. Ancak doğada kompleks halinde olup serbest halde demir bulunması zordur (Hantke, 2001). Xenobiotiklerin birçoğunun ferritinden demiri uzaklaştırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle xenobiotiklerin varlığı reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırabilmektedir. Metal iyonlarının meydana getirdiği reaktif oksijen radikalleri ile toksisite sadece bakterilerde değil aynı zamanda bitki ve hayvan hücrelerinde de ciddi hasarlar meydana getirmektedir. Bu hasarlar genelde nörolojik, hepatolojik veya nefrolojik olmaktadır (Lushchak, 2011).

Metal toksistesine karşı korunmada bakteriler çeşitli moleküler korunma mekanizmalarına sahiptirler. Mikroorganizmalar metal toksistesine karşı 6 temel mekanizma ile korunmaktadır. Bu mekanizmalar; membranın permeabilite bariyerinin ayarlanması, hücre içi veya dışı metallerin dönüştürülmesi, aktif transport

pompaları ile dışarı atılması, enzimatik detoksifikasyon ve metal iyonlarına hücrel hedeflerin hassaslığının azaltılması olarak sayılabilir. Bu mekanizmalar genelde metalin dışarı taşınması veya daha az toksik forma enzimatik olarak dönüştürülmesidir (Silver, 1996). Metallerle karşı mikroorganizmaların direnç mekanizmalarının anlaşılması hem insan sağlığı hemde çevre sağlığı açısından önemlidir. Ancak metal toksisitesi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen farklı stres koşullarında metal toksisitesi ve korunma ağlarının moleküler mekanizmalarının açıklanması noktasında yeterli çalışmalar bulunmamaktadır. Metallerle karşı mikroorganizmaların sahip olduğu korunma mekanizmalarından kısaca bahsedecek olursak; Hg için Mer regülonu ile düzenlenen enzimatik olarak detoksifiye edilmesi, arsenik için enzimatik olarak arsenite dönüştürme ve membranda bulunan protein ile dışarı pompalanması, kadmiyum için dışarı pompalama sistemi, bakır için iki bileşikli fosforlama sistemi ve pompalama ile, krom için hücrel alımını azaltarak korunma söz konusudur. Bu sayılan direnç genleri plazmitler veya kromozomal olarak kodlanmaktadır. Hayati metaller ile ilgili genler genelde kromozomal olup hayati olmayan metallerin dirençleri genelde plazmitler tarafından kodlanmaktadır (Bruins ve ark., 2000). Dışarı atım pompaları ya ATPase veya kemiozmotik olarak çalışır.

Bakır sülfat doğal olarak ortaya çıkan yaygın bir metal tuzudur. Tarım alanları, meyve ve sebzelerdeki bakteriyel ve fungal hastalıkları kontrol etmek için oldukça sık kullanılmaktadır. Aynı zamanda algisit, herbisit, olarak da kullanılmaktadır. Bakır iyonları terminal oksidaz, monooxygenaz, dioxigenaz gibi bir çok enzimin aktif alanlarında gerekli bir metaldir (Lee ve ark., 2005). Ancak fazlası zararlıdır. Reaktif oksijen ajanlarının üretimi ile hidrojen peroksitten serbest radikallerin ortaya çıkması ile sonuçlanan redoks reaksiyonlarını katalizleyebilmektedir. Hücreler bu nedenle bakır iyonlarına karşı spesifik mekanizmalara sahiptir. Cu gibi soft metaller histidin rezidülerinin azotuna, sistein rezidülerinin tiyolatları gibi gruplara kovalent olarak bağlanabilir. Nikel, kurşun, arsenik, çinko, gibi soft metallerde aynı etkiyi göstermektedir (Lee ve ark., 2005). Bütün metal iyonları fazla buldukları takdirde toksik özellik göstermektedir. *E. coli*'de bakır direnci kromozomal kodlanan bakır direnç genleri ile kontrol edilmektedir. Metalleri dışarıya veya içeriye taşıyan

sistemlere sahiptirler. Bunlar ATPaz'lardır. Bu taşıyıcılar monovalent veya divalent metal pompaları olarak bilinir. *E. coli* CopA ATPazı bir efflux pompası olarak hareket eder. CueR bu proteinin regülatörüdür. Ayrıca CusRS bakır iyonlarına cevapda kullanılan iki bileşikli sinyal sistemidir. Bu sistemin kontrol ettiği bakır taşıma genleri mevcuttur. Bu sistem temelde periplazmik bakır'ın uzaklaştırılmasında görevlidir. Bakır'ın süperoksit varlığında hidroksil radikal oluşumuna neden olmaktadır. Bu reaksiyon demirin katalizlediği fenton reaksiyon ile analogtur. Dolayısı ile CuSO₄, *E. coli*'nin SoxR bağımlı SoxS indüseri olarak hareket eder. Bakır toksisitesinin en temel nedeninin reaktif oksijen üretimini sağlaması olarak ifade edilmektedir (Rensing ve Grass, 2003). Yapılan bir çalışmada oksidatif DNA tamir mekanizması veya SOD eksik olan strainlerin bakır varlığına aşırı hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir (Kimura ve Nishioka, 1997; Battistoni ve ark., 2000). Bakır ayrıca NADH dehidrogenaz veya diğer solunum eizmlerini redoks dengesini bozarak etkiler. Bu bilgiler bir nevi yaptığımız çalışmanın literatürel doğrulaması olacaktır. Demir ve bakırın reaktif oksijen radikalleri oluşturduğu net olarak bilinmektedir. Ayrıca ısı şok genleri olan ıbpA ve ıbpB nin kodladığı proteinlerin bakır stresi ile ortaya çıkan oksidatif stresde önemli roller aldığı belirlenmiştir (Matuszewska ve ark., 2008). Bu sonuç global kontrol ağlarında metal direncinde rol oynadığını göstermektedir. Dolayısı ile global kontrol ağlarında yer alan, bir çok metal stresi ile ilgisiz gibi görünen genlerin görevleri olduğu ifade edilebilir.

Kadmiyum biyolojik bir fonksiyonu olmadığı bilinmesine rağmen hücreler tarafından kolayca transfer edilebilmektedir. Fazla miktarda alındığında redoks aktif bir bileşik olmamasına rağmen, potansiyel oksidatif stres ajanı olmak (Vanbogelen ve ark., 1987; Cuypers ve ark., 2010), DNA replikasyonunun inhibisyonu yapmak (Mitra ve ark. 1975), tek iplikli DNA'nın kırılmasına sebep olmak (Mitra and Bernstein, 1977), DNA tamir mekanizmasının bir inhibitörü olmak gibi etkileri vardır. Bakterilerde kadmiyum büyüme oranını azaltır, lag fazını uzatır, hücre yoğunluğunun azalmasına ve hatta doz artışı ile ölümüne neden olur (Sinha ve Mukherjee, 2009). Ayrıca son yapılan bir çalışma kadmiyum stresinin *E. coli*'nin morfolojisinde değişimlere neden olduğunu göstermiştir (Hossain ve ark., 2012).

Ayrıca aynı çalışmada kadmiyum muamelesinin hücre bölünmesinde Z halkası oluşumunu inhibe ederek engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca kadmiyum stresinin *E. coli*'de DNA tamir, ısı şok, soğuk şok, osmotik stres, asit stres, antibiyotik direnci, SOS, stringent cevap sistemi oksidatif stres cevaplarını indüklediği gösterilmiştir (Vanbogelen ve ark., 1987; Blom ve ark. 1992; Ferienc ve ark., 1998; Wang ve Crowley, 2005; Shen ve ark., 2012).

Birçok bakteride civa toksisitesine karşı direnç genleri bulunmaktadır. MerR regülatörü civa yokluğunda baskılanır ve bu regülatör tarafından kontrol edilen bu genler dolayısı ile civa varlığında eksprese edilir. Regülatörün aktivasyonu ortamdaki civa varlığı ile olmaktadır. Civa proteinlerin thiol gruplarına yüksek affinite gösterir. Civa regülatörünün kontrolündeki genler merT, merP, merA, merB, merD dir. (Clarkson, ve ark., 2007; Mason ve ark., 1995; Barkay ve ark., 2003). Arsenik operonunda bir regülatör *arsR* ve kontrol ettiği *arsD*, *arsA*, *arsB*, *arsC* genleri vardır. ArsC toksik formdaki arseniti [As(III)] daha az toksik arsenata [As(V)] indirgemektedir. Bakır için *poc* regülunu görev almaktadır. *pocR* regülatör olarak görev alır ve *pcoABCDSE* genlerini kontrol eder (Brown ve ark., 1995). Kadmiyum içinde aynı şekilde direnç genleri bulunmaktadır. Cd efflux ATPase pompası kadmiyumun dışarı atımından sorumludur. Co ve Zn da Cd mekanizması ile aynı mekanizma tarafından dışarı atılmaktadır (Barras ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada Çinko tip III sekresyon sisteminin fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Mellies ve ark., 2012)

Metal direnci aynı zamanda antibiyotik direnci ile ilişkilidir (Harnett veGyles, 1984, Mcentee ve ark., 1986; Schwarz ve Hobel, 1989; Belliveau ve ark., 1991). Bu nedenle konjugasyon ve transdüksiyun ile direnç genleri aktarılabilmektedir. (Harnett ve Gyles, 1984).

Demir ve bakır fenton reaksiyonları ile hidroksil radikal oluşumunu tetiklerken (PierreveFontecave, 1999), manganın bu reaksiyonu katalizlemediği görülmüştür. (ChetonveArchibald, 1988). Fotosentez, aminoasit metabolizması, aromatik asit

metabolizması, sinyal transdüksiyonu, nükleik asit degradasyonu gibi bir çok metabolik yolda mangan gereklidir (Jakubovics ve Jenkinson, 2001).

Oksidatif stres ile ilişkili olarak SoxRS ve OxyRS regülönü olarak 2 temel regülön görev almaktadır. Bu regülönler süperoksit ve peroksit ile ayrı ayrı düzenlenmektedir (Dempfle, 1996). Süperoksit ile indüklenen stimülön SoxRS olup bu düzenleme ile en az 6 gen kontrol edilmektedir (Storz ve Imlay, 1999). Peroksit ile kontrol edilen OxyRS stimülönüdür. Süperoksit tarafından SoxR ile düzenlenen aktiviteler arasında SOD (*sodA* tarafından kodlanan), DNA tamir enzimi endonükleaz IV (*nfo*) ve fumarazın O_2^- ye dirençli izozimleri (*fumC*) ve akonitas (*acnA*) bulunmaktadır (Jamieson ve Storz, 1997). SoxRS'nin aktivasyonu hücrenin gücünü arttıran glukoz-6-fosfat dehidrogenazın (*zwf*) seviyesini artırır ve demir birikimini azaltan ve ardından OH° oluşumunu azaltan Fur (*fur*) represörünün seviyesini azaltır (Jamieson ve Storz, 1997). *tolC* tarafından kodlanan dış membran proteini, *arcAB* tarafından kodlanan ilaç efflux pompaları ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunu baskılayan MicF, O_2^- seviyesinin artmasına yol açan redoks olarak aktif bileşiklerin ortamdaki elimine edilmesine neden olur (Aono ve ark., 1998). H_2O_2 'nin sebep olduğu aktivitenin çoğunun ekspresyonu OxyR transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir. OxyR ise hidroperoksidaz I (katalaz, *katG*), hidroperoksid redüktaz (*ahpC*), glutaredoksin I (*grxA*), glutathione redüktaz (*gorA*) ve Fur represörünü (*fur*) içermektedir (Jamieson ve Storz, 1997; Tao 1997; Zheng ve ark., 1999). Bunun yanında, H_2O_2 'ye karşı koruma aktivitesi OxyR'nin kontrolü altında olmayan, hidroperoksidaz II (*katE*) ve DNA tamir enzimi olan endonükleaz III (*xthA*), DNA polimeraz I (*polA*) ve Rec A'yı da içermektedir (Imlay ve ark., 1988).

E. coli metal stresinin çalışılması ve moleküler mekanizmasının aydınlatılması için en uygun organizmadır. Bugüne kadar model organizma olarak en fazla çalışma bu organizma ile yapılmıştır. Ayrıca hızlı generasyon zamanı ve toksik kimyasallara karşı çabuk cevap vermesi nedeniyle uygundur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli 1885'de Theodor Escherich tarafından ishalleri sütün çocuklarının dışkılarından izole edilmiştir. 1999'a kadar *Bacterium coli commune* ismi ile tanınmıştır. Bu tarihten sonra Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır (Karlı ve ark., 2010).

2.1.1. Morfoloji ve kimyasal özellikleri

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesindeki diğer bakteriler gibi, gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Kapsül oluşturma özelliği çok nadirdir. Polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren slime tabaka ya da Polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül içerebilirler. Ayrıca bakteriofajlarına göre faj tiplerine ayrılmaktadır ve kolisin tiplerine göre sınıflandırılmaktadır. Kolisin, antimikrobiyal özellikte bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosinler aynı türden diğer suşlara eritici etki yapmaktadırlar (Karlı ve ark., 2010).

Escherichia coli zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak ürer. Optimal üreme nötral pH da 37°C'de olur. 18-44.5°C arasında, pH 5-8 sınırlarında daha yavaş olarak ürer. 44°C'de laktozu fermente edebilmesi ve indol oluşturmaya diğer koliform laktozu fermente eden bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılır (Karlı ve ark., 2010).

Sıvı besiyerlerinde genellikle homojen bulanıklık oluşturur. Katı besiyerlerinde pigmentless S şeklindeki suşlar, 24 saatte, 2-3 mm çapında, ortası kalkık şekilde oluşur (Karlı ve ark., 2010).

Laktozu fermente ve safrayı presipite ettiği MacConkey agar besiyerinde kırmızı renkli koloniler oluştururlar. Eozin Metilen Blue (EMB) agar besiyerinde ise laktozu

fermente ederek metalik refle veren yeşil siyah koloniler oluştururlar (Karlı ve ark., 2010).

Escherichia coli'nin önemli biyokimyasal özelliği glikozdan asit ve gaz oluşturmasıdır (Karlı ve ark., 2010).

Escherichia coli'nin hareket etmeyen, laktozu fermente etmeyen, glikozdan gaz oluşturmayan suşları inaktif suşlar olarak kabul edilir. Bu suşlar birçok özellikleri ile *Shigella* cinsine daha yakın bulunurlar (Karlı ve ark., 2010).

2.1.2. Virülans faktörleri

Escherichia coli'de virülans faktörleri, yüzeyde üretilerek olay yerine taşınanlar ve hücre içinde üretilerek olay yerine taşınanlar olarak ikiye ayrılır. Hücre içinden dış ortama salgılanan virülans faktörleri demirin sınırlı olduğu ortamlarda bakterinin üremesine yardımcı olurlar. Yüzeyde üretilenler ise konak hücrelerin yüzeyine tutunmada rol oynar ve doku invazyonu, biyofilm oluşumu veya sitokin indüksiyonu gibi ilave rolleri de olabilen farklı fimbria şekillerinden oluşur (Sağlık Bakanlığı, 2005).

2.1.3. Direnç

Escherichia coli dirençli bir bakteridir. Oda ısısında uygun ortamda uzun süre canlı kalabilir. 60°C ısıda 30 dakika yaşayabilir. Dezenfektanlara karşı direnç geliştiremez. *Escherichia coli*'nin, brillant yeşili, malaşit yeşili, sodyum tetrasyonat, fuksin, bizmut sitrat, sodyum deoksikolat, sodyum sülfat, safra, safra tuzları, selenit tuzlarına karşı daha az dirençleri olmasından yararlanılarak *Salmonella* ve *Shigella* gibi bakterilere selektif besiyerleri geliştirilmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2005).

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, biyolojik sistemde prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak bilinir. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilirler. Genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Fakat hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, reaktif oksijen bileşikleri (ROB) ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, bu sebeple DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel makromoleküller zarar görür (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011).

Serbest radikaller, atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron (e^-) taşıyan moleküller olarak bilinir. Serbest radikal oluşumunun fazlalaşması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine maruz kalmamak için antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazen mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011).

2.2.1.Serbest radikaller

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, lipid peroksit ve nitrik oksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O^2) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkili olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale gelir. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırır ve lipid peroksidasyonu hızlandırır.

Katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (Mercan, 2004).

2.2.1.1.Süperoksit radikali

Aerobik hücrelerde oksijen bir elektron alarak indirgenir ve sonucunda serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir (Yüzereroğlu, 2011)



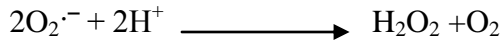
Süperoksit, bir serbest radikaldir ve direkt olarak hücreye fazla zarar vermez. Asıl önemli olan görevi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksil radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturmak üzere protonlanır (Yüzereroğlu, 2011)

Süperoksit anyonu oksitleyici ve redükleyici özelliğe sahiptir. Redükta olarak görev yaptığında bir elektron kaybeder böylece oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise bir elektron alır ve hidrojen peroksite indirgenir. Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiğinde biri okside olurken diğeri indirgenir, oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir (Yüzereroğlu, 2011)

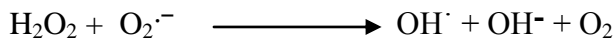


2.2.1.2.Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijeni oluştururlar (Yüzereroğlu, 2011)



Hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidandır ve membrandan kolayca geçebilenir. Hidrojen peroksit paylaşılmamış elektron taşımadığı için bir serbest radikal değildir ve reaktivliği sınırlıdır. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Yüzereroğlu, 2011)



2.2.1.3.Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali meydana gelir (Yüzereroğlu, 2011)



Çok reaktif bir oksidandır. Yarılanma ömrü kısadır. Oluştığı yerde hasar oranı yüksektir. Farklı moleküllerden bir proton koparır ve yeni radikallerin oluşumuna sebep olur (Yüzereroğlu, 2011)

2.2.1.4.Singlet oksijen

Singlet oksijenin ($^1\text{O}_2$) paylaşılmamış elektronu yoktur. Radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelir ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur (Yüzereroğlu, 2011).

2.2.2. Antioksidanlar

Farklı mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmayı oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” denir. Doğal antioksidanlar arasında enzimler (superoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz-GP, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myoglobin, haptoglobilin) ve mikromoleküller (β -karoten, Avitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, tiol içerenler, glutation (GSH), N-asetil sistein, metionin, ubiguinon, kaptopril) sayılabilir. Antioksidanların oksidanları etkisiz hale getirme yöntemleri aşağıdaki gibidir (Gökpınar ve ark., 2006).

- Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha güçsüz yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Makromoleküller ve antioksidan enzimler bu yolla etki eder (Gökpınar ve ark., 2006).
- Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Ağır mineraller hemoglobin ve serüloplazmin oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder (Gökpınar ve ark., 2006).
- Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, timetazidin, flavanoidler ve mannitol bu şekilde etki eder (Gökpınar ve ark., 2006).
- Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar (Gökpınar ve ark., 2006).

2.2.2.1.Süperoksit dismutaz (SOD)

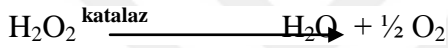
Süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen perokside parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler manganez (SodA veya MnSOD), demir (SodB veya

FeSOD), bakır ve çinko (SodC veya CuZnSOD) gibi metal iyon kofaktörlerine sahiptir (Altaş, 2009).



2.2.2.2.Katalaz (Catalaze)

Katalaz enziminin görevi; hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Bu sayede H_2O_2 'ten Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalının oluşumu engellenir (Kayış, 2010).



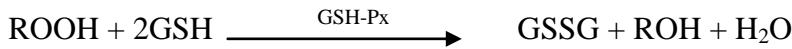
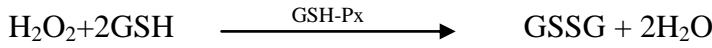
E. coli hücrelerinde iki tip katalaz enzim üretimi gerçekleşir. Çift aktiviteli katalaz-peroksidaz (HPI) ve monofonksiyonel katalaz (HPII) şeklindedir. HPI ve HPII katalazlarının üretimi birbirinden bağımsız olup HPI sentezi büyüme ortamına hidrojen peroksit ilavesiyle başlatılır. HPII sentezi büyüme evresinin durağan fazında gerçekleşir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

- ***katG***: HPI katalazını kodlayan *katG* geni, oksidatif strese cevap olarak uyarılan OxyR regülonu tarafından kontrol edilir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).
- ***katE***: HPII katalazını kodlayan *katE* geninin kontrol mekanizması farklıdır ve pozitif efektör olarak fonksiyonel katF genine ihtiyaç duyar (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

2.2.2.3.Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

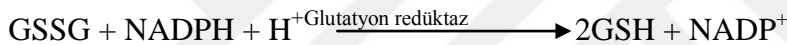
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur ve 4 selenyumatomu içerir. Tetramerik yapıdadır (Altınışik, 2000).

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir (Altınışık, 2000).



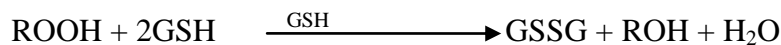
2.2.2.4. Glutasyon redüktaz

Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutasyona (GSH) dönüşümünü katalizeleyen enzimdir (Altınışık, 2000).



2.2.2.5. Glutasyon S-transferazlar (GST)

Glutasyon S-transferazlar (GST), başta araşıdonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterir ve bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar (Altınışık, 2000).



2.2.3. Oksidatif stres regülatörleri

2.2.3.1. OxyR regülону

OxyR polipeptidi, 34 kDa kütleyle sahiptir ve solusyonda tetramer yapıdadır. OxyR LysR familyasına ait bir proteindir ve nitrosothiollerden sorumludur. OxyR tarafından aktive edilen genler dps (DNA ve demir bağlama proteini), gorA (GSH redüktaz), grxA (glutaredoksin), ahpCF (alkil hidroperoksit-NADPH oxidoredüktase), katG(peroksidaz) ve fur içerir. Bu yapıların çoğunun, katalaz

tarafından hidrojen peroksitin uzaklaştırılması ve oksidatif ataklardan Dps proteinleri vasıtasıyla DNA'nın korunması gibi hücrelerin antioksidan savunmasında rolleri olduğu görülmektedir (İdil, 2006).

2.2.3.2. SoxRS regülonu

SoxR, MerR familyasının transkripsiyonel aktivatörlerine aittir. Solusyonlarda bir dimer formundadır. Her monomer 2Fe-2S'lik grup içerir. SoxR proteini soxS promotorunun -10 ve -35 arasında bulunan sistein grubuna lokalize olmuştur. Alışılmamış olan bu pozisyon soxS promotorunun -10 ve -35 hexamer yapısının sonuna 19 bp uzaklıkta bir mesafededir (İdil, 2006).

Bu regülonlar paraquat veya nitrik oksit ile aktifleştirilir. Gram-negatif bakterilerde kromozomlar tarafından kodlanan "efflux" sistemleri (*marRAB*, *acrAB*, *soxRS* genleri) direnç gelişiminde önemli rol oynar (İdil, 2006).

- **soxR:** Bu genin ürünü SoxR proteini DNA 'ya özel bir bölgeden bağlanır. *soxR* genini aktive eder. Bu sayede SoxS protein miktarını artırdığı tespit edilmiştir (İdil, 2006).
- **soxS:** Bu genin direkt etkilendiği, molekül ağırlığı 12,9 kDa olan küçük düzenleyici protein SoxS, transkripsiyon aktivasyonunda diğer proteinlerin katılımına engel olmaktadır (İdil, 2006).

2.3. Ağır Metaller

Ağır metaller atom ağırlığı 63.546g/mol ile 200.590g/mol arasında olan elementlere denir. Özgül ağırlıkları 4kg/dm³'ten büyüktür. Canlı organizmalarda bakır (Cu), mangan (Mn), kobalt (Co), demir (Fe), molibden (Mo), ve çinko (Zn) gibi ağır metaller eser miktarda bulunur. Ancak kadmiyum (Cd), krom (Cr), arsenik (As), civa (Hg), kurşun (Pb) gibi bazı ağır metallere gereksinim göstermezler ve yapılarında bu metaller yoktur (Güner, 2008).

Organizma için gerekli olan elementlerin, canlılarda normal gelişim ve biyolojik işlevlerin sürdürülebilmesi için gerekli olan eser derişimlerin üzerinde bulunmaları durumunda olumsuz etkiler yapmaktadır. Cd ve Pb gibi gerekli olmayan elementlerin düşük derişimlerde bile toksik etki yaptıkları bilinmektedir(Güner, 2008).

Metaller kovalent ve iyonik bağlar ile hücresele çeşitli komplementerler ile ilişkiye girmektedir. Yüksek miktarda bulunan elementler esansiyel miktarda olsun yada olmasın hücre mebranlarına, enzim spesifikliğine, DNA nın yapısına hasar verdiği ve hücresele fonksiyonların dağılmasına neden olduğu bilinmektedir (Güner, 2008).

2.3.1.Mikroorganizmalarla ağır metal adsorblanma mekanizması

Mikroorganizmalarla metal adsorbsiyon kinetiği iki basamaktan oluşur. Birinci basamak organizma yüzeyinde fiziksel adsorbsiyon veya iyon değişimidir. Bu basamağa genellikle pasif giderim denir. Bu basamak çok hızlıdır ve mikroorganizma metal ile etkileştikten kısa bir süre sonra denge oluşur. Hızlı giderme genellikle yüzey adsorbsiyonu sonucudur. Mikroorganizmanın, sulu ortamdan hücre yüzeyine metal adsorblamasını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler vardır (Güner, 2008).

- Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanlarıyla kompleks oluşturarak ve pozitif yüklü reaksiyon alanlarıyla yer değiştirerek adsorblanmaktadır. Bu olaya iyonik adsorbsiyon adı verilir. Hücre duvarındaki polisakkaritler sülfat, karboksil ve amino gruplarını içerir (Güner, 2008).
- Bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözeltiden metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir (Güner, 2008).

- Hücre duvarındaki proteinler metali bağlamak için aktif bölgeler oluştururlar. Ağır metallerin proteinlere karşı yüksek ilgisi vardır. Proteinlerin peptid bağlarının azot ve oksijeni, hidroksil, amino, fosfat gibi grupları, iyonların metal iyonlarıyla yer değiştirmesi için uygundur. Amfolit karakterde olan proteinlerinde, molekülün türüne özgü belirli bir izoelektrik pH' ı vardır. Pozitif yüklü metal iyonlarının izoelektrik noktanın altında katyonik bir karakter taşıyan protein moleküllerinin içerdiği grupların aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirdikleri, izoelektrik noktanın üstündeki pH'larda ise negatif yüklü reaksiyon alanlarıyla kompleksler oluşturarak adsorblandıkları düşünülmektedir. Yani ortam pH'ının ağır metal adsorbsiyonunda etkin bir parametre olması öngörülebilir (Güner, 2008).
- Bazı mikroorganizmaların yüzeylerinde yüksek molekül ağırlıklı polifosfatlar yada kimyasal olarak bunlara benzeyen gruplar, metali kompleksleri şeklinde kendilerine bağlarlar. Örneğin *Citrobacter cp* hücrelerinde bulunan organik fosfattan, inorganik fosfatı serbest bırakan fosfataz enzimi ağır metalin, hücreye bağlı metal fosfat olarak çökmesini sağlar. Günümüze kadar yapılan çalışmalar göstermektedir ki kullanılan mikroorganizmanın hücre tipi ve içerdiği temel bileşenler metal adsorbsiyon mekanizmasını belirlemektedir. Metal alımında ikinci basamak, metal iyonlarının hücre zarında içeriye doğru taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır. Bu basamağa aktif giderim basamağı denir (Güner, 2008).

2.3.2.Ağır metallerin özellikleri

2.3.2.1.Bakır (Cu)

Atmosfer koşullarında metalik gri tonunda bulunmayan bakır, M.Ö. 5000 yılından itibaren tanınmaktadır ve adını bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın latinesinden (aes cyprium=Kıbrıs cevheri, cyprium ve daha sonra Cuprum) almıştır (Yazoğlu, 2010).

Bakır genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya yayılımı açısından “Atmofil” (hava sever) grupta yer almaktadır. Bakır “Lithofil” (kaya sever) elementler gibi suda çözünerek çok geniş bir alana dağılabilir. Bu nedenle de çevresel açıdan iki grubun arasında değerlendirilir (Kartal ve ark., 2004).

Bakırın canlılar üzerindeki etkisi, kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişir. Küçük ve basit yapıları canlılarda zehir özelliği gösterirken büyük canlılar için temel yapı bileşenidir. Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit, biosit, anti bakteriyel madde ve böcek zehiri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılır (Kartal ve ark., 2004).

2.3.2.2.Kobalt (Co)

Adını ortaçağ avrupa madencilerinin kalay ve kurşun madenlerinin üretimi esnasında oluşan, ergimeyen ve metalin kullanılmasını engelleyen katı yapı nedeniyle maden ruhu, şeytan anlamına gelen “Kobold” tanımlamasından almıştır. M.Ö. 2000’li yıllardan itibaren kobalt bileşikleri cam ve emayede mavi boya olarak kullanılmıştır. Havadaki toz halinde bulunan kobaltın solunması ve kobalt tuzlarına deri teması neticesinde kobalt zehirlenmesi gerçekleşir. Toz halinde alınan kobalt akciğerlerde çözünerek kana ve idrara karışır (Kartal ve ark., 2004).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, kobalt metalinin, suda çözünür kobalt bileşiklerinin kansere neden olduğu kanıtlanmıştır (Kartal ve ark ., 2004).

2.3.2.3.Nikel (Ni)

Nikel ilk olarak 1751’de Axel Cronstedt adlı bir İsveçli mineralojist tarafından, gersdorfit (NiAsS) cevheri araştırılırken bulunmuştur. Nikelin başlı başına bir element olduğu 1775’de Torbern Bergman ve arkadaşları tarafından kanıtlanmıştır. 1830’larda “Alman Gümüşü” olarak bilinen bakır-nikel-çinko alaşımları Almanya ve İngiltere’de büyük miktarlarda üretilmiştir (Kartal ve ark., 2004).

Saf nikel kimyasal katalizör olarak elektrolitik kaplamada ve alkali pillerde, pigmentler, madeni para, kaynak ürünleri, mıknatıslar, elektrotlarda, elektrik fişlerinde, makine parçaları ve tıbbi protezlerde kullanılmaktadır (Kartal ve ark., 2004).

Nikelin bilinen biyolojik fonksiyonu olmamakla beraber az oranda zehirleyici özelliği vardır. Doğal yayınımla beraber insan aktivitelerine bağlı olarak doğada bulunmaktadır (Kartal ve ark., 2004).

2.3.2.4.Çinko (Zn)

Kompleks cevherlerden yapılan bakır bazlı alaşımların üretiminde ortaya çıkmıştır. M.Ö. 1000 yıllarında Çinliler ve 14. yy da Hindistanlılar metalik çinko üretmişlerdir. Avrupa'da Löhyenns ilk kez Goslar da metali bulmuştur (1617) ve isminide vermiştir. İlk çinko üretimi destilasyonla yapılmış ve işletmesi 1743' de Bristol' de açılmıştır (Yazoğlu, 2010).

Çinko metali ve birçok bileşiği diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında zehirlilik etkisi düşüktür. Tuzlarının toksikliği çinkodan daha fazla, yapısında bulunduğu bileşiğin anyonik kısmının toksikliğine bağlıdır (Yazoğlu, 2010).

Diğer taraftan, çinko insanlar ve tüm bitki formları ile hayvan yaşamları için oldukça önemli ve yaşamsal elementlerden biridir. Gelişme, deri bütünlüğü ve fonksiyonu, bağışıklık gücü, yumurta olgunlaşması, yara iyileşmesi ve karbohidrat, yağ, protein, nükleik asit sentezi ya da degradasyon gibi çeşitli metabolik prosesler için gereklidir. Alkol dehidrojenazı, karbonik anhidraz ve karboksipeptidaz gibi 70' den fazla metalo- enzim fonksiyonu için ko-enzim bileşeni olarak gereklidir. Fizyolojik miktarlarda olan çinko Cd, Hg ve Pb gibi diğer ağır metal iyonlarının zehirleyici etkilerini azaltmaktadır (Yazoğlu, 2010).

2.3.2.5. Alimünyum (Al)

Alüminyum yer kabuğunda en çok bulunan metaldir. Yumuşak ve hafif, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, amfoter ve aktif olması, ömrünün uzunluğu, dış etkenlere (korozyon vb.) ve değişik iklim şartlarına karşı dayanıklılığı, düşük bakım maliyetleri, kolay şekillendirilebilmesi, renklendirilebilmesi ve teknolojik açıdan ürün çeşitliliği alüminyumun alternatif özellikleridir. Bu nedenle alüminyum 21. yüzyıl metali olarak görülmektedir (Akman ve ark., 2014).

2.3.2.6. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum nadir olan bir elementtir ve doğada saf olarak bulunmaz. Önemli bir kirlenici olmasının nedeni çok az miktarda dahi toksik olması ve biyolojik yarı ömrünün uzun olmasıdır (Gelegen ve Yeşilada, 2000).

Radikal oksijen türleri ve radikal üretimi akut kadmiyum toksisitesinde bir mekanizma olarak gösterilmektedir. Kültür hücrelerinde kadmiyum süperoksit anyonu, nitrik oksit ve H₂O₂ üretimine yol açar ve bunlar farklı yollarla kadmiyuma maruz kalan hayvanların plazma, beyin, akciğer, karaciğer ve böbreklerinde oksidatif hasar ve lipid peroksidasyon oluştururlar. VitE ve beta-karoten ise CdCl₂'ün zararlı etkilerini azaltır (Mercan, 2004).

Bakterilerde Cd büyüme oranını azaltır, lag fazını uzatır, hücre yoğunluğunun azalmasına ve doz artışıyla ölümüne sebep olur (Mercan, 2004).

2.3.2.7. Civa (Hg)

Civa toprakta karbonat, fosfat ve sülfid şeklinde çözünürlüğü düşük formlar oluşturarak hareketsiz (immobilize) hale geçmektedir. Bu elementin buharları ve bütün bileşikleri zehirlidir. Çevreye yayılan civanın en önemli kaynakları tarımda kullanılan fungusitler ile metalik civanın buharlaşmasından oluşan atmosferik kirlenmedir (Okçu ve ark., 2009).

Birçok bakteride civa toksisitesine karşı direnç genleri vardır. Civa regülatör MerR'nin kontrolündeki genler *merT*, *merP*, *merA*, *merB*, *merD*'dir (Okçu ve ark., 2009).

2.3.2.8.Manganez (Mn)

Manganezin diğer bir ismi mangan'dır. Manganez, günümüzde sanayi dalında kullanılan oldukça önemli bir element olmakla birlikte, elementin bulunuş tarihi günümüze yakın dönemlere rastlamaktadır. 1774 tarihinde İsviçreli bir bilim adamı olan, Carl Wilhelm Scheele tarafından bulunmuştur. Elementin kimyasal özelliklerine bakılacak olunursa, kimyasal davranış bakımından elementin demire benzer olduğu görülmektedir. Element, yüksek sıcaklıklarda oksijen ya da hava ile yanmaktadır. Bu özellik bakımından, element demire oldukça benzemektedir. Elementin suyu, ayrıştırma özelliği bulunmaktadır (Şimşek, 2011).

2.3.2.9.Molibden (Mo)

Molibden geçiş metallere olup saf halde gümüşümsü beyaz renkli ve çok serttir. Erime sıcaklığı oldukça yüksektir. Az miktarda ilavesiyle çeliğin daha da sertleştirilmesi sağlanabilir. Molibden bitkilerin beslenmesinde de önemli olup bazı enzimlerde yer alır. Biyolojik fonksiyonları genelde bakır metabolizması ile ilişkilidir (Kan, 2015).

Molibdenin nitrojenaz enziminin yapısında yer alır. Düşüklüğü halinde nodülasyonu doğrudan olumsuz bir şekilde etkilediğini bilinmektedir (Kan, 2015).

2.3.2.10.Kurşun (Pb)

Kurşun, periyodik tablodaki elementlerden biri olup, simgesi Pb ve atom numarası 82'dir. Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zarar veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun madenleri ve metal endüstrileri, akü ve pil

fabrikaları, petrol rafinerileri, boya endüstrisi ve patlayıcı sanayi atık sularında da istenmeyen konsantrasyonlarda kurşun kirliliğine rastlanır. Tek hücreli canlıların ve balıkların 0,04 – 0,198 mg/l inorganik kurşun içeren suları tolere edebildikleri ancak daha düşük miktarlarda kurşunun besin yoluyla alınmasında akut zehirlenme gösterdikleri bilinmektedir (Kahvecioğlu ve ark., 2004).

2.3.2.11.Krom (Cr)

Krom, Yunan dilinde renk anlamına gelen chrome'den alınmıştır. Sert parlak ve gümüşi renkte bir metale verilen isimdir. Atom numarası 24, atom ağırlığı 51,996'dır. Yer kabuğunun doğal bileşenlerinden biri olan krom; kimya, metalurji ve refrakter sanayinin temel elementlerinden biridir (Tekelioğlu, 2010).

Krom, doğada Cr²⁺ - Cr⁶⁺ oksidasyon basamaklarında bulunur. Ancak Cr³⁺ ve Cr⁶⁺ formları biyolojik olarak önemlidirler. En toksik olan formu heksavalandır (Kromat) (Tekelioğlu, 2010).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* yabani tip ve mutant suşları yurt dışından temin edildi (Japon Ulusal Genetik Merkezi). Elde edilen suşlar ve bu çalışmada yapılan suşlar Tablo 3.1' de sunulmuştur. Yurt dışından temin edilen bu suşların antibiyotik dirençleri PCR ile doğrulandı. %20 gliserol (Merck) içeren LB stokları hazırlandı ve -80 °C'de derin dondurucuda (Panasonic) saklandı.

3.2. Besiyerleri

3.2.1. Nutrient agar besiyeri

Besiyeri yaşam deneylerinde koloni sayımı için kullanıldı. 20 g Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda eritilerek 121 °C' de 15 dk otoklavda (Nüve) steril edildi.

3.2.2. Nutrient broth besiyeri

Nutrient broth besiyeri, bakteri kültürlerinin üreme ortamı olarak kullanıldı. 8 g Nutrient broth (Merck) tartılarak 1 L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.3. LB agar besiyeri

Transdüksiyon, transformasyon deneylerinde ve mutant suşların +4°C' de buzdolabında saklanması için kullanıldı. 25 g LB (Merck) ve 15 g agar (Merck) tartılarak 1L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.4. LB broth besiyeri

Transdüksiyon, transformasyon ve yaşam deneylerinde kullanıldı. 25 g LB tartılarak 1L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.5. Soft agar

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. 1 g tripton (Merck), 0,5 g yeast extract (Merck), 0,6 g KCl (Merck), 0,7 g agar tartılarak 100 ml distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi. Elle tutulabilir sıcaklığa geldiğinde 1ml % 50' lik glukoz (Riedel-de haén) çözeltisi ve 0,2 ml 1M CaCl₂ (Merck) eklendi.

3.2.6. DM agar

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. 1,4 g K₂HPO₄ (Merck), 0,4 g KH₂PO₄ (Merck), 0,1 g Na₃C₆H₅O₇ (Merck), 0,2 (NH₄)₂SO₄ (Merck), 3 g agar tartılarak 200 ml distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi. Elle tutulabilir sıcaklığa geldiğinde 0,4 ml 1M MgSO₄ (Merck), 0.8 ml % 50' lik glukoz çözeltisi, 2 ml 10 mM FeSO₄ (Merck), 0,2 ml 20 mg/ml tiamin (Sigma) ve uygun antibiyotik eklendi petrilere dökülerek hazırlandı.

3.2.7. SOB medium

Transformasyon deneyinde kullanıldı. 4 g bacto tryptone (BD), 1 g yeast extract, 0,4 ml 5M NaCl (Emsure), 0,25 ml 2M KCl 200 ml distile suda eritildi ve pH metre ile (Ohaus) pH 7' ye ayarlandı. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.8. SOC medium

Transformasyon deneyinde kullanıldı. Bir örnek için 1,96 ml steril SOB medium içerisine 20 µl 2M Mg (Merck) ve 14,4 µl % 50' lik glukoz çözeltisi eklenerek hazırlandı.

3.2.9. IPTG ve X-GAL'li besiyeri hazırlama

0,1 M IPTG stoğundan 20 µl ve 20 mg/ml X-gal stoğundan 40 µl alınarak 15 ml' lik LB besiyerine eklendi.

Tablo 3.1.Çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları.

Suş Numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabancı tip	Lab stok
JW1721	BW25113 <i>katE</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW3914	BW25113 <i>katG</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW4023	BW25113 <i>soxS</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW4024	BW25113 <i>soxR</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW3879	BW25113 <i>sodA</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1648	BW25113 <i>sodB</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1638	BW25113 <i>sodC</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1841	<i>BW25113 zwf</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW0598	<i>BW25113 ahpC</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1700	<i>BW25113 btuE</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW3933	<i>BW25113 oxyR</i> ::km	Keio Koleksiyonu
	<i>W3110 katE</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 katG</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 soxS</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 soxR</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodA</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodB</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodC</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 zwf</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 ahpC</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 btuE</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 oxyR</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 katE</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>katE</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 katG</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>katG</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 soxS</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>soxS</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 soxR</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>soxR</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodA</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>sodA</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodB</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>sodB</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 sodC</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>sodC</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 zwf</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>zwf</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 ahpC</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>ahpC</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 btuE</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>btuE</i>	Bu çalışmada yapıldı
	<i>W3110 oxyR</i> ::km <i>pnt3</i> :: <i>oxyR</i>	Bu çalışmada yapıldı
Plazmitler		
b1732	<i>pnt3</i> :: <i>katE</i>	Mobil Plazmit
b3942	<i>pnt3</i> :: <i>katG</i>	Mobil Plazmit
b4062	<i>pnt3</i> :: <i>soxS</i>	Mobil Plazmit
b4063	<i>pnt3</i> :: <i>soxR</i>	Mobil Plazmit
b3908	<i>pnt3</i> :: <i>sodA</i>	Mobil Plazmit
b1656	<i>pnt3</i> :: <i>sodB</i>	Mobil Plazmit
b1646	<i>pnt3</i> :: <i>sodC</i>	Mobil Plazmit
b1852	<i>pnt3</i> :: <i>zwf</i>	Mobil Plazmit
b0605	<i>pnt3</i> :: <i>ahpC</i>	Mobil Plazmit
b1710	<i>pnt3</i> :: <i>btuE</i>	Mobil Plazmit
b3961	<i>pnt3</i> :: <i>oxyR</i>	Mobil Plazmit

3.3. *Escherichia coli* W3110 Mutantlarının Eldesi

Keio koleksiyondan elde edilen Tablo 3.1’de verilen *E. coli* BW25113 suşlarından hedef 11 gen bölgesi yabancı tip *E.coli* W3310’a Kobayashi vd. (2000) nin kullandığı *P1kc* fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarıldı ve bu şekilde çalışmada kullanılan 11 mutant *E. coli* W3110 elde edilerek kullanıldı.

3.3.1 *P1kc* fajı ile transdüksiyon

4 ml LB brot içerisine 1M CaCl_2 ’den final konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde ve 25 mg/ml olarak hazırlanmış kanamisin (Sigma) antibiyotiğinden final konsantrasyonu 25 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde eklendi. Tek bir bakteri kolonisinden besiyerine ekim yapıldı ve O.D_{600} değeri 0,4-0,45 absorbansa (Genesys) gelene kadar 37 °C çalkalamalı inkübasyona (WiseBath) bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında O.D_{600} değeri 0,4- 0,45 olan bakteriden steril bir cam tüp içerisine 0,2 ml ve *P1kc* fajından 10 μl konuldu. 37 °C’ de 20 dk inkübatörde (nüve) bekletildikten sonra üzerine yaklaşık 50 °C olan soft agardan 2,5 ml ve %50’lik glukozdan 25 μl eklendi ve karıştırıldı daha sonra LB agar üzerine dökülerek petrinin yüzeyine yayıldı. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 37 °C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası petriye 2ml LB broth ve 2-3 damla kloroform (Merck) eklendi. Daha sonra 2 saat boyunca 4 °C’ de aralıklarla çalkalanarak bekletildi. 1,5 ml’ lik ependorflara petrideki sıvı bakteri kültüründen 1 ml alındı ve üzerine 50 μl kloroform eklenerek 12000 rpm’ de 5 dk 4 °C’ de santrifüj edildi. Süpernatant(*P1kc*) +4 °C’ de saklandı.

P1kc fajını elde ettikten sonra 5 ml LB brot içerisine yabancı tip *E.coli* W3110 suşundan tek koloni ekim yapıldı. O.D_{600} değeri 0,3’ e gelene kadar 37 °C’ de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1,5 ml’ lik ependorflara 1 ml aktarıldı

ve 10000 rpm' de 10 dk 0 °C' de santrifüj (Termal) edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml yıkama tamponu eklendi ve tekrar 10000 rpm' de 10 dk 0 °C' de santrifüj edildi. Yine supernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml yıkama tamponu eklendi.

Alıcı hücre olan yabancı tip *E.coli* W3110 içerisine uygun oranda P1kc fajı eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakikadan fazla bekletildi. Vortex (Wisemix) yapılarak 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 0,1 ml yıkama tamponu eklendi. Km' li DM agar üzerine hücreler aktarıldı. DM agar sıvıyı absorbe edene kadar oda sıcaklığında bekletildi. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakteriler DM agardan Km' li LB agara seçilerek aktarıldı. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.3.1.1. Yıkama tamponu

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. Steril olarak bulunan 9,88 ml LB brot, 0,1 ml % 50' lik glukoz çözeltisi ve 20 µl CaCl₂ karıştırıldı.

3.3.2. Transformasyon

3.3.2.1. Plazmid izolasyonu

Tablo 3.1' de verilen plazmidlerden ayrı ayrı 5 ml' lik LB broth içerisine tek koloni ekimi yapıldı. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen bakteri kültürleri ayrı ayrı 5 adet, 1,5 ml' lik ependorf içerisinde 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Plazmid izolasyonu İnvitroGen Purelink Quick Mini Prep plazmid izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Ticari olarak elde edilen kitin prosedürü kullanılarak plazmid

izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidin bir kısmı miktar tayini için kullanıldı ve elde edilen plazmidler -20°C ' de saklandı.

3.3.2.2. Miktar tayini

5 μl izole edilen plazmid 1 μl yükleme boyası ile boyandıktan sonra agaroz jelde yürütülerek (Cleaver) jel görüntüleme cihazında görüntülendi. Bant büyüklükleri ve kalınlığı GeneRuler marka DNA Ladder mix belirtece bakılarak karşılaştırıldı ve yaklaşık olarak miktarı belirlendi.

3.3.3. Transformasyonun yapılışı

2 ml LB brot içerisine 25 mg/ml km' den 2 μl eklendi ve ardından çalışmada yapmış olduğumuz Tablo 3.1' de verdiğimiz W3110 mutantlarının bu besiyerine ayrı ayrı ekimi yapıldı. 37°C ' de bir gece inkübasyona bırakılarak transformasyon için ön kültür hazırlandı.

Ertesi gün steril 9,9 ml SOB medium üzerine steril 100 μl 2 M Mg^{+2} , 10 μl 25 mg/ml km ve hazırlanan ön kültürden 50 μl eklenerek O.D₆₀₀ değeri 0,3' e gelene kadar 37°C ' de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı.

Aseptik koşullarda hücreler steril 10 adet santrifüj tüpüne aktararak 5 dk buzda soğutuldu. 12000 rpm' de 5 dk 4°C ' de santrifüj edildi. Supernatantlar atıldı. 2 santrifüj tüpüne 1 ml 0,1 M soğuk CaCl_2 eklenerek 10 ayrı santrifüj tüpündeki peletler 2 ayrı santrifüj tüpüne toplandı. Yeniden süspanse edilerek 10 dk buzda bekletildi. 12000 rpm' de 5 dk 4°C ' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüp başına 0,1 M soğuk 200 μl CaCl_2 eklendi. Daha sonra yeniden süspanse edildi. 30 dk buzda bekletildi.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 μl kompetent hücre üzerine 10-100ng olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda plazmit konularak 30 dakikadan fazla

buzda bekletildi. Daha sonra hücre süspansiyonları cam tüpe aktarıldı. 42 °C' de 2 dk ısı şoku uygulandı ve 2 dk buzda bekletildi. 0,8 ml SOC medium eklenerek 37 °C' de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Transfer hücrelerinin 0,5ml'si 1,5 ml' lik ependorflara alındı. 5000 rpm 1 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 100 µl SOC medium eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Uygun antibiyotik içeren LB agar üzerine yayıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.3.3. Primer sulandırma

10 mM Tris-HCl (Merck) 1 mM EDTA (Sigma) ile hazırlanan pH 7,5 TE kullanıldı. +4°C' de saklanan primerler çıkarıldı. pH 7,5 TE' den nanomolüne göre 10 kat sulandırıldı. 5-10 dakika çözünmesi beklendi ve daha sonra mini spin atırıldı. 10 µl bir ependorfa alındı ve 90 µl 10mM pH 7,5 Tris-HCl eklendi. -20°C' de dondurucuda saklandı.

3.3.4. Koloni PCR

Transdüksiyon ve transformasyon sonrasında elde ettiğimiz mutantların doğrulamasında koloni PCR yöntemi kullanıldı. Bunun için elde edilen mutantlar 20 µl distile su içinde süspansiyon edildi ve 2,5 µl si 0,2ml'lik PCR tüpüne konuldu. Bakteri süspansiyonu üzerine Tablo 3.2 deki reaksiyon karışımından 7,5 µl dağıtıldı.

Tablo 3.2.Bir örneklik koloni PCR reaksiyon karışımı.

10x ThermaPol Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 µl
10mM dNTP Mix	0,2 µl
10µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
2mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µl
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µl
dH ₂ O	4,65 µl

Tablo 3.3.PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Evrensel K1 geri primeri	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'
Evrensel C1 geri primeri	5' TTATACGCAAGGCGACAAGG 3'
W3310:: <i>katE</i> ileri primeri	5' TCTGGCTGGTGGTCTATAGT 3'
W3310:: <i>katG</i> ileri primeri	5' TCTCTAACGCTGTGTATCGT 3'
W3310:: <i>soxS</i> ileri primeri	5' TCCATAAATCGCTTTACCTC 3'
W3310:: <i>soxR</i> ileri primeri	5' TGCCTCTTTTCAGTGTTTCAG 3'
W3310:: <i>sodA</i> ileri primeri	5' CTGCTTACGCGGCATTAACA 3'
W3310:: <i>sodB</i> ileri primeri	5' TTTGCTACCCTATCATACG 3'
W3310:: <i>sodC</i> ileri primeri	5' TGGGGTACGACGTACCGTAA 3'
W3310:: <i>zwf</i> ileri primeri	5' ACAGTTTTTCGCAAGCTCGTA 3'
W3310:: <i>ahpC</i> ileri primeri	5' GGAAACGCATTAGCCGAATC 3'
W3310:: <i>btuE</i> ileri primeri	5' GTTAAAAGCAGGACGTTAGC 3'
W3310:: <i>oxyR</i> ileri primeri	5' GTCAGAATGCTTGATAGGGA 3'
perR delesyon ileri primeri	5'GCTCCAAATATGAGGCAGGTTAAATTTCCGTGCACATT CTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'
perR delesyon geri primeri	5'TGCCTGATGCGACGCTAGTGCGTCTTATCAGGCCTACA AACATATGAATATCCTCCTTAGT 3'
pnt3 mobil plazmid ileri primeri SP6	5' ATTAGGTGACACTATAG 3'
pnt3 mobil plazmid geri primeri 21M13	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'

3.3.5. Agaroz jel elektroforezi

%1'lik agaroz hazırlamak için 1 gr agaroz (Sigma) ve 100 ml 1x TBE kullanıldı. Mikrodalga'da ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Üzerine 10 mg/ml EtBr (Sigma) stoğundan 1 µl EtBr eklendi. Elektroforez cihazının (Peqlab) tankına hazırlanan agaroz jeli döküldü. Donduktan sonra 5 µl DNA 1 µl loading dye (Sigma) ile karıştırılarak jele yüklendi.

3.4. Stok Madde Hazırlama

3.4.1. TBE hazırlama

10x TBE hazırlamak için 54 gr TRİS (Ultrapure), 0,5 M pH 8 EDTA 20 ml, 27,5 gr borik asit (Merck) kullanıldı. Üzerine 500 ml saf su eklendi.

3.4.2. TE hazırlama

1 M Tris-HCl' den final konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde 2ml, 0,5 M EDTA'dan final konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde 400 µl konuldu ve üzerine 200 ml saf su eklendi.

3.4.3. Tris-HCl hazırlama

1M Tris-HCl hazırlamak için 15,76 g/mol Tris-HCl tartılıp üzeri 100 ml distile su ile tamamlanır. X-gal Hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid) X-gal (Sigma), 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanıldı. 100 mg X-gal 5ml DMF (dimetilformamit)' de çözüldü. 1,5ml'lik ependorflara 1' er ml konularak etrafi folyolandı ve daha sonra -20 °C' de saklandı.

3.4.4 Fosfat tamponu hazırlama

Yaşam deneylerinde kullanıldı. 0,1M NaH₂PO₄ (Merck) ve Na₂HPO₄ (Merck) ayrı ayrı hazırlandı. pH metrede (Heidolph) 5.5, 7 ve 8 olacak şekilde iki çözelti kullanılarak pH'lar ayarlandı. 0,1M'lık stoklar 0,01M haline getirilip 50ml'lik erlenlerde kullanıldı. Otaklavlanıp deneyler için hazır hale getirildi.

3.4.5. IPTG hazırlama (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid)

IPTG (Sigma) 0,1 M olarak hazırlandı. 0,238 gr IPTG ile 9,9 ml saf su çözdürüldü. Daha sonra filtre edilerek steril edildi. 1,5ml'lik ependorflara 1'er ml aktarıldı. Etrafı folyolonarak -20 °C' de saklandı.

3.5. MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerinin Belirlenmesi

3.5.1. Kimyasalların hazırlanması

Çalışmamızda kullanacağımız maddelerin (CuSO₄ (Sigma), ZnSO₄ (Sigma), NiSO₄ (Sigma), CoSO₄ (Sigma), MnSO₄ (Sigma), AlSO₄ (Sigma), PbSO₄ (Sigma), CdSO₄ (Sigma), AsCl₃ (Sigma), CrCl₂, Mo (Sigma), Hg₂Cl₂ (Sigma) 0.1 Molarlık çözeltileri hazırlandı. MIC değerlerinin yarısı deneylerde kullanıldı.

3.5.2. Bakterilerin inkübasyonu

Mutant bakterilerimiz olan *sodA*, *sodB*, *sodC*, *katE*, *katG*, *ahpC*, *zwf*, *btuE*, *oxyR*, *soxR*, *soxS* 5ml'lik nutrient brothlu tüplere ekildi. 1 gece, yaklaşık 18 saat boyunca 37°C de, 130 rpm'de büyütüldü.

Spektrofotometrede bakterilerin absorbanı ölçüldü. 600nm'de OD: 0.1 olacak şekilde ölçüm yapıldı. OD' si 0.1 olan tüpten 400µl alınarak önceden steril olarak hazırlanan 60ml lik nutrient brota ilave edildi.

3.5.3. Seri sulandırma

Önceden steril ettiğimiz seri sulandırma yapılacak olan tüplerin ilkinde 1800 µl diğerlerine 1000 µl bakterili besi yeri konuldu. Sonrasında ilk tüpe 200 µl stok kimyasal maddeden ilave edildi ve vortex yapıp 1000 µl diğer tüpe aktarıldı. Bu şekilde yarı yarıya (%50) seri sulandırma yapıldı. En son tüpteki 1000 µl dışarı atıldı. Seri sulandırma yapılan bütün tüpler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 1 gün sonra alınan tüplerde üremenin olup olmadığı kontrol edildi. Üremenin olmadığı son tüp belirlendi. Normalde bu tüp MIC değeri olarak kabul edilmektedir. Fakat biz tam değer bulabilmek amacı ile üremenin olmadığı son tüp ve üremenin olduğu tüp arasında farklı konsantrasyonlar deneyerek tam bir MIC değeri tespit ettik. Hazırladığımız bütün maddelerde bu işlem gerçekleştirildi ve MIC aralığı belirlendi.

MIC aralığını belirledikten sonra tam değerini bulabilmek için stok maddeden besiyeri ve mikroorganizmanın bulunduğu tüplere toplamda 1000 µl olacak şekilde nokta atışı yapıldı. Örneğin 1 µl madde, 999 µl bakterili besi yeri koyuldu ve böylece tam değeri belirlendi.

3.6. Farklı pH’lardaki Fosfat Tamponunda Yaşam Deneyleri

Metallerin hesaplanan MIC değerinin yarısı ile hazırlanan pH 5.5, pH 7.0 ve pH 8.0’deki fosfat tamponunda yaşam deneyleri yapıldı. Öncelikli olarak belirlenen konsantrasyon ile yabancı tipte örnek alım zaman aralıklarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. 5 ml besiyerinde üretilen yabancı tip *E. coli* santrifüj edilip fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra yaklaşık 5×10^5 başlangıç bakterisi olacak şekilde 100 ml fosfat tampon içerisine aktarıldı. Birer saatlik zaman aralıklarında örnekler alınarak yayma plak yöntemi ile bakteri sayımları yapıldı. En az 2 logaritmik azalmanın görüldüğü zaman dilimine kadar örneklemeye devam edildi. Optimizasyon ile zaman aralıkları belirlendikten sonra mutantlar ile deneyler yapılmaya başlandı. Yabancı tip ile mutantlar arasında anlamlı bir fark ortaya çıktığında ilgili genin komplementi ile deneyler tekrarlanarak farkın nakavt edilen genden kaynaklandığının ispatı sağlanmış oldu.

Yaşam deneyleri tamamlanan örnekler ile ilgili tablolar oluşturuldu. Öncelikle zamana karşı bakteri log değerleri hesaplandı. Daha sonra diğer bir tabloda 2 log. azalmaya karşılık gelen t_{99} değerleri hesaplanıp ayrı bir tabloda gösterildi.

T_{99} ve $-K$ değerleri Chandran Abhirosh'e (2012) göre hesaplandı.

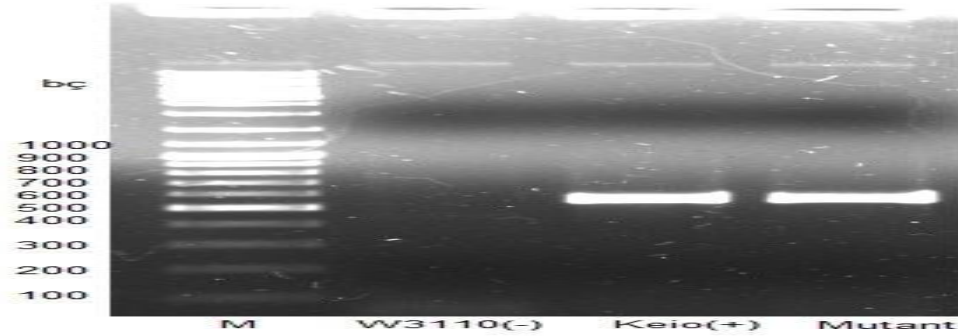
3.7. Katı Besiyerinde Metallerin Etkisi

Farklı bakteri sayılarında metallerin etkisine bakıldı. Petri plaklarına çeşitli molarlarda hazırladığımız metallerin olduğu nutrient agar besiyerleri döküldü. Petrilerin arkalarına damlamaların düzgün bir şekilde yapılabilmesi için 10^1 den 10^7 ye kadar olacak şekilde küçük kareler çizildi. 5ml besiyerinde bir gece inkübasyon ile üretilen yabani tip ve mutantlar 1,0 absorbansa spektrofotometrik olarak ayarlandıktan sonra ringer ile yıkama işlemi yapıldı. 1000 μ l bakteri olan ilk tüpten 100 μ l alınarak 900 μ l lik ringer çözeltilisine aktarıldı. Yani 1 e 9 oranında ringer çözeltilisinde seri sulandırma yapılmış oldu. Bu işlem 10^7 olana kadar yapıldı. Sonrasında hazırladığımız petri plaklarındaki kutucuklara 5 μ l alınarak damlatıldı. Yayma plak metodu ile bakteri sayımı da gerçekleştirildi.

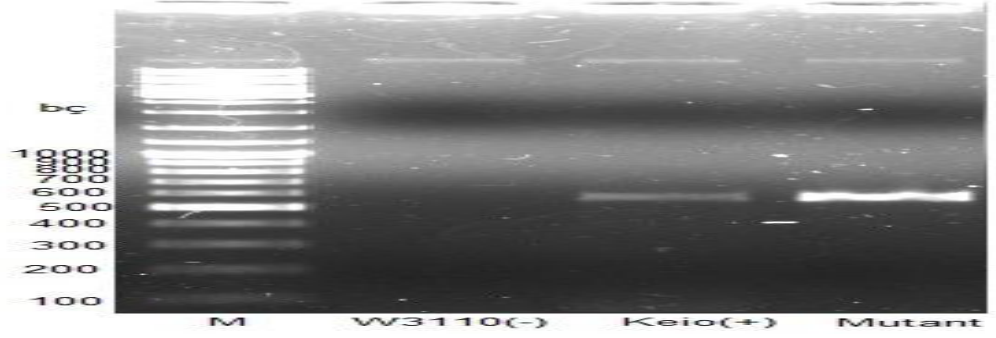
4. BULGULAR

4.1. Mutantların Elde Edilmesi

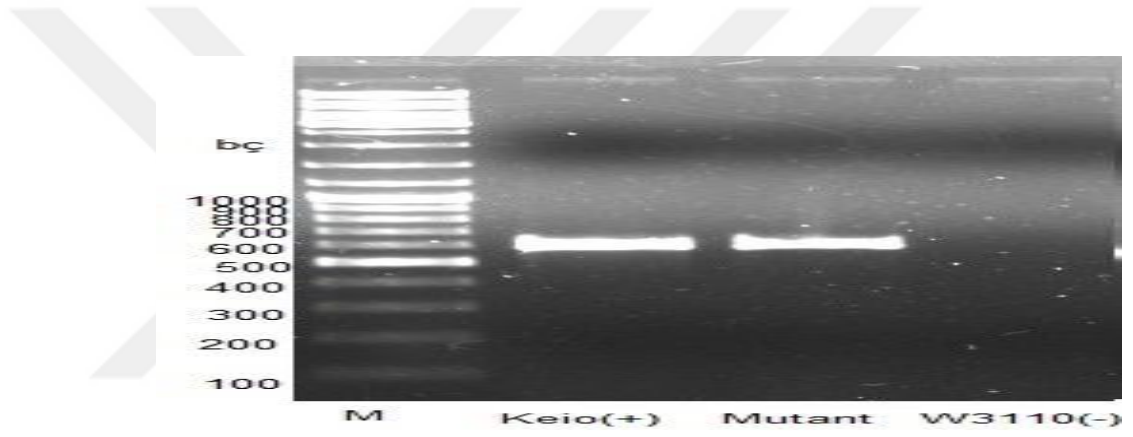
Transdüksiyon sonrasında Xgal-IPTG'li ortamda mavi koloni veren tek koloni bakteriler Km besiyerine ekildikten sonra buradan seçilen kolonilerden Tablo 3.3' deki her bir gen için kendisine ait ileri primer ve k1 primerleri kullanılarak PCR yapıldı. Elde edilen mutantların PCR görüntüleri verilmiştir. Negatif kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak keio koleksiyondan alınan mutantlar kullanıldı. Şekiller de görüldüğü gibi f-k1 primerleri ile elde edilen 580 bç büyüklüğünde *katE::km* (Şekil 4.6), 550 bç büyüklüğünde *katG::km* (Şekil 4.7), 590 bç büyüklüğünde *soxS::km* (Şekil 4.9), 580 bç büyüklüğünde *soxR::km* (Şekil 4.10), 550 bç büyüklüğünde *sodA::km* (Şekil 4.1), 570 bç büyüklüğünde *sodB::km* (Şekil 4.2), 600 bç büyüklüğünde *sodC::km* (Şekil 4.3) ve *zwf::km*, 570 (Şekil 4.11) bç büyüklüğünde *ahpC::km* (Şekil 4.4), 581 bç büyüklüğünde *btuE::km* (Şekil 4.5), 590 bç büyüklüğünde, *oxyR::km* (Şekil 4.8) mutantları bulunmaktadır.



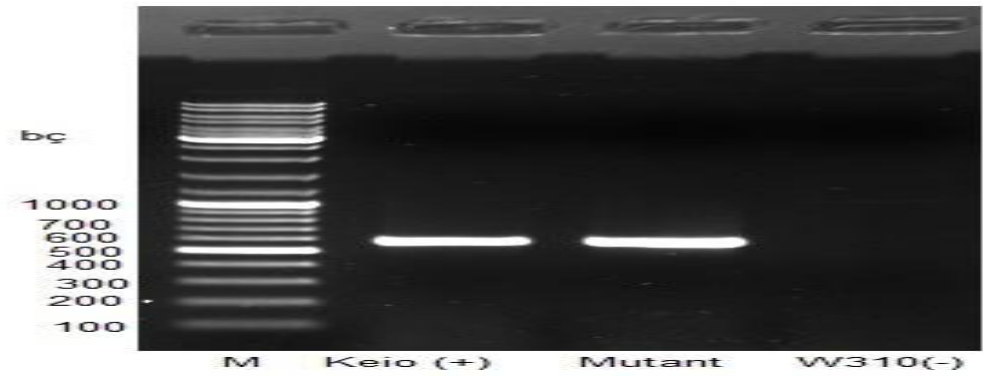
Şekil 4.1. Yabancı tip *E. coli* ve *sodA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



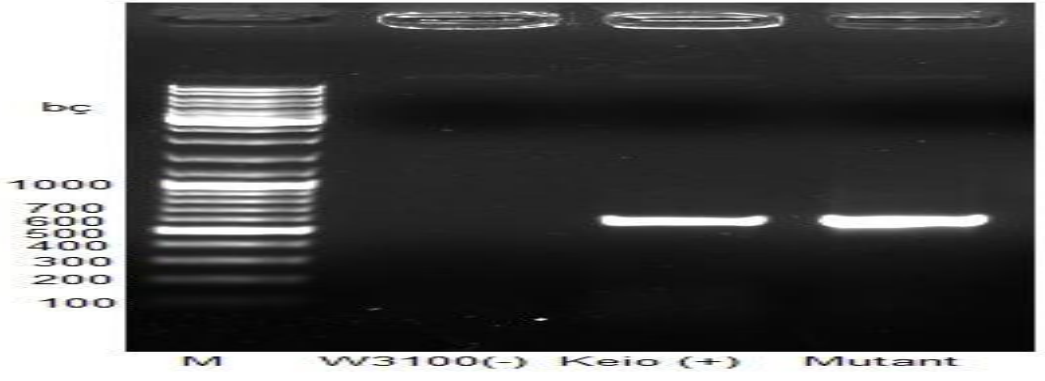
Şekil 4.2. Yabani tip *E. coli* ve *sodB* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



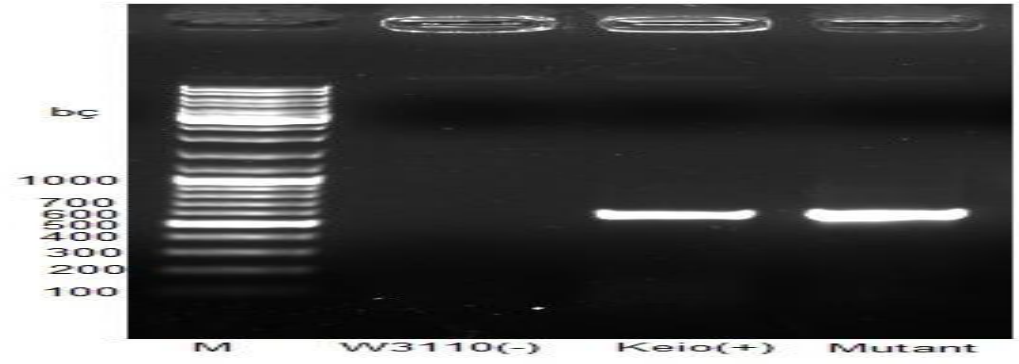
Şekil 4.3. Yabani tip *E. coli* ve *sodC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



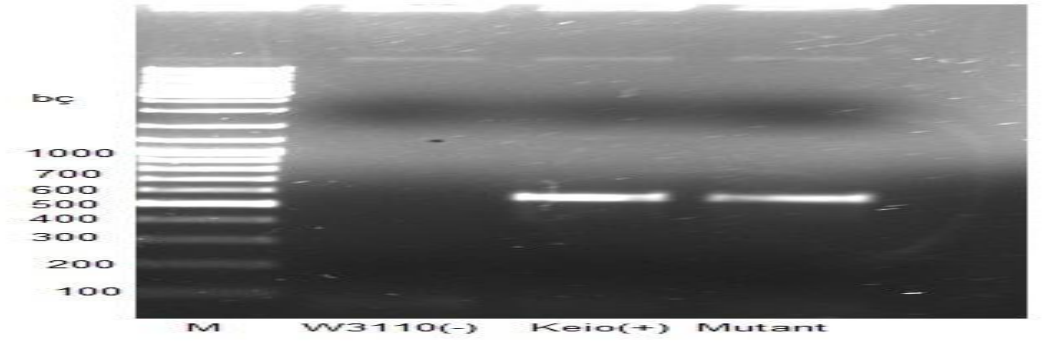
Şekil 4.4. Yabani tip *E. coli* ve *ahpC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



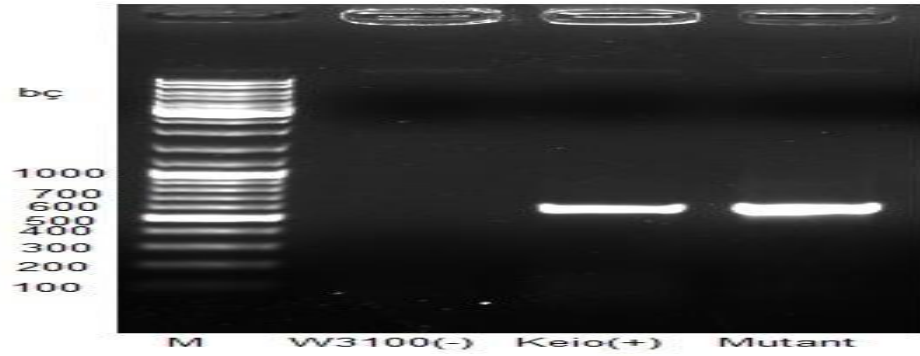
Şekil 4.5. Yabani tip *E. coli* ve *btuE* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



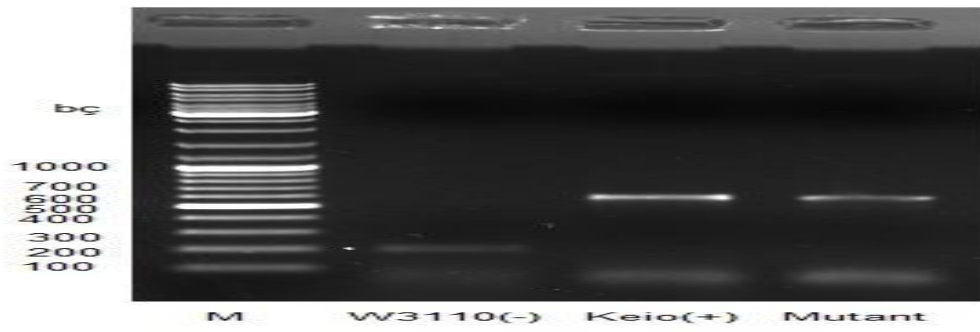
Şekil 4.6. Yabani tip *E. coli* ve *katE* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



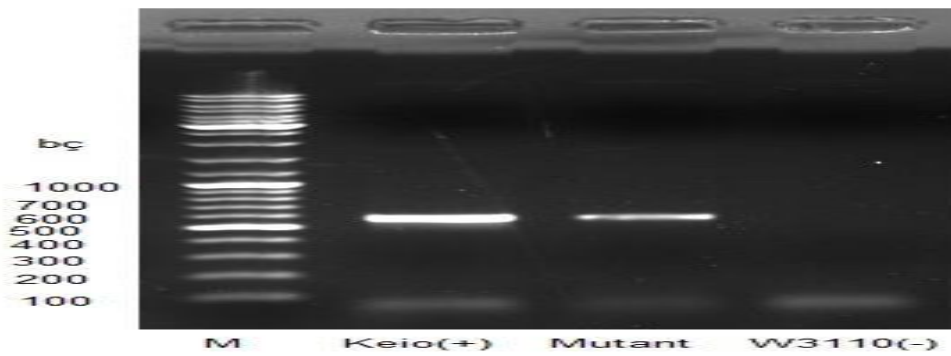
Şekil 4.7. Yabani tip *E. coli* ve *katG* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



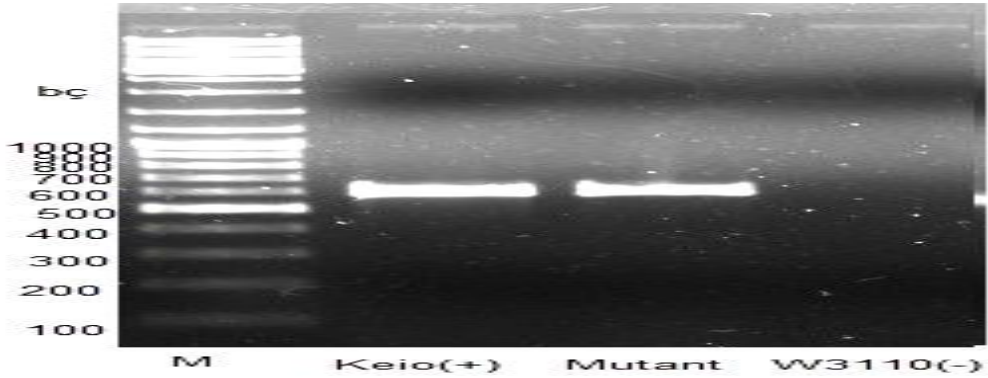
Şekil 4.8. Yabani tip *E. coli* ve *oxyR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.9. Yabani tip *E. coli* ve *soxS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



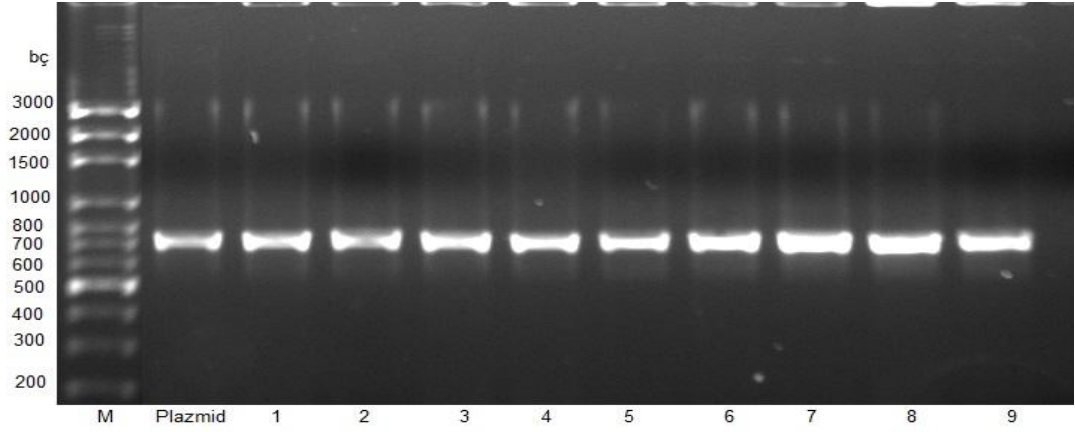
Şekil 4.10. Yabani tip *E. coli* ve *soxR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



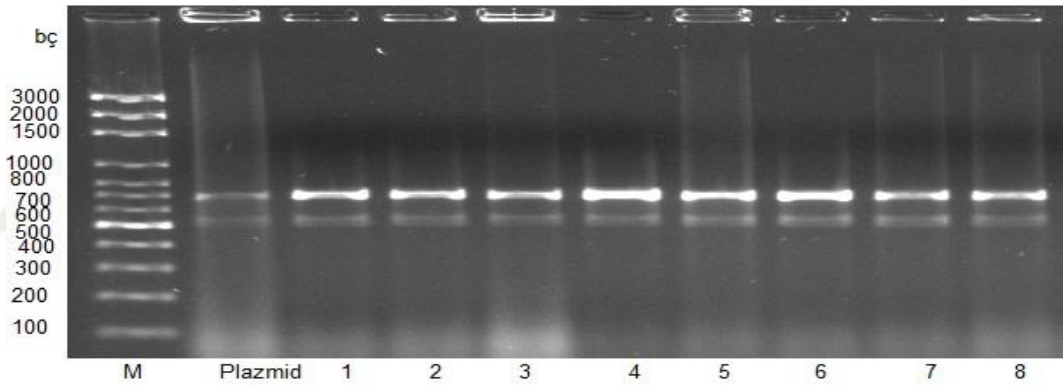
Şekil

4.11. Yabani tip *E. coli* ve *zwf* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

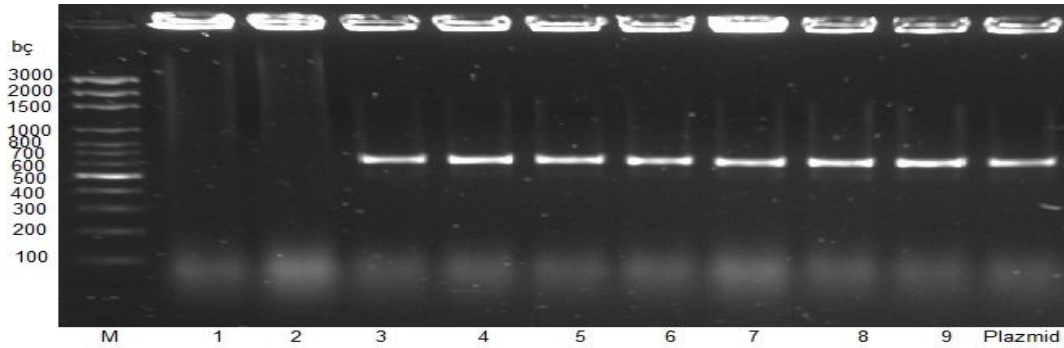
Tamamlama testleri için yukarıda elde ettiğimiz mutantlara keio koleksiyondan temin edilen ve ilgili genleri içeren plazmitler izole edilip transforme edildi. Transformasyon sonrasında oluşan koloniler uygun antibiyotik kontrolünün ardından PCR ile doğrulandı. Seçilen kolonilerden Tablo 3.3' de yer alan ve mobil plazmidler için evrensel olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PCR ile doğrulama yapıldı. Elde edilen mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PCR görüntüleri Şekil 4.12-4.22' de verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan *pnt3::sodA* mutanı 659 bç (Şekil 4.12), *pnt3::sodB* mutanı 718 bç (Şekil 4.13), *pnt3::sodC* mutanı 558 bç (Şekil 4.14), *pnt3::ahpC* mutanı 600 bç (Şekil 4.15), *pnt3::btuE* mutanı 588 bç (Şekil 4.16), *pnt3::katE* mutanı 2298 bç (Şekil 4.17), *pnt3::katG* mutanı 2217 bç (Şekil 4.18), *pnt3::oxyR* mutanı 954 bç (Şekil 4.19), *pnt3::soxS* mutanı 390 bç (Şekil 4.20), *pnt3::soxR* mutanı 501 bç (Şekil 4.21), ve *pnt3::zwf* mutanı 1512 bç (Şekil 4.22) bant uzunluğuna sahiptir.



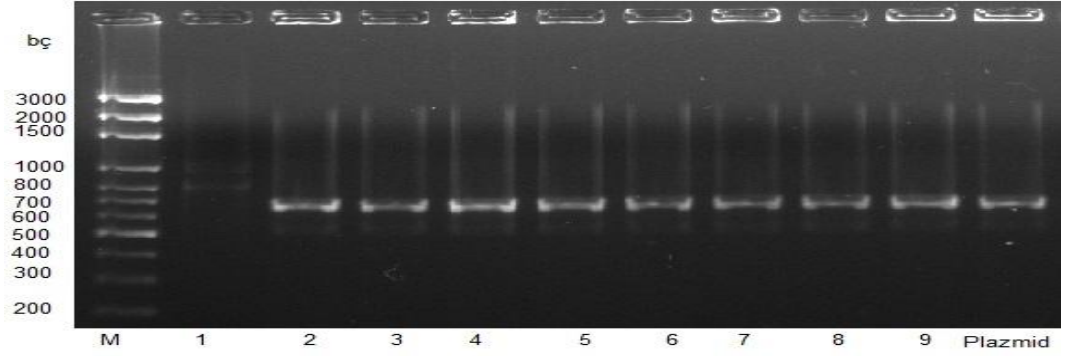
Şekil 4.12. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::sodA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



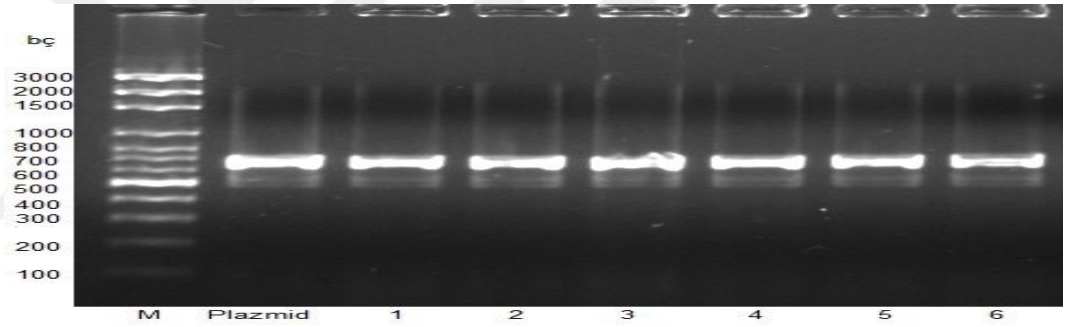
Şekil 4.13. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::sodB* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



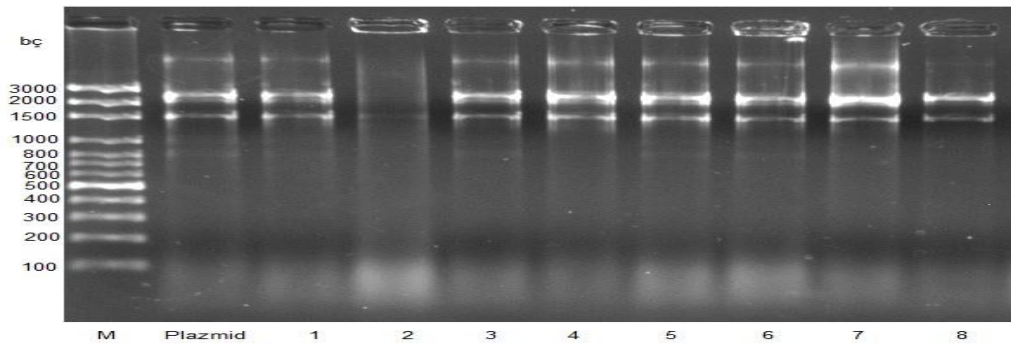
Şekil 4.14. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::sodC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



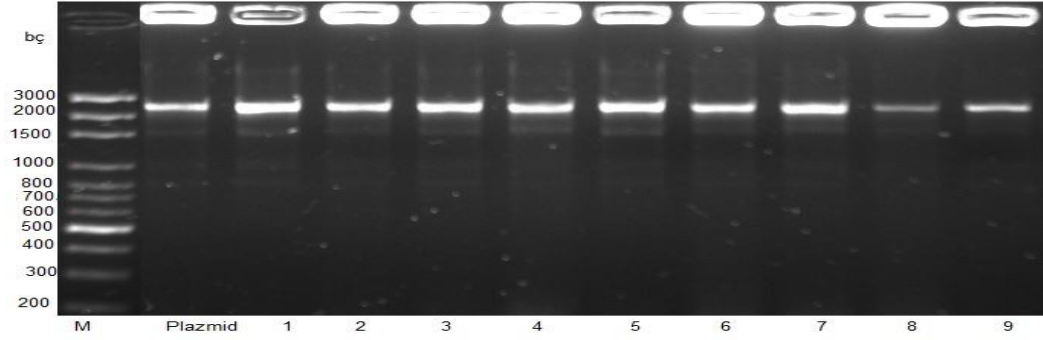
Şekil 4.15. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::ahpC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



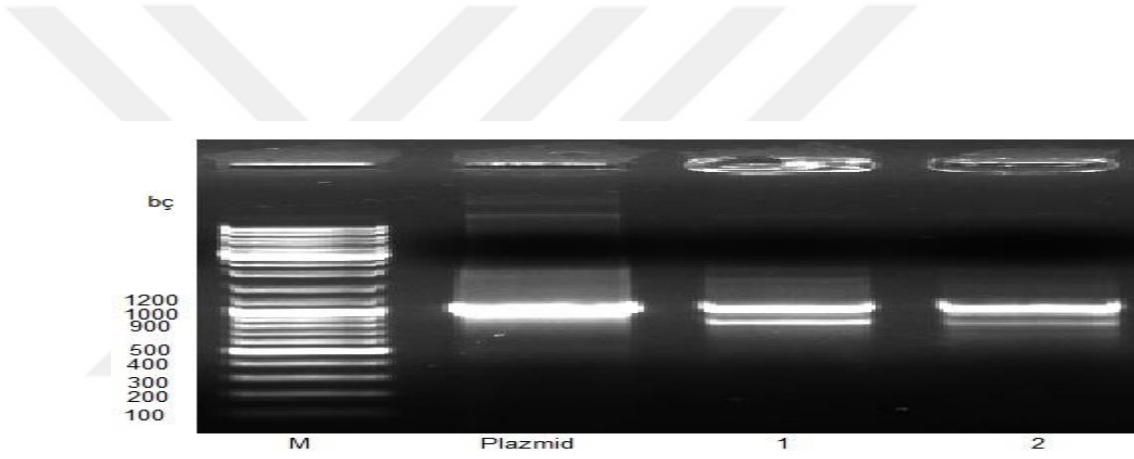
Şekil 4.16. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::btuE* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



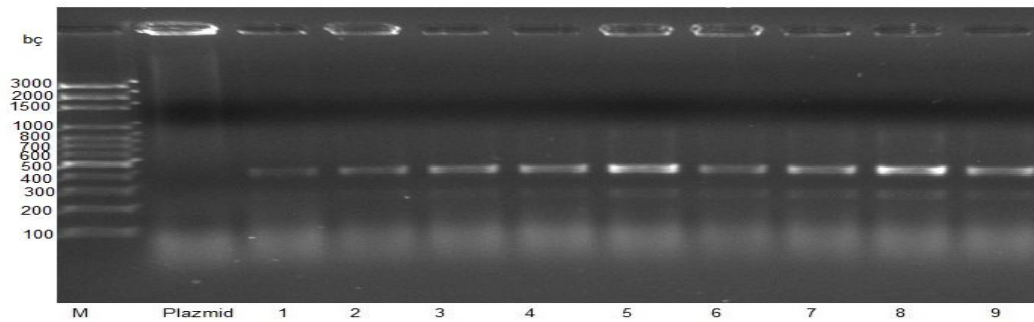
Şekil 4.17. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::katE* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



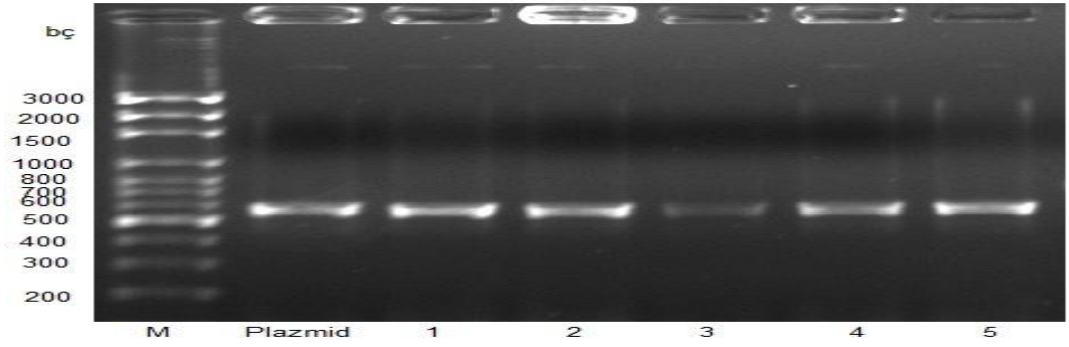
Şekil 4.18. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::katG* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



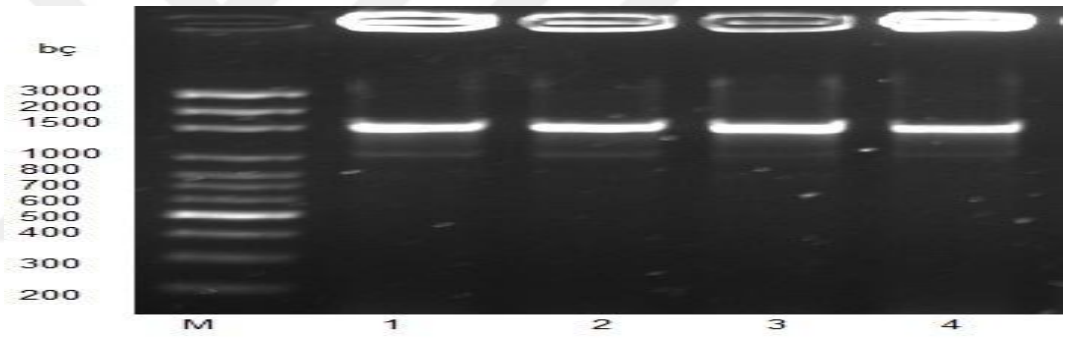
Şekil 4.19. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::oxyR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.20. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::soxS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.21. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::soxR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.22. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::zwf* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü

4.2. MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) Değerleri

Tablo 4.1.Çalışılanmikroorganizmalar için metallerin mıc değerleri (mg/ml)

mg/ml	CuSO ₄	ZnSO ₄	NiSO ₄	CoSO ₄	MnSO ₄	AlSO ₄	CdSO ₄	HgCl ₂	Mo	CrCl ₂	PbSO ₄
<i>E.coli</i>	0,2496	0.172	0.2102	0.224	0.405	0,8825	0.02565	0,0014	1,01	0.083	0.024
<i>sodA</i>	0,2496	0.11501	0.2628	0.1686	0.338	0,8825	0.02565	0,0014	1,01	0,0830	0.024
<i>sodB</i>	0,2496	0.1437	0.2102	0.1124	0.388	0,8825	0.02565	0,0014	1,01	0,0830	0.024
<i>sodC</i>	0,2496	0.1150	0.2102	0.1686	0.338	0,8825	0,03847	0,00182	1,24	0,092	0.0368
<i>katE</i>	0,2496	0.1437	0.2628	0.1686	0.473	0.7564	0,03847	0,0014	1,01	0,092	0.024
<i>katG</i>	0,2496	0.0862	0.2628	0.1686	0.338	0.7564	0.02565	0,0014	1,24	0,0830	0.024
<i>ahpC</i>	0,2496	0.1437	0.2102	0.1686	0.388	0.7564	0,03847	0,0014	1,01	0,092	0.024
<i>zwf</i>	0,2496	0.1437	0.2102	0.1686	0.388	0.6303	0.02565	0,0024	1,01	0,0830	0.024
<i>btuE</i>	0.29952	0.1150	0.3154	0.1686	0.388	0,8825	0,03847	0,0014	1,24	0,0830	0.0368
<i>oxyR</i>	0,2496	0.0287	0.2102	0.1686	0.388	1.0086	0.00100	0,0008	1,01	0,074	0.0126
<i>soxR</i>	0.34944	0.1437	0.1577	0.1686	0.388	1.0086	0,03847	0,0024	0,09	0,083	0.0126
<i>soxS</i>	0.29952	0.1150	0.2102	0.2248	0.405	0,8825	0.02565	0,0014	1,01	0,083	0.0126

Stok kimyasallar hazırlanıp bakteriler inkübe edildikten sonra yapılan seri sulandırmayla elde ettiğimiz veriler Tablo 4.1’de görüldüğü gibi MIC değerleridir.

Elle ettiğimiz bu veriler, yaşam deneylerinde ve minimal medium büyüme gfafigini oluşturduğumuz deneylerde kullanılmıştır.

4.3. Yaşam Deneyi Sonuçları

Tablo 4.2. Kadmiyum sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CdSO ₄		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	80.gün	100.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,69	6,38	5,09	6,00	5,46	4,81
	Ph:7	6,43	6,77	5,22	4,81	4,70	
	Ph:8	6,77	6,04	5,18	4,47	3,84	
sodA	Ph:5.5	6,70	5,51	6,00	5,76	6,20	5,70
	Ph:7	6,58	6,77	6,09	5,77	5,96	
	Ph:8	6,70	5,73	6,01	6,38	5,81	
sodB	Ph:5.5	6,50	5,78	5,40	4,90	0,00	
	Ph:7	6,45	5,70	4,32	4,17	0,00	
	Ph:8	6,35	5,69	4,30	4,00	0,00	
sodC	Ph:5.5	6,60	5,49	6,71	5,77	5,78	5,50
	Ph:7	6,58	6,12	6,03	5,94	5,90	
	Ph:8	6,72	6,38	6,39	5,83	5,46	
katE	Ph:5.5	6,55	5,41	4,60	4,00		
	Ph:7	6,61	6,41	6,60	5,31	4,76	
	Ph:8	6,69	6,47	5,20	5,49	3,95	
katG	Ph:5.5	6,81	6,38	6,06	6,47	5,97	5,55
	Ph:7	6,60	6,17	6,38	6,04	5,58	
	Ph:8	6,69	6,30	5,96	5,93	5,86	
soxR	Ph:5.5	6,61	5,63	5,74	6,47	6,50	6,00
	Ph:7	6,84	6,26	6,50	5,74	5,96	
	Ph:8	6,70	6,30	5,81	6,38	5,97	
soxS	Ph:5.5	6,61	6,50	5,47	5,89	5,68	5,46
	Ph:7	6,65	5,97	6,38	5,75	5,86	
	Ph:8	6,70	5,97	6,04	5,85	5,30	
ahpC	Ph:5.5	6,69	6,85	6,20	6,47	6,38	6,22
	Ph:7	6,73	6,26	6,38	6,17	5,59	
	Ph:8	6,71	6,39	5,92	6,38	5,89	
oxyR	Ph:5.5	6,69	5,85	6,30	5,86	5,88	5,55
	Ph:7	6,86	6,13	6,04	5,56	5,95	
	Ph:8	6,77	6,34	6,39	5,80	5,53	
zwf	Ph:5.5	6,70	6,90	5,57	5,07	4,69	4,40
	Ph:7	6,79	6,43	5,99	5,55	5,32	
	Ph:8	6,77	6,38	6,60	5,93	5,54	
btuE	Ph:5.5	6,69	6,74	5,78	5,68	5,38	5,25
	Ph:7	6,88	6,11	5,77	5,36	5,16	
	Ph:8	6,73	5,82	5,19	4,39	3,78	

Tablo 4.3. Kadmiyum sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

CdSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,0188	106
	Ph:7	0,0216	92
	Ph:8	0,036	55
sodA	Ph:5.5	0,01	200
	Ph:7	0,0077	258
	Ph:8	0,0111	180
sodB	Ph:5.5	0,026	76
	Ph:7	0,038	52
	Ph:8	0,039	51
sodC	Ph:5.5	0,011	181
	Ph:7	0,0085	235
	Ph:8	0,0158	126
katE	Ph:5.5	0,0425	47
	Ph:7	0,0231	86
	Ph:8	0,0342	58
katG	Ph:5.5	0,0126	158
	Ph:7	0,0127	157
	Ph:8	0,0103	194
soxR	Ph:5.5	0,0061	327
	Ph:7	0,011	181
	Ph:8	0,0091	219
soxS	Ph:5.5	0,0115	173
	Ph:7	0,0098	204
	Ph:8	0,0175	114
ahpC	Ph:5.5	0,0047	425
	Ph:7	0,0142	140
	Ph:8	0,0102	196
oxyR	Ph:5.5	0,0114	175
	Ph:7	0,0113	176
	Ph:8	0,0155	129
zwf	Ph:5.5	0,023	86
	Ph:7	0,0183	109
	Ph:8	0,0155	129
btuE	Ph:5.5	0,0144	138
	Ph:7	0,0215	93
	Ph:8	0,0367	54

Tablo 4.4. Kadmiyum sülfatın *E.coli* ve komplementlerinin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CdSO ₄		0.gün	25.gün	50.gün	75.gün	100.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,71	6,11	5,11	5,08	5,01
	Ph:7	6,51	5,89	5,12	4,98	4,70
	Ph:8	6,82	5,38	4,95	4,18	3,91
sodA	Ph:5.5	6,74	6,25	6,12	5,87	5,77
	Ph:7	6,81	6,12	5,96	5,81	5,71
	Ph:8	6,61	6,08	5,81	5,74	5,55
sodB	Ph:5.5	6,11	5,39	4,99	4,22	4,18
	Ph:7	6,18	5,86	4,44	3,75	3,55
	Ph:8	6,12	5,15	4,21	3,81	3,35
sodC	Ph:5.5	6,64	6,11	5,78	5,68	5,61
	Ph:7	6,48	6,05	5,90	5,31	5,12
	Ph:8	6,65	5,52	5,12	5,04	4,86
katE	Ph:5.5	6,52	5,96	5,59	5,33	5,12
	Ph:7	6,58	5,12	4,76	4,78	4,74
	Ph:8	6,71	4,55	3,95	4,11	4,00
katG	Ph:5.5	6,72	6,12	5,97	3,55	5,67
	Ph:7	6,66	6,02	5,44	5,32	5,24
	Ph:8	6,62	5,86	5,31	5,21	5,14
soxR	Ph:5.5	6,67	6,68	6,52	6,38	6,00
	Ph:7	6,81	6,25	5,91	5,87	5,81
	Ph:8	6,71	5,64	5,42	5,34	5,02
soxS	Ph:5.5	6,64	5,87	5,67	5,54	5,48
	Ph:7	6,67	5,96	5,82	5,62	5,32
	Ph:8	6,78	5,57	5,33	5,23	5,14
ahpC	Ph:5.5	6,63	6,52	6,41	6,44	6,31
	Ph:7	6,71	6,18	5,87	5,75	5,60
	Ph:8	6,78	5,94	5,44	5,40	5,38
oxyR	Ph:5.5	6,61	5,96	5,88	5,68	5,51
	Ph:7	6,82	6,08	5,82	5,59	5,54
	Ph:8	6,71	5,96	5,57	5,48	5,44
zwf	Ph:5.5	6,73	6,11	5,69	5,42	4,94
	Ph:7	6,71	5,87	5,37	5,21	4,9
	Ph:8	6,73	5,94	5,52	5,06	4,81
btuE	Ph:5.5	6,63	5,92	5,38	5,28	5,33
	Ph:7	6,82	5,67	5,22	5,20	5,14
	Ph:8	6,71	5,86	5,78	5,02	4,15

Tablo 4.5. Kadminum sülfatın etkisi altında komplemantların t_{99} değerleri

CdSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,017	117,6471
	Ph:7	0,0181	110,4972
	Ph:8	0,0291	68,72852
sodA	Ph:5.5	0,0097	206,1856
	Ph:7	0,011	181,8182
	Ph:8	0,0106	188,6792
sodB	Ph:5.5	0,0193	103,6269
	Ph:7	0,0263	76,04563
	Ph:8	0,0277	72,20217
sodC	Ph:5.5	0,0103	194,1748
	Ph:7	0,0136	147,0588
	Ph:8	0,0179	111,7318
katE	Ph:5.5	0,014	142,8571
	Ph:7	0,0184	108,6957
	Ph:8	0,0271	73,80074
katG	Ph:5.5	0,0105	190,4762
	Ph:7	0,0142	140,8451
	Ph:8	0,0148	135,1351
soxR	Ph:5.5	0,0067	298,5075
	Ph:7	0,01	200
	Ph:8	0,0169	118,3432
soxS	Ph:5.5	0,0116	172,4138
	Ph:7	0,0135	148,1481
	Ph:8	0,0164	121,9512
ahpC	Ph:5.5	0,0032	625
	Ph:7	0,0111	180,1802
	Ph:8	0,014	142,8571
oxyR	Ph:5.5	0,011	181,8182
	Ph:7	0,0128	156,25
	Ph:8	0,0127	157,4803
zwf	Ph:5.5	0,0179	111,7318
	Ph:7	0,0181	110,4972
	Ph:8	0,0192	104,1667
btuE	Ph:5.5	0,013	153,8462
	Ph:7	0,0168	119,0476
	Ph:8	0,0256	78,125

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi kadmiyumun *E.coli* ve mutantları üzerine farklı pH’larda yaşamı yaklaşık 100 gün boyunca takip edilmiştir. Yabanıl tip *E.coli*’nin pH-5.5, 7 ve 8’de yaşam grafiğine bakıldığında bakterinin pH-8’de yaklaşık 55 gün yaşamına devam ettiği görülmektedir (Tablo 4.3). Bunun yanında pH-7’de 92 ve pH-5.5’de 100 günden fazla yaşamına devam ettiği görülmektedir. Tablo 4.2 ve 3 incelendiğinde, kadmiyumun varlığında pH-8’in diğer pH’lardan daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir. Yabanıl tip ile mutantlar karşılaştırıldığında, mutantlar arasında farklı yaşam süreleri olduğu belirlenmiştir.

pH-5.5’de yapılan çalışma incelendiğinde; Yabanıl tip, *sodA*, *sodC*, *katG*, *soxR*, *soxS*, *ahpC*, *oxyR* ve *btuE* türlerinin 100 günden fazla yaşamına devam ettiği görülmektedir. Bunun yanında *sodB*, *katE* ve *zwf* mutantlarının 100 günden daha kısa süre yaşamına devam ettikleri görülmektedir. *sodB* 76 gün, *katE* 47 gün, *zwf* ise 86 gün yaşamına devam etmiştir. Buda bize bu mutantların pH-5.5’de önemli rollerinin olduğunu bize göstermektedir.

pH-7 ortamında yapılan çalışmada ise bakterilerin yine 100 günlük yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Yabanıl tip *E.coli* 92 gün yaşamasına rağmen, *sodB* 52 gün, *katE* 86 gün, yaşamına devam etmiştir. Diğer mutantlar ise önemli bir değişim göstermemiştir. Burada *sodB* ve *katE*’nin pH-7 de bakteri için önemli genler olduğu ifade edilebilir.

pH-8 bakterilerin yaşamını diğer pH’lardan daha fazla etkileyen pH değeri olmuştur. Nitekim *E.coli* 55 gün yaşamına devam etmiştir. Mutantarda da yabanıl örneğe benzer yaşam değerleri belirlenmiştir. Fakat *sodA*, *sodC*, *katG*, *soxR*, *soxS*, *ahpC*, *oxyR*, *zwf* mutantlarının 100 günden daha fazla yaşamına devam ettiği gözlenmiş olmasına rağmen diğer mutantlar yabanıl tip ile benzer yaşam değerleri göstermiştir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.4). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile ilgili genlerin tamamlandığında yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.6. Bakır sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CuSO ₄		0.saat	1.saat	2.saat	3.saat	4.saat	5.saat	6.saat	7.saat	8.saat	9.saat	10.saat
E.coli W3110	Ph:5.5	6,04	4	3,30	0,00							
	Ph:7	6,42	5,90	5,78	5,62	5,60	5,61	5,50	5,20	5,00	4,80	4,55
	Ph:8	6,30	6,15	5,96	5,88	5,80	5,65	5,63	5,33	5,28	5,11	5,02
sodA	Ph:5.5	5,90	3,95	3,30	0,00							
	Ph:7	6,38	6,32	6,04	5,60	5,62	5,39	5,38	5,33	5,15	5,08	4,99
	Ph:8	6,52	6,15	5,96	5,70	5,42	5,30	5,08	5,00	4,98	4,98	4,80
sodB	Ph:5.5	5,20	3,25	0,00								
	Ph:7	5,95	5,87	5,50	5,40	5,07	5,15	5,02	4,88	4,80	4,75	4,60
	Ph:8	6,04	5,90	5,78	5,54	5,22	5,07	5,04	4,95	4,82	4,80	4,78
sodC	Ph:5.5	5,95	4,77	3,90	3,00	0,00						
	Ph:7	6,35	6,20	6,30	5,64	5,54	5,50	5,42	5,36	5,25	5,18	5,07
	Ph:8	6,53	6,06	5,90	5,84	5,84	5,65	5,38	5,30	5,24	5,20	5,18
katE	Ph:5.5	5,30	3,60	3,20	0,00							
	Ph:7	6,44	5,98	5,83	5,78	5,70	5,54	5,52	5,44	5,38	5,28	5,04
	Ph:8	6,52	6,30	5,77	5,75	5,72	5,52	5,36	5,30	5,24	5,20	5,18
katG	Ph:5.5	5,60	4,42	3,32	0,00							
	Ph:7	6,30	5,80	5,72	5,64	5,42	5,44	5,40	5,18	5,07	4,85	4,58
	Ph:8	6,72	6,12	5,86	5,46	5,46	5,40	5,32	5,15	5,11	4,82	4,72
soxR	Ph:5.5	5,66	4,30	4,65	4,60	4,65	4,30	4,07				
	Ph:7	6,52	6,10	5,48	5,50	5,60	5,32	5,20	5,08	4,82	4,76	4,60
	Ph:8	6,48	6,24	6,02	5,89	5,40	5,20	5,18	5,08	5,00	4,90	4,88
soxS	Ph:5.5	5,65	4,95	4,88	3,90	3,00	0,00					
	Ph:7	6,32	6,12	6,07	5,64	5,64	5,45	5,42	5,22	5,18	5,07	5,00
	Ph:8	6,40	5,62	5,86	5,68	5,62	5,50	5,40	5,30	5,20	5,12	5,12
ahpC	Ph:5.5	5,75	5,00	4,77	4,46	3,30	0,00					
	Ph:7	6,56	6,22	6,07	5,62	5,68	5,60	5,52	5,32	5,12	4,90	4,96
	Ph:8	6,56	6,02	5,82	5,78	5,48	5,46	5,46	5,48	5,38	5,22	5,07
oxyR	Ph:5.5	5,20	4,87	4,60	4,77	4,74	4,47	4,62				
	Ph:7	6,44	5,90	5,68	5,69	5,65	5,39	5,44	5,28	5,12	4,90	4,88
	Ph:8	6,38	6,15	5,62	5,32	5,08	5,00	4,92	4,96	4,88	4,75	4,60
zwf	Ph:5.5	5,20	4,60	4,45	3,69	0,00						
	Ph:7	6,36	5,96	5,90	5,80	5,65	5,64	5,41	5,18	4,98	4,72	4,68
	Ph:8	6,52	6,10	5,75	5,50	5,38	5,36	5,34	5,24	5,10	4,88	4,82
btuE	Ph:5.5	5,30	4,40	4,14	3,24	0,00						
	Ph:7	6,44	5,94	5,72	5,44	5,40	5,32	5,30	5,12	4,88	4,70	4,78
	Ph:8	6,38	6,10	5,85	5,78	5,68	5,48	5,42	5,40	5,22	5,08	5,00

Tablo 4.7. Bakır sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

CuSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	1,37	1,45
	Ph:7	0,187	10,69
	Ph:8	0,128	15,625
sodA	Ph:5.5	1,3	1,5
	Ph:7	0,139	14,38
	Ph:8	0,172	11,62
sodB	Ph:5.5	2,25	0,88
	Ph:7	0,135	14,81
	Ph:8	0,126	15,87
sodC	Ph:5.5	0,98	2,04
	Ph:7	0,128	15,625
	Ph:8	0,135	14,81
katE	Ph:5.5	1,05	1,9
	Ph:7	0,14	14,28
	Ph:8	0,134	14,92
katG	Ph:5.5	1,14	1,75
	Ph:7	0,172	11,62
	Ph:8	0,198	10,10
soxR	Ph:5.5	0,268	7,56
	Ph:7	0,192	10,41
	Ph:8	0,16	12,5
soxS	Ph:5.5	0,66	3,03
	Ph:7	0,132	15,15
	Ph:8	0,128	15,62
ahpC	Ph:5.5	0,612	3,26
	Ph:7	0,16	12,5
	Ph:8	0,149	13,42
oxyR	Ph:5.5	0,096	20,83
	Ph:7	0,156	12,82
	Ph:8	0,17	11,76
zwf	Ph:5.5	0,503	3,97
	Ph:7	0,168	11,90
	Ph:8	0,17	11,76
btuE	Ph:5.5	0,686	2,91
	Ph:7	0,166	12,04
	Ph:8	0,138	14,49

Tablo 4.8. Bakır sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CuSO ₄		0.saat	5.saat	10.saat
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,74	2,30	
	Ph:7	6,52	5,78	4,95
	Ph:8	6,38	5,86	5,37
sodA	Ph:5.5	6,13	2,33	
	Ph:7	6,38	6,04	5,11
	Ph:8	6,52	5,76	5,38
sodB	Ph:5.5	6,24	2,01	
	Ph:7	6,33	5,41	4,81
	Ph:8	6,14	5,55	5,01
sodC	Ph:5.5	6,18	3,58	
	Ph:7	6,71	5,30	5,12
	Ph:8	6,66	5,51	5,21
katE	Ph:5.5	6,44	2,25	
	Ph:7	6,48	5,63	5,1
	Ph:8	6,47	5,57	5,22
katG	Ph:5.5	6,13	2,88	
	Ph:7	6,34	6,52	5,14
	Ph:8	6,51	5,74	5,41
soxR	Ph:5.5	6,42	3,15	
	Ph:7	6,72	5,48	5,08
	Ph:8	6,38	5,09	5,14
soxS	Ph:5.5	6,14	3,78	
	Ph:7	6,28	5,12	5,07
	Ph:8	6,41	5,76	5,55
ahpC	Ph:5.5	6,17	3,71	
	Ph:7	6,41	6,01	5,12
	Ph:8	6,48	5,82	5,24
oxyR	Ph:5.5	6,33	3,10	
	Ph:7	6,41	5,60	4,98
	Ph:8	6,58	5,55	5,11
zwf	Ph:5.5	6,14	3,25	
	Ph:7	6,39	5,10	4,78
	Ph:8	6,42	5,52	5,02
btuE	Ph:5.5	6,22	3,24	
	Ph:7	6,34	5,55	4,97
	Ph:8	6,42	5,71	5,14

Tablo 4.9. Bakır sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

CuSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,888	2,252252
	Ph:7	0,157	12,73885
	Ph:8	0,101	19,80198
sodA	Ph:5.5	0,76	2,631579
	Ph:7	0,127	15,74803
	Ph:8	0,114	17,54386
sodB	Ph:5.5	0,846	2,364066
	Ph:7	0,152	13,15789
	Ph:8	0,113	17,69912
sodC	Ph:5.5	0,52	3,846154
	Ph:7	0,159	12,57862
	Ph:8	0,145	13,7931
katE	Ph:5.5	0,838	2,386635
	Ph:7	0,138	14,49275
	Ph:8	0,125	16
katG	Ph:5.5	0,65	3,076923
	Ph:7	0,12	16,66667
	Ph:8	0,11	18,18182
soxR	Ph:5.5	0,654	3,058104
	Ph:7	0,164	12,19512
	Ph:8	0,124	16,12903
soxS	Ph:5.5	0,472	4,237288
	Ph:7	0,121	16,52893
	Ph:8	0,086	23,25581
ahpC	Ph:5.5	0,492	4,065041
	Ph:7	0,129	15,50388
	Ph:8	0,124	16,12903
oxyR	Ph:5.5	0,646	3,095975
	Ph:7	0,143	13,98601
	Ph:8	0,147	13,60544
zwf	Ph:5.5	0,578	3,460208
	Ph:7	0,161	12,42236
	Ph:8	0,14	14,28571
btuE	Ph:5.5	0,596	3,355705
	Ph:7	0,137	14,59854
	Ph:8	0,128	15,625

Bakır sülfatın farklı pH'larda fosfat tamponunda yabancı tip *E.coli* ve mutantları üzerine etkisi Tablo 4.6 ve 4.7'da görülmektedir. Bakır sülfat ile yapılan çalışmada bakteri ve mutantlar yaklaşık 10 saatlik bir süre boyunca takip edilmiştir. Yabancı tip *E.coli* W3110 incelendiğinde bakterinin en fazla pH-5.5 de daha sonra sıra ile 7 ve 8 den etkilendiği görülmüştür. pH-5.5'da 1.45 saat, 7 de 10.69 ve 8 de ise 10 saatten fazla yaşamına devam ettiği belirlenmiştir.

pH-5.5'de mutantlar incelendiğinde, *sodA*, *katE*, *sodC*, *katG*, *btuE*'nin yabancı tiple yaklaşık aynı yaşama süreleri gösterdiği, bunun yanında *sodB*'nin ortamda tespit edilemeyen bir duruma geldiği, diğer mutantların ise daha uzun süre yaşamına devam ettiği görülmektedir. pH-5.5'de *sodB*'nin önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Burada da görüldüğü gibi pH:5-5 da *sodB*'nin önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

pH-7 ve 8'de yabancı tip ve mutantların yaklaşık aynı yaşam sürelerine sahip olduğu ve bu pH değerinin bakır sülfatın etkisi altında mutantların yaşamı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.8). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile ilgili genlerin yabancı tip ile yakın sonuçlar vermesi bu genlerin rollerinin kontrolü açısından önem teşkil etmektedir (Tablo 4.9).

Tablo 4.10. Manganez sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

MnSO ₄		0.gün	10.gün	20.gün	30.gün	40.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,64	5,78	5,14	5,39	4,07
	Ph:7	6,85	6,47	6,59	6,26	6,17
	Ph:8	6,81	6,44	6,49	6,40	5,95
sodA	Ph:5.5	6,69	5,89	5,65	6,19	6,60
	Ph:7	6,67	6,72	6,63	6,63	5,71
	Ph:8	7,14	6,66	6,85	6,63	6,38
sodB	Ph:5.5	6,60	5,90	5,46	5,07	4,30
	Ph:7	6,46	6,42	6,94	5,65	5,49
	Ph:8	6,77	6,34	6,43	5,90	5,96
sodC	Ph:5.5	6,50	5,87	5,39	6,06	5,56
	Ph:7	6,49	6,83	6,60	6,60	6,77
	Ph:8	6,60	6,78	6,65	6,34	6,06
katE	Ph:5.5	6,71	5,60	5,54	5,04	4,37
	Ph:7	6,61	6,04	6,65	6,43	6,35
	Ph:8	6,75	6,66	6,43	6,55	6,40
katG	Ph:5.5	6,59	5,55	6,50	5,83	5,32
	Ph:7	6,83	6,42	6,91	6,62	6,50
	Ph:8	7,02	6,43	6,45	6,48	6,04
soxR	Ph:5.5	6,44	6,22	6,04	5,84	5,43
	Ph:7	6,72	6,61	6,77	5,96	5,79
	Ph:8	6,88	6,62	6,42	6,26	5,80
soxS	Ph:5.5	6,69	6,25	5,69	5,91	5,74
	Ph:7	6,97	6,65	6,70	6,50	6,71
	Ph:8	6,83	6,74	6,62	5,87	5,78
ahpC	Ph:5.5	6,65	6,06	5,87	6,30	5,60
	Ph:7	6,94	6,43	6,65	6,75	6,57
	Ph:8	6,69	6,74	6,56	6,77	6,49
oxyR	Ph:5.5	6,67	6,43	5,84	5,64	5,69
	Ph:7	6,38	6,47	6,47	5,92	5,75
	Ph:8	7,30	6,74	6,53	6,61	6,47
zwf	Ph:5.5	6,82	6,47	5,27	5,00	4,55
	Ph:7	6,90	6,69	6,72	6,81	7,2
	Ph:8	6,60	6,77	6,57	6,67	6,17
btuE	Ph:5.5	6,80	5,67	6,50	5,77	6,84
	Ph:7	6,89	6,38	6,32	5,92	5,84
	Ph:8	6,80	6,51	6,64	6,53	6,71

Tablo 4.11. Manganez sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

MnSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,0642	31
	Ph:7	0,017	117
	Ph:8	0,0215	93
sodA	Ph:5.5	0,0327	61
	Ph:7	0,024	83
	Ph:8	0,019	105
sodB	Ph:5.5	0,0575	34
	Ph:7	0,0242	82
	Ph:8	0,0202	99
sodC	Ph:5.5	0,0235	85
	Ph:7	0,0055	363
	Ph:8	0,0135	141
katE	Ph:5.5	0,0585	34
	Ph:7	0,0065	307
	Ph:8	0,00875	228
katG	Ph:5.5	0,0317	63
	Ph:7	0,0207	66
	Ph:8	0,0245	81
soxR	Ph:5.5	0,02525	79
	Ph:7	0,02325	86
	Ph:8	0,027	74
soxS	Ph:5.5	0,0237	84
	Ph:7	0,0065	307
	Ph:8	0,026	76
ahpC	Ph:5.5	0,026	76
	Ph:7	0,0092	217
	Ph:8	0,026	76
oxyR	Ph:5.5	0,024	83
	Ph:7	0,0157	127
	Ph:8	0,0207	96
zwf	Ph:5.5	0,0567	35
	Ph:7	0,0052	384
	Ph:8	0,0107	186
btuE	Ph:5.5	0,024	81
	Ph:7	0,026	76
	Ph:8	0,0047	425

Tablo 4.12. Manganez sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

MnSO ₄		0.gün	20.gün	40.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,31	5,24	5,21
	Ph:7	6,72	6,61	6,44
	Ph:8	6,56	6,49	6,01
sodA	Ph:5.5	6,55	6,20	5,62
	Ph:7	6,52	6,11	5,95
	Ph:8	6,22	6,12	5,81
sodB	Ph:5.5	6,52	5,42	5,24
	Ph:7	6,54	6,41	5,86
	Ph:8	6,42	6,30	6,04
sodC	Ph:5.5	6,47	5,48	5,30
	Ph:7	6,36	6,24	6,28
	Ph:8	6,41	6,38	6,1
katE	Ph:5.5	6,65	5,75	5,33
	Ph:7	6,60	6,51	6,44
	Ph:8	6,68	6,41	6,42
katG	Ph:5.5	6,42	6,11	5,58
	Ph:7	6,80	6,75	6,44
	Ph:8	6,74	6,50	6,00
soxR	Ph:5.5	6,68	6,28	6,02
	Ph:7	6,74	6,71	6,15
	Ph:8	6,85	6,51	6,33
soxS	Ph:5.5	6,54	5,78	5,75
	Ph:7	6,85	6,72	6,74
	Ph:8	6,74	6,64	5,95
ahpC	Ph:5.5	6,62	5,94	5,78
	Ph:7	6,82	6,57	6,25
	Ph:8	6,54	6,58	6,50
oxyR	Ph:5.5	6,61	5,98	5,74
	Ph:7	6,28	6,21	5,88
	Ph:8	6,98	6,58	6,51
zwf	Ph:5.5	6,71	5,38	5,58
	Ph:7	6,88	6,77	6,64
	Ph:8	6,52	6,61	6,28
btuE	Ph:5.5	6,72	6,54	6,41
	Ph:7	6,68	6,52	6,55
	Ph:8	6,80	6,81	6,52

Tablo 4.13. Manganez sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

MnSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,0275	72,72727
	Ph:7	0,007	285,7143
	Ph:8	0,01375	145,4545
sodA	Ph:5.5	0,02325	86,02151
	Ph:7	0,01425	140,3509
	Ph:8	0,01025	195,122
sodB	Ph:5.5	0,032	62,5
	Ph:7	0,017	117,6471
	Ph:8	0,0095	210,5263
sodC	Ph:5.5	0,02925	68,37607
	Ph:7	0,002	1000
	Ph:8	0,00775	258,0645
katE	Ph:5.5	0,027	74,07407
	Ph:7	0,004	500
	Ph:8	0,0065	307,6923
katG	Ph:5.5	0,021	95,2381
	Ph:7	0,009	222,2222
	Ph:8	0,0155	129,0323
soxR	Ph:5.5	0,0165	121,2121
	Ph:7	0,01475	135,5932
	Ph:8	0,013	153,8462
soxS	Ph:5.5	0,01975	101,2658
	Ph:7	0,00275	727,2727
	Ph:8	0,01975	101,2658
ahpC	Ph:5.5	0,021	95,2381
	Ph:7	0,00675	296,2963
	Ph:8	0,01425	140,3509
oxyR	Ph:5.5	0,02175	91,95402
	Ph:7	0,01	200
	Ph:8	0,01175	170,2128
zwf	Ph:5.5	0,02825	70,79646
	Ph:7	0,006	333,3333
	Ph:8	0,006	333,3333
btuE	Ph:5.5	0,00775	258,0645
	Ph:7	0,00325	615,3846
	Ph:8	0,007	285,7143

Manganez sülfatın etkisi altında bakteriler yaklaşık 40 gün boyunca takip edilmiştir. (Tablo 4.10). 10 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Manganezin etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5’de 31 gün yaşamına devam etmesine rağmen diğer pH’larda 40 günden fazla yaşamına devam etmişlerdir (Tablo 4.11).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB*, *katE*, *zwf* nin yabani tiple benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB*, *katE* ve *zwf* nin manganezin etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.12). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.13).

Tablo 4.14. Nikel sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

NiSO ₄		0.gün	5.gün	10.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,60	6,47	6,38
	Ph:7	6,45	5,66	2,90
	Ph:8	6,75	5,38	1
sodA	Ph:5.5	6,71	6,69	6,50
	Ph:7	6,55	5,24	4,02
	Ph:8	6,72	5,65	2,47
sodB	Ph:5.5	6,50	6,68	6,50
	Ph:7	6,45	5,78	1
	Ph:8	6,35	4,77	1
sodC	Ph:5.5	6,60	6,85	6,38
	Ph:7	6,58	5,97	2,77
	Ph:8	6,72	6,09	2,30
katE	Ph:5.5	6,55	6,07	6,30
	Ph:7	6,61	5,90	3,48
	Ph:8	6,69	4,65	2
katG	Ph:5.5	6,81	6,50	6,47
	Ph:7	6,60	6,20	3,23
	Ph:8	6,69	5,41	1
soxR	Ph:5.5	6,61	6,60	6,58
	Ph:7	6,84	5,58	2,90
	Ph:8	6,70	5,58	2,81
soxS	Ph:5.5	6,61	6,38	6,07
	Ph:7	6,65	5,74	3,85
	Ph:8	6,70	5,90	1
ahpC	Ph:5.5	6,69	6,60	6,30
	Ph:7	6,73	5,60	2,69
	Ph:8	6,71	5,43	1
oxyR	Ph:5.5	6,69	6,90	6,39
	Ph:7	6,86	5,74	3,65
	Ph:8	6,77	5,87	2,90
zwf	Ph:5.5	6,70	6,69	6,77
	Ph:7	6,79	5,50	2,69
	Ph:8	6,77	5,29	2,30
btuE	Ph:5.5	6,69	6,50	6,39
	Ph:7	6,88	5,47	2,84
	Ph:8	6,73	5,90	2,81

Tablo 4.15. Nikel sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

NiSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,0205	97
	Ph:7	0,355	5
	Ph:8	0,575	3,4
sodA	Ph:5.5	0,0165	121
	Ph:7	0,253	7
	Ph:8	0,425	4
sodB	Ph:5.5	0,005	400
	Ph:7	0,545	3,66
	Ph:8	0,535	3,7
sodC	Ph:5.5	0,03	66
	Ph:7	0,381	5,24
	Ph:8	0,442	4,52
katE	Ph:5.5	0,02	100
	Ph:7	0,313	6,38
	Ph:8	0,469	4,26
katG	Ph:5.5	0,033	60
	Ph:7	0,337	5,9
	Ph:8	0,569	3,5
soxR	Ph:5.5	0,013	64
	Ph:7	0,394	5
	Ph:8	0,389	5
soxS	Ph:5.5	0,0365	54
	Ph:7	0,28	7,1
	Ph:8	0,57	3,5
ahpC	Ph:5.5	0,0285	70
	Ph:7	0,404	4,9
	Ph:8	0,517	3,5
oxyR	Ph:5.5	0,0285	70
	Ph:7	0,321	6,2
	Ph:8	0,387	5,1
zwf	Ph:5.5	0,011	181
	Ph:7	0,41	4,48
	Ph:8	0,477	4,19
btuE	Ph:5.5	0,0205	97
	Ph:7	0,404	4,9
	Ph:8	0,392	5,1

Tablo 4.16. Nikel sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

NiSO ₄		0.gün	5.gün	10.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,52	6,44	6,40
	Ph:7	6,41	5,78	3,92
	Ph:8	6,66	5,48	2,18
sodA	Ph:5.5	6,65	6,62	6,52
	Ph:7	6,58	5,46	4,98
	Ph:8	6,64	5,78	3,41
sodB	Ph:5.5	6,38	6,31	6,28
	Ph:7	6,32	5,88	2,02
	Ph:8	6,22	4,44	1,56
sodC	Ph:5.5	6,55	6,47	6,44
	Ph:7	6,58	6,00	3,12
	Ph:8	6,68	6,11	2,44
katE	Ph:5.5	6,48	6,12	6,32
	Ph:7	6,55	5,82	3,68
	Ph:8	6,66	4,74	2,54
katG	Ph:5.5	6,74	6,52	6,48
	Ph:7	6,58	6,33	4,12
	Ph:8	6,64	5,88	2,14
soxR	Ph:5.5	6,58	6,61	6,41
	Ph:7	6,76	5,78	3,57
	Ph:8	6,72	6,04	3,01
soxS	Ph:5.5	6,32	6,24	6,22
	Ph:7	6,54	5,81	4,15
	Ph:8	6,68	5,98	2,34
ahpC	Ph:5.5	6,52	6,48	6,32
	Ph:7	6,64	5,75	4,52
	Ph:8	6,62	5,55	2,65
oxyR	Ph:5.5	6,58	6,47	6,40
	Ph:7	6,76	5,98	4,22
	Ph:8	6,68	5,98	3,28
zwf	Ph:5.5	6,66	6,68	6,58
	Ph:7	6,79	5,50	4,15
	Ph:8	6,62	5,38	3,08
btuE	Ph:5.5	6,52	6,48	6,32
	Ph:7	6,78	5,88	3,58
	Ph:8	6,67	5,82	3,07

Tablo 4.17. Nikel sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

NiSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,012	166,6667
	Ph:7	0,249	8,032129
	Ph:8	0,448	4,464286
sodA	Ph:5.5	0,013	153,8462
	Ph:7	0,16	12,5
	Ph:8	0,323	6,19195
sodB	Ph:5.5	0,01	200
	Ph:7	0,43	4,651163
	Ph:8	0,466	4,291845
sodC	Ph:5.5	0,011	181,8182
	Ph:7	0,346	5,780347
	Ph:8	0,424	4,716981
katE	Ph:5.5	0,016	125
	Ph:7	0,287	6,968641
	Ph:8	0,412	4,854369
katG	Ph:5.5	0,026	76,92308
	Ph:7	0,246	8,130081
	Ph:8	0,45	4,444444
soxR	Ph:5.5	0,017	117,6471
	Ph:7	0,319	6,269592
	Ph:8	0,371	5,390836
soxS	Ph:5.5	0,01	200
	Ph:7	0,239	8,368201
	Ph:8	0,434	4,608295
ahpC	Ph:5.5	0,02	100
	Ph:7	0,212	9,433962
	Ph:8	0,397	5,037783
oxyR	Ph:5.5	0,018	111,1111
	Ph:7	0,254	7,874016
	Ph:8	0,34	5,882353
zwf	Ph:5.5	0,008	250
	Ph:7	0,264	7,575758
	Ph:8	0,354	5,649718
btuE	Ph:5.5	0,02	100
	Ph:7	0,32	6,25
	Ph:8	0,36	5,555556

Tablo 4.14ve 4.15’de görüldüğü gibi nikel sülfatın farklı pH’larda bakteriler üzerine etkisi 10 gün süresince takip edilmiştir. Hangi pH değerinin bakteri yaşamında daha önemli etkiye sahip olduğu araştırılmıştır. Sonuçlara göre, yabancı tip *E.coli* incelendiğinde bakterinin pH-7’de 5 gün, pH-8’de 3.4 gün yaşadığı belirlenmiştir. pH-5.5’in ise bakteri yaşamında önemli bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.

pH-5.5’de *btuE* ve *katE* yabancı tip ile aynı yaşam sürelerine sahipken, *sodA* ve *sodB* daha uzun süre yaşamış, diğer mutantlar ise daha kısa süre yaşamını sürdürmüştür.

pH-7’de *sodA*, *katE* *soxS* ve *oxyR* yabancı tipten daha uzun süre yaşamış, diğer mutanlar daha kısa süre yaşamını sürdürmüştür. En çok etkilenen bakteri ise *sodB*’dir.

Bakterileri en çok etkileyen pH-8’de en çok etkilenen bakteri *katG*, *soxS* ve *ahpC*’dir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.16). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabancı tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.17).

Tablo 4.18. Çinko sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

ZnSO ₄		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	80.gün	100.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,65	5,79	5,49	5,41	5,09	3,84
	Ph:7	6,57	5,97	5,64	5,15	5,15	4,17
	Ph:8	6,81	6,38	5,69	5,48	5,35	4,55
sodA	Ph:5.5	6,87	5,61	5,80	5,61	4,00	3,80
	Ph:7	6,65	6,21	6,00	5,74	5,83	4,86
	Ph:8	6,81	6,70	6,38	5,87	5,82	5,00
sodB	Ph:5.5	6,49	5,44	4,84	3,95	0,00	
	Ph:7	6,69	6,09	5,28	5,09	0,00	
	Ph:8	6,74	5,09	5,06	4,13	3,30	
sodC	Ph:5.5	6,66	5,50	5,17	5,90	4,95	3,44
	Ph:7	6,74	5,78	6,03	5,90	5,79	4,55
	Ph:8	6,69	5,41	5,68	5,83	5,78	4,88
katE	Ph:5.5	6,80	6,60	5,13	4,67	3,77	
	Ph:7	6,70	6,21	5,96	5,56	5,24	4,50
	Ph:8	6,77	6,14	5,68	5,78	5,20	4,86
katG	Ph:5.5	6,74	6,11	6,17	5,44	5,00	3,86
	Ph:7	6,71	6,43	5,84	5,50	5,64	4,20
	Ph:8	6,74	6,50	6,38	6,03	5,74	5,00
soxR	Ph:5.5	6,66	5,50	5,84	5,57	5,35	5,00
	Ph:7	6,81	6,33	6,38	5,96	5,65	5,20
	Ph:8	6,72	5,99	6,14	5,90	5,70	5,32
soxS	Ph:5.5	6,77	6,38	5,61	5,50	5,73	4,75
	Ph:7	6,65	5,94	6,38	5,76	5,60	4,78
	Ph:8	6,73	6,38	6,50	6,07	5,70	4,48
ahpC	Ph:5.5	6,73	6,60	6,68	6,30	5,39	5,00
	Ph:7	6,86	6,80	6,38	5,44	6,30	5,17
	Ph:8	6,82	6,66	6,50	6,24	5,95	5,22
oxyR	Ph:5.5	6,78	6,68	6,74	6,17	6,19	5,20
	Ph:7	6,82	6,51	6,20	6,13	6,23	5,33
	Ph:8	6,96	6,69	6,25	6,47	6,34	5,34
zwf	Ph:5.5	6,78	5,77	5,76	5,74	5,36	4,88
	Ph:7	6,78	5,98	5,93	6,20	5,35	4,86
	Ph:8	6,73	6,50	6,50	5,75	5,71	5,02
btuE	Ph:5.5	6,51	6,50	6,84	5,47	4,39	
	Ph:7	6,89	6,32	5,84	5,50	4,14	
	Ph:8	6,69	5,74	5,81	5,53	4,98	

Tablo 4.19. Çinko sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

ZnSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,028	71
	Ph:7	0,024	83
	Ph:8	0,022	90
sodA	Ph:5.5	0,0307	65
	Ph:7	0,0179	111
	Ph:8	0,0181	110
sodB	Ph:5.5	0,042	47
	Ph:7	0,026	76
	Ph:8	0,043	41
sodC	Ph:5.5	0,0322	62
	Ph:7	0,0219	91
	Ph:8	0,0181	110
katE	Ph:5.5	0,0378	52
	Ph:7	0,022	90
	Ph:8	0,0181	110
katG	Ph:5.5	0,0288	69
	Ph:7	0,0251	79
	Ph:8	0,0174	114
soxR	Ph:5.5	0,0166	120
	Ph:7	0,0161	124
	Ph:8	0,014	142
soxS	Ph:5.5	0,0202	99
	Ph:7	0,0187	106
	Ph:8	0,022	90
ahpC	Ph:5.5	0,0173	115
	Ph:7	0,0169	118
	Ph:8	0,016	125
oxyR	Ph:5.5	0,0158	126
	Ph:7	0,0149	134
	Ph:8	0,0162	123
zwf	Ph:5.5	0,019	105
	Ph:7	0,0192	104
	Ph:8	0,0171	116
btuE	Ph:5.5	0,0265	75
	Ph:7	0,034	58
	Ph:8	0,0213	93

Tablo 4.20. Çinko sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

ZnSO ₄		0.gün	25.gün	50.gün	75.gün	100.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,44	5,96	5,47	4,45	3,98
	Ph:7	6,52	6,12	5,71	5,12	4,85
	Ph:8	6,72	6,24	5,62	5,21	5,02
sodA	Ph:5.5	6,75	6,00	5,88	4,85	4,11
	Ph:7	6,42	6,28	6,12	5,14	4,88
	Ph:8	6,72	6,54	6,44	5,66	5,12
sodB	Ph:5.5	6,03	5,85	4,84	3,12	3,52
	Ph:7	6,02	5,96	5,11	4,15	3,96
	Ph:8	6,65	6,05	5,12	4,56	4,97
sodC	Ph:5.5	6,58	6,02	5,22	4,86	4,12
	Ph:7	6,61	6,11	5,88	5,12	4,88
	Ph:8	6,55	6,20	5,71	5,32	5,12
katE	Ph:5.5	6,70	5,88	5,24	4,28	3,98
	Ph:7	6,65	6,33	6,01	5,34	4,98
	Ph:8	6,72	6,42	6,11	5,47	5,00
katG	Ph:5.5	6,64	6,14	5,88	4,56	3,98
	Ph:7	6,66	6,30	5,85	5,12	4,68
	Ph:8	6,71	6,25	6,12	5,88	5,21
soxR	Ph:5.5	6,48	6,22	5,98	5,62	5,08
	Ph:7	6,64	6,54	6,35	5,86	5,33
	Ph:8	6,68	6,48	6,22	5,76	5,48
soxS	Ph:5.5	6,72	6,12	5,61	5,28	4,81
	Ph:7	6,71	6,48	6,40	5,72	5,06
	Ph:8	6,68	6,55	6,44	6,05	5,31
ahpC	Ph:5.5	6,65	6,34	6,24	5,28	5,08
	Ph:7	6,77	6,48	6,33	5,94	5,24
	Ph:8	6,75	6,61	6,55	5,82	5,38
oxyR	Ph:5.5	6,68	6,55	6,74	5,78	5,22
	Ph:7	6,78	6,38	6,28	5,66	5,42
	Ph:8	6,84	6,54	6,33	5,82	5,42
zwf	Ph:5.5	6,72	5,96	5,64	5,32	5,08
	Ph:7	6,64	6,24	5,98	5,28	5,18
	Ph:8	6,72	6,62	6,55	5,60	5,24
btuE	Ph:5.5	6,44	6,21	5,85	4,82	4,38
	Ph:7	6,88	6,36	5,98	4,98	4,41
	Ph:8	6,66	6,42	6,12	5,38	5,12

Tablo 4.21. Çinko sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

ZnSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
<i>E.coli</i> IPTG	Ph:5.5	0,0246	81,30081
	Ph:7	0,0167	119,7605
	Ph:8	0,017	117,6471
sodA	Ph:5.5	0,0264	75,75758
	Ph:7	0,0154	129,8701
	Ph:8	0,016	125
sodB	Ph:5.5	0,0251	79,68127
	Ph:7	0,0206	97,08738
	Ph:8	0,0168	119,0476
sodC	Ph:5.5	0,0246	81,30081
	Ph:7	0,0173	115,6069
	Ph:8	0,0143	139,8601
katE	Ph:5.5	0,0272	73,52941
	Ph:7	0,0167	119,7605
	Ph:8	0,0172	116,2791
katG	Ph:5.5	0,0266	75,18797
	Ph:7	0,0198	101,0101
	Ph:8	0,015	133,3333
soxR	Ph:5.5	0,014	142,8571
	Ph:7	0,0131	152,6718
	Ph:8	0,012	166,6667
soxS	Ph:5.5	0,0191	104,712
	Ph:7	0,0165	121,2121
	Ph:8	0,0137	145,9854
ahpC	Ph:5.5	0,0157	127,3885
	Ph:7	0,0153	130,719
	Ph:8	0,0137	145,9854
oxyR	Ph:5.5	0,0146	136,9863
	Ph:7	0,0136	147,0588
	Ph:8	0,0142	140,8451
zwf	Ph:5.5	0,0164	121,9512
	Ph:7	0,0146	136,9863
	Ph:8	0,0148	135,1351
btuE	Ph:5.5	0,0206	97,08738
	Ph:7	0,0247	80,97166
	Ph:8	0,0154	129,8701

Çinko sülfatın bakteriler üzerine etkisini araştırmak için 100 gün yaşam deneyi yapılmıştır. Çalışmalar pH-5.5, 7 ve 8'de fosfat tamponu içinde yapılmıştır. Çalışma sonucunda yabancı tip *E.coli*'nin pH-5.5'de 71 gün, pH-7'de 83 gün ve pH-8'de 90 gün yaşamına devam ettiği görülmüştür. Yabancı tip üzerine pH-5.5 diğerlerinden daha fazla etkili olmuştur.

Mutantlarla karşılaştığımızda ise, pH-5.5'de *sodA* 65, *sodB* 47, *sodC* 62, *katE* 52 gün yaşamına devam etmiştir. Yabancı tip *E.coli*'den daha kısa yaşam sürelerine sahip olan bu mutantlarda, eksik olan gen bölgelerinin pH-5.5'de ve çinko sülfatın bulunduğu ortamda bakterileri koruduğu tablo 4.18 ve 4.19'da görülmektedir.

pH-7'de yapılan çalışmada *E.coli* 83 gün yaşamına devam etmiştir. Bunun yanında *sodB* 76, *btuE* 58 gün yaşamına devam etmiştir. Dolayısı ile *sodB* ve *btuE*'nin pH-7'de çinkonun bulunduğu ortamda bakterileri koruduğu belirlenmiştir. Mutantların yabancı tipten daha kısa sürede ortamdaki uzaklaşması o gen bölgesinin bu ortam şartlarında bakteriyi koruduğunu göstermektedir.

pH-8 verileri incelendiğinde, *E.coli* 90 gün yaşamına devam etmiştir. Mutantlardan *sodB* ise 41 gün yaşamına devam etmiştir. Bu sonuçlara göre, *sodB*'nin pH-8 ortamında ve çinko sülfatın bulunduğu fosfat tamponunda bakterinin hayatta kalması için önemli bir gen bölgesi olduğu görülmektedir.

Tablo 4.22.Krom-2-klorürün *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CrCl ₂		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,71	5,78	5,39	4,12
	Ph:7	6,61	6,45	6,16	6,00
	Ph:8	6,75	6,44	6,31	5,98
sodA	Ph:5.5	6,71	5,89	6,00	5,82
	Ph:7	6,61	6,72	6,63	5,96
	Ph:8	6,75	6,66	6,24	6,12
sodB	Ph:5.5	6,69	5,94	5,17	4,00
	Ph:7	6,67	6,45	5,75	5,42
	Ph:8	6,85	6,32	6,21	5,96
sodC	Ph:5.5	6,64	6,14	6,06	5,56
	Ph:7	6,85	6,72	6,62	6,10
	Ph:8	6,81	6,78	6,34	6,21
katE	Ph:5.5	6,60	5,60	5,14	4,38
	Ph:7	6,46	6,21	6,10	5,85
	Ph:8	6,77	6,66	6,31	6,12
katG	Ph:5.5	6,69	5,92	5,83	5,37
	Ph:7	6,97	6,42	6,62	5,88
	Ph:8	6,80	6,54	6,22	6,04
soxR	Ph:5.5	6,50	6,25	5,84	5,18
	Ph:7	6,49	6,37	6,20	6,14
	Ph:8	6,60	6,72	6,64	6,38
soxS	Ph:5.5	6,69	6,24	5,92	5,78
	Ph:7	6,97	6,65	6,50	6,71
	Ph:8	6,83	6,74	5,87	5,78
ahpC	Ph:5.5	6,65	6,46	6,32	5,64
	Ph:7	6,94	6,43	6,75	6,58
	Ph:8	6,69	6,74	6,52	6,49
oxyR	Ph:5.5	6,59	6,43	5,64	5,65
	Ph:7	6,83	6,45	5,98	5,80
	Ph:8	6,85	6,74	6,61	6,45
zwf	Ph:5.5	6,46	6,45	5,00	4,55
	Ph:7	6,74	6,69	6,81	6,22
	Ph:8	6,91	6,72	6,67	6,18
btuE	Ph:5.5	6,67	5,64	5,72	5,84
	Ph:7	6,38	6,38	5,92	5,88
	Ph:8	6,88	6,51	6,53	6,22

Tablo 4.23.Krom-2-klorürün etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

CrCl ₂		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,043167	46,33205
	Ph:7	0,010167	196,7213
	Ph:8	0,012833	155,8442
sodA	Ph:5.5	0,014833	134,8315
	Ph:7	0,010833	184,6154
	Ph:8	0,0105	190,4762
sodB	Ph:5.5	0,044833	44,60967
	Ph:7	0,020833	96
	Ph:8	0,014833	134,8315
sodC	Ph:5.5	0,018	111,1111
	Ph:7	0,0125	160
	Ph:8	0,01	200
katE	Ph:5.5	0,037	54,05405
	Ph:7	0,010167	196,7213
	Ph:8	0,010833	184,6154
katG	Ph:5.5	0,022	90,90909
	Ph:7	0,018167	110,0917
	Ph:8	0,012667	157,8947
soxR	Ph:5.5	0,022	90,90909
	Ph:7	0,005833	342,8571
	Ph:8	0,003667	545,4545
soxS	Ph:5.5	0,015167	131,8681
	Ph:7	0,004333	461,5385
	Ph:8	0,0175	114,2857
ahpC	Ph:5.5	0,016833	118,8119
	Ph:7	0,006	333,3333
	Ph:8	0,003333	600
oxyR	Ph:5.5	0,015667	127,6596
	Ph:7	0,017167	116,5049
	Ph:8	0,006667	300
zwf	Ph:5.5	0,031833	62,82723
	Ph:7	0,008667	230,7692
	Ph:8	0,012167	164,3836
btuE	Ph:5.5	0,013833	144,5783
	Ph:7	0,008333	240
	Ph:8	0,011	181,8182

Tablo 4.24.Krom-2-klorürün *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CrCl ₂		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,66	5,96	5,59	4,92
	Ph:7	6,52	6,41	6,18	6,08
	Ph:8	6,70	6,52	6,38	6,14
sodA	Ph:5.5	6,64	6,31	6,22	6,08
	Ph:7	6,55	6,52	6,24	6,17
	Ph:8	6,58	6,34	6,28	6,24
sodB	Ph:5.5	6,64	6,05	5,84	4,85
	Ph:7	6,62	6,33	5,96	5,89
	Ph:8	6,71	6,31	6,18	6,14
sodC	Ph:5.5	6,52	6,34	6,14	5,96
	Ph:7	6,74	6,61	6,52	6,22
	Ph:8	6,72	6,64	6,42	6,28
katE	Ph:5.5	6,54	6,18	5,74	5,35
	Ph:7	6,34	6,22	6,18	6,04
	Ph:8	6,58	6,56	6,33	6,22
katG	Ph:5.5	6,61	6,18	6,20	5,86
	Ph:7	6,85	6,62	6,54	6,02
	Ph:8	6,72	6,58	6,32	6,29
soxR	Ph:5.5	6,44	6,26	6,12	5,64
	Ph:7	6,42	6,33	6,24	6,24
	Ph:8	6,55	6,38	6,22	6,20
soxS	Ph:5.5	6,52	6,24	5,92	5,78
	Ph:7	6,82	6,65	6,50	6,07
	Ph:8	6,61	6,33	6,21	6,22
ahpC	Ph:5.5	6,60	6,45	6,21	5,85
	Ph:7	6,82	6,41	6,33	6,02
	Ph:8	6,66	6,55	6,31	6,50
oxyR	Ph:5.5	6,50	6,40	5,84	5,78
	Ph:7	6,75	6,41	6,04	5,95
	Ph:8	6,71	6,52	6,61	6,45
zwf	Ph:5.5	6,42	6,31	5,00	4,55
	Ph:7	6,64	6,55	6,42	6,25
	Ph:8	6,82	6,61	6,60	6,33
btuE	Ph:5.5	6,62	6,18	5,96	5,64
	Ph:7	6,24	6,18	5,91	6,00
	Ph:8	6,76	6,55	6,41	6,33

Tablo 4.25.Krom-2-klorürün etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

CrCl ₂		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,029	68,96552
	Ph:7	0,007333	272,7273
	Ph:8	0,009333	214,2857
sodA	Ph:5.5	0,009333	214,2857
	Ph:7	0,006333	315,7895
	Ph:8	0,005667	352,9412
sodB	Ph:5.5	0,029833	67,03911
	Ph:7	0,012167	164,3836
	Ph:8	0,0095	210,5263
sodC	Ph:5.5	0,009333	214,2857
	Ph:7	0,008667	230,7692
	Ph:8	0,007333	272,7273
katE	Ph:5.5	0,019833	100,8403
	Ph:7	0,005	400
	Ph:8	0,006	333,3333
katG	Ph:5.5	0,0125	160
	Ph:7	0,013833	144,5783
	Ph:8	0,007167	279,0698
soxR	Ph:5.5	0,013333	150
	Ph:7	0,003	666,6667
	Ph:8	0,005833	342,8571
soxS	Ph:5.5	0,012333	162,1622
	Ph:7	0,0125	160
	Ph:8	0,0065	307,6923
ahpC	Ph:5.5	0,0125	160
	Ph:7	0,013333	150
	Ph:8	0,002667	750
oxyR	Ph:5.5	0,012	166,6667
	Ph:7	0,013333	150
	Ph:8	0,004333	461,5385
zwf	Ph:5.5	0,031167	64,17112
	Ph:7	0,0065	307,6923
	Ph:8	0,008167	244,898
btuE	Ph:5.5	0,016333	122,449
	Ph:7	0,004	500
	Ph:8	0,007167	279,0698

Krom-2-klorürün etkisi altında bakteriler yaklaşık 60 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 4.22). 20 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Krom-2-klorürün etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5’de 46 gün yaşamına devam etmesine rağmen diğer pH’larda 60 günden fazla yaşamına devam etmişlerdir (Tablo 4.23).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB*, *katE*, *zwf* nin yabani tiple benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB*, *katE* ve *zwf* nin manganazın etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.24). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.25).

Tablo 4.26.Kobalt sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CoSO ₄		0,gün	10,gün	20,gün	30,gün	40,gün	50,gün	60,gün	70,gün	80,gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,80	6,55	6,22	6,05	6,18	5,80	5,52	5,18	5,10
	Ph:7	6,43	6,33	6,18	6,22	5,68	5,22	5,08	4,85	4,78
	Ph:8	6,58	3,04							
sodA	Ph:5.5	6,69	6,48	6,35	5,38	5,28	5,14	4,58	4,44	4,31
	Ph:7	6,59	6,45	6,28	5,34	5,12	4,55	4,28	4,02	3,87
	Ph:8	6,57	3,83							
sodB	Ph:5.5	6,44	6,24	6,31	5,35	4,38	4,25	3,97		
	Ph:7	6,53	6,48	5,88	5,12	4,24	4,33	3,86		
	Ph:8	6,50	2,70							
sodC	Ph:5.5	6,73	6,55	6,34	6,12	5,31	5,08	5,22	4,85	4,47
	Ph:7	6,61	6,45	6,17	6,05	5,36	5,24	4,88	4,48	4,34
	Ph:8	6,76	3,76							
katE	Ph:5.5	6,72	6,54	6,22	5,87	5,28	4,96	4,67	4,35	4,29
	Ph:7	6,62	6,48	6,34	5,94	5,64	5,12	4,85	4,28	4,11
	Ph:8	6,71	2,95							
katG	Ph:5.5	6,72	6,58	6,17	5,58	5,18	4,88	4,57	4,08	3,95
	Ph:7	6,60	6,47	6,38	6,05	5,48	5,31	4,65	4,22	3,86
	Ph:8	6,66	3,97							
soxR	Ph:5.5	6,70	6,58	6,24	5,78	5,43	5,45	4,98	4,55	4,23
	Ph:7	6,82	6,67	6,28	6,07	5,89	5,44	5,38	5,22	4,05
	Ph:8	6,78	4,10							
soxS	Ph:5.5	6,70	6,54	6,34	5,86	5,27	5,16	4,88	4,62	4,16
	Ph:7	6,65	6,45	6,14	5,64	5,22	4,96	4,68	4,15	4,03
	Ph:8	6,68	3,51							
ahpC	Ph:5.5	6,71	6,54	6,12	5,58	5,36	5,04	4,87	4,65	4,13
	Ph:7	6,73	6,64	6,08	5,68	5,44	4,96	4,87	4,34	4,00
	Ph:8	6,64	4,18							
oxyR	Ph:5.5	6,83	6,68	6,66	5,74	5,48	5,22	4,68	4,48	4,27
	Ph:7	6,89	6,74	6,24	5,85	5,38	4,97	4,86	4,58	4,30
	Ph:8	6,78	4,27							
zwf	Ph:5.5	6,82	6,42	5,94	5,84	5,22	4,58	4,86	4,57	4,36
	Ph:7	6,79	6,61	6,18	5,72	5,36	5,14	4,74	4,85	4,22
	Ph:8	6,81	3,10							
btuE	Ph:5.5	6,77	6,74	6,28	5,98	5,54	5,67	5,05	4,87	4,28
	Ph:7	6,88	6,37	6,33	6,08	5,68	5,24	4,86	4,58	4,32
	Ph:8	6,72	3,84							

Tablo 4.27.Kobalt sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

CoSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,02128	93,98479
	Ph:7	0,02062	96,99272
	Ph:8	0,354	5,649718
sodA	Ph:5.5	0,02975	67,22689
	Ph:7	0,034	58,82353
	Ph:8	0,274	7,29927
sodB	Ph:5.5	0,041167	48,583
	Ph:7	0,0445	44,94382
	Ph:8	0,38	5,263158
sodC	Ph:5.5	0,02825	70,79646
	Ph:7	0,028375	70,48458
	Ph:8	0,3	6,666667
katE	Ph:5.5	0,030375	65,84362
	Ph:7	0,031375	63,74502
	Ph:8	0,376	5,319149
katG	Ph:5.5	0,034625	57,76173
	Ph:7	0,03425	58,39416
	Ph:8	0,269	7,434944
soxR	Ph:5.5	0,030875	64,77733
	Ph:7	0,034625	57,76173
	Ph:8	0,268	7,462687
soxS	Ph:5.5	0,03175	62,99213
	Ph:7	0,03275	61,0687
	Ph:8	0,317	6,309148
ahpC	Ph:5.5	0,03225	62,0155
	Ph:7	0,034125	58,60806
	Ph:8	0,246	8,130081
oxyR	Ph:5.5	0,032	62,5
	Ph:7	0,032375	61,77606
	Ph:8	0,251	7,968127
zwf	Ph:5.5	0,03075	65,04065
	Ph:7	0,032125	62,25681
	Ph:8	0,371	5,390836
btuE	Ph:5.5	0,031125	64,25703
	Ph:7	0,032	62,5
	Ph:8	0,288	6,944444

Tablo 4.28.Kobalt sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

CoSO ₄		0,gün	20,gün	40,gün	60,gün	80,gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,80	6,22	6,18	5,52	5,85
	Ph:7	6,43	6,18	5,68	5,08	5,02
	Ph:8	6,58	2,64			
sodA	Ph:5.5	6,69	6,35	5,28	4,58	4,98
	Ph:7	6,59	6,28	5,12	4,28	4,12
	Ph:8	6,57	4,12			
sodB	Ph:5.5	6,44	6,31	4,38	3,97	3,12
	Ph:7	6,53	5,88	4,24	3,86	3,05
	Ph:8	6,50	1,22			
sodC	Ph:5.5	6,73	6,34	5,31	5,22	5,14
	Ph:7	6,61	6,17	5,36	4,88	4,98
	Ph:8	6,76	3,14			
katE	Ph:5.5	6,72	6,22	5,28	4,67	4,68
	Ph:7	6,62	6,34	5,64	4,85	4,38
	Ph:8	6,71	3,15			
katG	Ph:5.5	6,72	6,17	5,18	4,57	4,18
	Ph:7	6,60	6,38	5,48	4,65	4,08
	Ph:8	6,66	2,88			
soxR	Ph:5.5	6,70	6,24	5,43	4,98	4,88
	Ph:7	6,82	6,28	5,89	5,38	4,81
	Ph:8	6,78	3,55			
soxS	Ph:5.5	6,70	6,34	5,27	4,88	5,12
	Ph:7	6,65	6,14	5,22	4,68	4,56
	Ph:8	6,68	2,67			
ahpC	Ph:5.5	6,71	6,12	5,36	4,87	4,78
	Ph:7	6,73	6,08	5,44	4,87	4,38
	Ph:8	6,64	3,42			
oxyR	Ph:5.5	6,83	6,66	5,48	4,68	5,24
	Ph:7	6,89	6,24	5,38	4,86	4,10
	Ph:8	6,78	3,12			
zwf	Ph:5.5	6,82	5,94	5,22	4,86	5,14
	Ph:7	6,79	6,18	5,36	4,74	4,86
	Ph:8	6,81	2,25			
btuE	Ph:5.5	6,77	6,28	5,54	5,05	5,20
	Ph:7	6,88	6,33	5,68	4,86	4,95
	Ph:8	6,72	2,88			

Tablo 4.29.Kobalt sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

CoSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,011875	168,4211
	Ph:7	0,017625	113,4752
	Ph:8	0,197	10,15228
sodA	Ph:5.5	0,021375	93,56725
	Ph:7	0,030875	64,77733
	Ph:8	0,1225	16,32653
sodB	Ph:5.5	0,0415	48,19277
	Ph:7	0,0435	45,97701
	Ph:8	0,264	7,575758
sodC	Ph:5.5	0,019875	100,6289
	Ph:7	0,020375	98,15951
	Ph:8	0,181	11,04972
katE	Ph:5.5	0,0255	78,43137
	Ph:7	0,028	71,42857
	Ph:8	0,178	11,23596
katG	Ph:5.5	0,03175	62,99213
	Ph:7	0,0315	63,49206
	Ph:8	0,189	10,58201
soxR	Ph:5.5	0,02275	87,91209
	Ph:7	0,025125	79,60199
	Ph:8	0,1615	12,3839
soxS	Ph:5.5	0,01975	101,2658
	Ph:7	0,026125	76,55502
	Ph:8	0,2005	9,975062
ahpC	Ph:5.5	0,024125	82,90155
	Ph:7	0,029375	68,08511
	Ph:8	0,161	12,42236
oxyR	Ph:5.5	0,019875	100,6289
	Ph:7	0,034875	57,34767
	Ph:8	0,183	10,92896
zwf	Ph:5.5	0,021	95,2381
	Ph:7	0,024125	82,90155
	Ph:8	0,228	8,77193
btuE	Ph:5.5	0,019625	101,9108
	Ph:7	0,024125	82,90155
	Ph:8	0,192	10,41667

Tablo 4.26’da görüldüğü gibi kobalt sülfatın *E.coli* ve mutantları üzerine farklı pH’larda yaşamı yaklaşık 80 gün boyunca takip edilmiştir. Yabani tip *E.coli*’nin pH-5.5, 7 ve 8’de yaşam grafiğine bakıldığında bakterinin pH-8’de yaklaşık 5 gün yaşamına devam ettiği görülmektedir (Tablo 4.27). Bunun yanında pH-7’de 96 ve pH-5.5’de 93 günden fazla yaşamına devam ettiği görülmektedir. Tablo 4.26 ve 4.27 incelendiğinde, kobalt sülfatın varlığında pH-8’in diğer pH’lardan daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir. Yabani tip ile mutantlar karşılaştırıldığında, mutantlar arasında farklı yaşam süreleri olduğu belirlenmiştir.

pH-5.5’de yapılan çalışma incelendiğinde; mutantların yabani tipden daha kısa süre yaşadığı görülmektedir. Yabani tip 90 günden fazla yaşamasına rağmen mutantın yaşam süreleri 90 günden daha azdır.

pH-7 ortamında yapılan çalışmada ise bakterilerin yine 80 günlük yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Yabani tip *E.coli* 96 gün yaşamasına rağmen, mutantların daha kısa süre yaşadığı görülmüştür.

pH-8 bakterilerin yaşamını diğer pH’lardan daha fazla etkileyen pH değeri olmuştur. Nitekim *E.coli* 5 gün yaşamına devam etmiştir. Mutantarda da yabani örneğe benzer yaşam değerleri belirlenmiştir. En fazla yaşam süresi olan mutant yaklaşık 8 gün ile *ahpC*’dir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.28). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.29).

Tablo 4.30. Alüminyum sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

AlSO ₄		0,gün	20,gün	40,gün	60,gün	80,gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,39	3,32			
	Ph:7	6,70	6,52	5,26	4,82	4,02
	Ph:8	6,43	6,28	5,86	4,96	4,32
sodA	Ph:5.5	6,70	3,87			
	Ph:7	6,60	6,36	6,15	5,36	5,02
	Ph:8	6,69	6,14	5,88	5,74	5,04
sodB	Ph:5.5	6,51	2,81			
	Ph:7	6,43	6,21	5,24	4,87	3,04
	Ph:8	6,35	6,08	5,55	4,76	3,32
sodC	Ph:5.5	6,60	3,67			
	Ph:7	6,59	6,24	5,84	5,64	5,14
	Ph:8	6,74	6,58	6,04	5,84	5,20
katE	Ph:5.5	6,56	4,02			
	Ph:7	6,67	6,22	6,12	5,58	5,19
	Ph:8	6,67	6,34	5,98	5,64	5,12
katG	Ph:5.5	6,82	4,14			
	Ph:7	6,60	6,18	5,64	5,34	5,02
	Ph:8	6,70	6,45	6,06	5,55	5,18
soxR	Ph:5.5	6,66	4,24			
	Ph:7	6,85	6,42	6,12	5,48	5,13
	Ph:8	6,70	6,48	6,22	5,86	5,34
soxS	Ph:5.5	6,56	3,89			
	Ph:7	7,31	6,34	5,84	5,12	4,97
	Ph:8	6,78	6,26	6,14	5,86	5,24
ahpC	Ph:5.5	6,69	3,04			
	Ph:7	6,74	6,24	6,10	5,62	5,20
	Ph:8	6,75	6,47	6,22	5,86	5,28
oxyR	Ph:5.5	6,73	3,59			
	Ph:7	6,86	6,25	5,86	5,41	4,99
	Ph:8	6,78	6,48	6,12	5,74	5,30
zwf	Ph:5.5	6,75	3,04			
	Ph:7	6,80	6,21	5,24	5,05	4,32
	Ph:8	6,76	6,42	5,62	5,21	4,00
btuE	Ph:5.5	6,69	3,30			
	Ph:7	6,89	6,44	5,85	4,24	3,96
	Ph:8	6,74	6,36	5,55	4,38	4,05

Tablo 4.31.Alüminyum sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

AlSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,1535	13,02932
	Ph:7	0,0335	59,70149
	Ph:8	0,026375	75,82938
sodA	Ph:5.5	0,1415	14,13428
	Ph:7	0,01975	101,2658
	Ph:8	0,020625	96,9697
sodB	Ph:5.5	0,185	10,81081
	Ph:7	0,042375	47,19764
	Ph:8	0,037875	52,80528
sodC	Ph:5.5	0,1465	13,65188
	Ph:7	0,018125	110,3448
	Ph:8	0,01925	103,8961
katE	Ph:5.5	0,127	15,74803
	Ph:7	0,0185	108,1081
	Ph:8	0,019375	103,2258
katG	Ph:5.5	0,134	14,92537
	Ph:7	0,01975	101,2658
	Ph:8	0,019	105,2632
soxR	Ph:5.5	0,121	16,52893
	Ph:7	0,0215	93,02326
	Ph:8	0,017	117,6471
soxS	Ph:5.5	0,1335	14,98127
	Ph:7	0,02925	68,37607
	Ph:8	0,01925	103,8961
ahpC	Ph:5.5	0,1825	10,9589
	Ph:7	0,01925	103,8961
	Ph:8	0,018375	108,8435
oxyR	Ph:5.5	0,157	12,73885
	Ph:7	0,023375	85,5615
	Ph:8	0,0185	108,1081
zwf	Ph:5.5	0,1855	10,78167
	Ph:7	0,031	64,51613
	Ph:8	0,0345	57,97101
btuE	Ph:5.5	0,1695	11,79941
	Ph:7	0,036625	54,60751
	Ph:8	0,033625	59,47955

Tablo 4.32. Alüminyum sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

AlSO ₄		0,gün	20,gün	40,gün	60,gün	80,gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,22	5,24	3,42		
	Ph:7	6,52	6,24	6,10	5,64	5,12
	Ph:8	6,32	6,21	6,02	5,86	5,83
sodA	Ph:5.5	6,42	4,58	3,78		
	Ph:7	6,48	6,33	6,10	5,58	5,32
	Ph:8	6,38	6,16	5,82	5,62	5,68
sodB	Ph:5.5	6,55	4,12	2,96		
	Ph:7	6,31	6,20	5,84	4,55	4,36
	Ph:8	6,24	6,11	5,85	5,56	5,02
sodC	Ph:5.5	6,42	5,17	3,75		
	Ph:7	6,48	6,14	6,18	5,84	5,58
	Ph:8	6,64	6,25	6,14	5,94	5,95
katE	Ph:5.5	6,32	5,12	4,54		
	Ph:7	6,54	6,32	6,04	5,88	5,86
	Ph:8	6,47	6,36	6,18	5,94	6,05
katG	Ph:5.5	6,71	5,84	4,76		
	Ph:7	6,52	6,18	5,99	5,61	5,33
	Ph:8	6,46	6,11	6,15	5,86	5,76
soxR	Ph:5.5	6,52	5,25	4,72		
	Ph:7	6,65	6,40	6,17	5,67	5,48
	Ph:8	6,61	6,24	6,20	5,94	5,86
soxS	Ph:5.5	6,36	5,80	4,12		
	Ph:7	6,86	6,44	5,72	5,34	5,10
	Ph:8	6,78	6,53	6,32	5,96	5,71
ahpC	Ph:5.5	6,44	3,04	3,74		
	Ph:7	6,64	6,32	6,15	5,84	5,86
	Ph:8	6,58	6,30	6,32	6,14	6,12
oxyR	Ph:5.5	6,38	5,10	4,04		
	Ph:7	6,62	6,28	6,30	5,84	5,24
	Ph:8	6,55	6,38	6,33	5,98	5,96
zwf	Ph:5.5	6,48	4,86	3,82		
	Ph:7	6,66	6,60	6,12	5,78	4,85
	Ph:8	6,57	6,33	5,86	5,88	5,12
btuE	Ph:5.5	6,60	3,30	3,64		
	Ph:7	6,72	6,34	5,92	4,66	4,28
	Ph:8	6,62	6,54	6,04	5,98	4,78

Tablo 4.33.Alüminyum sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

AlSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,07	28,57143
	Ph:7	0,0175	114,2857
	Ph:8	0,006125	326,5306
sodA	Ph:5.5	0,066	30,30303
	Ph:7	0,0145	137,931
	Ph:8	0,00875	228,5714
sodB	Ph:5.5	0,08975	22,28412
	Ph:7	0,024375	82,05128
	Ph:8	0,01525	131,1475
sodC	Ph:5.5	0,06675	29,96255
	Ph:7	0,01125	177,7778
	Ph:8	0,008625	231,8841
katE	Ph:5.5	0,0445	44,94382
	Ph:7	0,0085	235,2941
	Ph:8	0,00525	380,9524
katG	Ph:5.5	0,04875	41,02564
	Ph:7	0,014875	134,4538
	Ph:8	0,00875	228,5714
soxR	Ph:5.5	0,045	44,44444
	Ph:7	0,014625	136,7521
	Ph:8	0,009375	213,3333
soxS	Ph:5.5	0,056	35,71429
	Ph:7	0,022	90,90909
	Ph:8	0,013375	149,5327
ahpC	Ph:5.5	0,0675	29,62963
	Ph:7	0,00975	205,1282
	Ph:8	0,00575	347,8261
oxyR	Ph:5.5	0,0585	34,18803
	Ph:7	0,01725	115,942
	Ph:8	0,007375	271,1864
zwf	Ph:5.5	0,0665	30,07519
	Ph:7	0,022625	88,39779
	Ph:8	0,018125	110,3448
btuE	Ph:5.5	0,074	27,02703
	Ph:7	0,0305	65,57377
	Ph:8	0,023	86,95652

Alüminyum sülfatın etkisi altında bakteriler yaklaşık 80 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 4.30). 20 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Alüminyum sülfatın etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilediği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5’de 13 gün yaşamına devam etmesine rağmen pH-7’de yaklaşık 60 gün, pH-8’de 75 yaşamına devam etmiştir (Tablo 4.31).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB*, *btuE*, *zwf* nin yabani tipe benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB*, *katE* ve *zwf* nin alüminyum sülfatın etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.32). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.33).

Tablo 4.34.Civa-2-klorürün *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

HgCl ₂		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	80.gün	100.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,64	6,24	5,10	4,33	3,81	
	Ph:7	6,41	6,58	5,34	4,95	4,77	
	Ph:8	6,55	6,22	5,85	5,40	5,46	4,74
sodA	Ph:5.5	6,77	6,34	6,39	5,80	5,53	
	Ph:7	6,86	6,13	6,04	5,56	5,95	
	Ph:8	6,69	5,85	6,30	5,86	5,88	5,55
sodB	Ph:5.5	6,33	5,69	4,30	4,12	4,02	
	Ph:7	6,40	5,70	4,32	4,24	4,12	
	Ph:8	6,33	5,78	5,41	4,92	4,77	4,14
sodC	Ph:5.5	6,70	5,97	6,04	5,85	5,30	
	Ph:7	6,65	5,97	6,38	5,75	5,86	
	Ph:8	6,61	6,50	5,47	5,89	5,68	5,46
katE	Ph:5.5	6,73	5,82	5,19	4,39	3,78	
	Ph:7	6,88	6,11	5,77	5,36	5,16	
	Ph:8	6,69	6,74	5,78	5,68	5,38	5,25
katG	Ph:5.5	6,71	6,39	5,92	6,38	5,89	
	Ph:7	6,73	6,26	6,38	6,17	5,59	
	Ph:8	6,69	6,85	6,20	6,47	6,38	6,22
soxR	Ph:5.5	6,69	6,30	5,96	5,93	5,86	
	Ph:7	6,60	6,17	6,38	6,04	5,58	
	Ph:8	6,81	6,38	6,06	6,47	5,97	5,55
soxS	Ph:5.5	6,77	6,38	6,60	5,93	5,54	
	Ph:7	6,79	6,43	5,99	5,55	5,32	
	Ph:8	6,70	6,90	5,57	5,07	4,69	4,40
ahpC	Ph:5.5	6,70	6,30	5,81	6,38	5,97	
	Ph:7	6,84	6,26	6,50	5,74	5,96	
	Ph:8	6,61	5,63	5,74	6,47	6,50	6,00
oxyR	Ph:5.5	6,70	5,73	6,01	6,38	5,81	
	Ph:7	6,58	6,77	6,09	5,77	5,96	
	Ph:8	6,70	5,51	6,00	5,76	6,20	5,70
zwf	Ph:5.5	6,72	6,38	6,39	5,83	5,46	
	Ph:7	6,58	6,12	6,03	5,94	5,90	
	Ph:8	6,60	5,49	6,71	5,77	5,78	5,50
btuE	Ph:5.5	6,77	6,04	5,18	4,47	3,84	
	Ph:7	6,43	6,77	5,22	4,81	4,70	
	Ph:8	6,69	6,38	5,09	6,00	5,46	4,81

Tablo 4.35.Civa-2-klorürün etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

HgCl ₂		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,035375	56,5371
	Ph:7	0,0205	97,56098
	Ph:8	0,0181	110,4972
sodA	Ph:5.5	0,0155	129,0323
	Ph:7	0,011375	175,8242
	Ph:8	0,0114	175,4386
sodB	Ph:5.5	0,028875	69,26407
	Ph:7	0,0285	70,17544
	Ph:8	0,0219	91,3242
sodC	Ph:5.5	0,0175	114,2857
	Ph:7	0,009875	202,5316
	Ph:8	0,0115	173,913
katE	Ph:5.5	0,036875	54,23729
	Ph:7	0,0215	93,02326
	Ph:8	0,0144	138,8889
katG	Ph:5.5	0,01025	195,122
	Ph:7	0,01425	140,3509
	Ph:8	0,0047	425,5319
soxR	Ph:5.5	0,010375	192,7711
	Ph:7	0,01275	156,8627
	Ph:8	0,0126	158,7302
soxS	Ph:5.5	0,015375	130,0813
	Ph:7	0,018375	108,8435
	Ph:8	0,023	86,95652
ahpC	Ph:5.5	0,009125	219,1781
	Ph:7	0,011	181,8182
	Ph:8	0,0061	327,8689
oxyR	Ph:5.5	0,011125	179,7753
	Ph:7	0,00775	258,0645
	Ph:8	0,01	200
zwf	Ph:5.5	0,01575	126,9841
	Ph:7	0,0085	235,2941
	Ph:8	0,011	181,8182
btuE	Ph:5.5	0,036625	54,60751
	Ph:7	0,021625	92,48555
	Ph:8	0,0188	106,383

Tablo 4.36.Civa-2-klorürün *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

HgCl ₂		0.gün	25.gün	50.gün	75.gün	100.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,62	6,18	5,12	5,00	4,12
	Ph:7	6,55	6,24	5,38	5,12	5,10
	Ph:8	6,80	6,31	5,81	5,66	5,58
sodA	Ph:5.5	6,71	6,48	6,34	5,88	5,81
	Ph:7	6,83	6,54	6,12	6,00	5,98
	Ph:8	6,65	6,41	6,37	6,21	6,00
sodB	Ph:5.5	6,55	5,58	4,37	4,30	4,05
	Ph:7	6,47	5,94	5,39	4,96	4,88
	Ph:8	6,53	5,96	5,47	5,32	5,11
sodC	Ph:5.5	6,61	6,32	6,12	5,57	5,10
	Ph:7	6,43	6,40	6,37	6,14	5,37
	Ph:8	6,67	6,21	5,98	5,86	5,88
katE	Ph:5.5	6,50	6,00	5,15	5,00	4,85
	Ph:7	6,55	6,12	5,71	5,58	5,12
	Ph:8	6,7	6,24	5,72	5,62	5,43
katG	Ph:5.5	6,73	6,27	5,95	5,72	5,52
	Ph:7	6,65	6,42	6,33	6,11	5,85
	Ph:8	6,68	6,54	6,28	6,17	6,04
soxR	Ph:5.5	6,62	6,08	5,90	5,74	5,22
	Ph:7	6,84	6,58	6,34	5,86	5,74
	Ph:8	6,73	6,64	6,07	6,00	5,96
soxS	Ph:5.5	6,64	6,60	6,41	6,34	5,55
	Ph:7	6,64	6,32	5,97	5,95	5,95
	Ph:8	6,78	6,52	6,41	6,24	6,11
ahpC	Ph:5.5	6,61	6,15	5,82	5,74	5,68
	Ph:7	6,55	6,41	6,31	6,18	5,96
	Ph:8	6,67	6,34	6,14	6,02	6,07
oxyR	Ph:5.5	6,60	6,25	6,04	5,58	5,14
	Ph:7	6,71	6,38	6,22	6,12	5,55
	Ph:8	6,42	6,34	6,21	6,00	5,86
zwf	Ph:5.5	6,70	6,53	6,37	5,12	4,94
	Ph:7	6,72	6,28	6,03	5,54	5,18
	Ph:8	6,64	6,48	6,55	5,87	5,33
btuE	Ph:5.5	6,63	6,13	5,88	5,58	5,33
	Ph:7	6,74	6,45	6,12	5,77	5,48
	Ph:8	6,71	6,28	6,08	5,96	5,86

Tablo 4.37.Civa-2-klorürün etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

HgCl ₂		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,025	80
	Ph:7	0,0145	137,931
	Ph:8	0,0122	163,9344
sodA	Ph:5.5	0,009	222,2222
	Ph:7	0,0085	235,2941
	Ph:8	0,0065	307,6923
sodB	Ph:5.5	0,025	80
	Ph:7	0,0159	125,7862
	Ph:8	0,0142	140,8451
sodC	Ph:5.5	0,0151	132,4503
	Ph:7	0,0106	188,6792
	Ph:8	0,0079	253,1646
katE	Ph:5.5	0,0165	121,2121
	Ph:7	0,0143	139,8601
	Ph:8	0,0127	157,4803
katG	Ph:5.5	0,0121	165,2893
	Ph:7	0,008	250
	Ph:8	0,0064	312,5
soxR	Ph:5.5	0,014	142,8571
	Ph:7	0,011	181,8182
	Ph:8	0,0077	259,7403
soxS	Ph:5.5	0,0109	183,4862
	Ph:7	0,0069	289,8551
	Ph:8	0,0067	298,5075
ahpC	Ph:5.5	0,0093	215,0538
	Ph:7	0,0059	338,9831
	Ph:8	0,006	333,3333
oxyR	Ph:5.5	0,0146	136,9863
	Ph:7	0,0116	172,4138
	Ph:8	0,0056	357,1429
zwf	Ph:5.5	0,0176	113,6364
	Ph:7	0,0154	129,8701
	Ph:8	0,0131	152,6718
btuE	Ph:5.5	0,013	153,8462
	Ph:7	0,0126	158,7302
	Ph:8	0,0085	235,2941

Civa-2-klorürün etkisi altında bakteriler yaklaşık 100 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 4.34). 20 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Civa-2-klorürün etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5'de 56 gün yaşamına devam etmesine rağmen pH-7'de yaklaşık 96 gün, pH-8'de 110 gün yaşamına devam etmiştir (Tablo 4.35).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB*, *btuE*, *katE*'nin yabani tipe benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB*, *katE* ve *btuE*'nin civa-2-klorürün etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.36). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.37).

Tablo 4.38.Kurşun sülfatın *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

PbSO ₄		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	80.gün	100.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,64	6,22	5,88	5,33	4,82	4,33
	Ph:7	6,58	6,31	6,12	5,95	5,05	4,95
	Ph:8	6,32	6,22	5,85	5,68	5,46	5,40
sodA	Ph:5.5	6,34	6,18	6,22	5,88	5,71	5,53
	Ph:7	6,43	6,11	6,08	6,12	6,00	5,95
	Ph:8	6,69	6,48	6,31	6,12	5,96	5,88
sodB	Ph:5.5	6,31	6,22	5,80	5,12	4,22	4,02
	Ph:7	6,44	6,22	5,84	5,18	4,32	4,12
	Ph:8	6,28	6,21	5,85	4,92	4,81	4,77
sodC	Ph:5.5	6,24	5,98	6,00	5,82	5,38	5,30
	Ph:7	6,38	6,33	6,24	6,21	6,02	5,86
	Ph:8	6,61	6,44	6,12	6,00	5,91	5,86
katE	Ph:5.5	6,73	6,55	6,21	5,95	4,68	4,39
	Ph:7	6,22	6,10	5,95	5,76	5,46	5,36
	Ph:8	6,74	6,48	6,12	5,98	5,40	5,68
katG	Ph:5.5	6,39	6,21	6,12	6,08	5,90	5,89
	Ph:7	6,26	6,20	6,18	6,15	5,85	5,59
	Ph:8	6,85	6,85	6,20	6,47	6,38	6,38
soxR	Ph:5.5	6,30	6,21	5,96	5,90	5,91	5,86
	Ph:7	6,37	6,15	6,08	6,00	5,98	5,58
	Ph:8	6,48	6,38	6,06	6,47	5,97	5,97
soxS	Ph:5.5	6,38	6,22	6,17	5,91	5,84	5,54
	Ph:7	6,43	6,21	5,90	5,58	5,48	5,32
	Ph:8	6,90	6,74	5,87	5,27	4,99	4,69
ahpC	Ph:5.5	6,30	6,22	5,85	5,80	5,67	5,55
	Ph:7	6,30	6,26	6,21	6,12	5,98	5,96
	Ph:8	6,61	6,51	6,31	6,47	6,31	6,20
oxyR	Ph:5.5	6,66	6,33	6,18	6,04	5,96	5,81
	Ph:7	6,77	6,50	6,21	6,12	6,02	5,96
	Ph:8	6,70	6,55	6,41	6,33	6,24	6,20
zwf	Ph:5.5	6,38	6,30	6,12	5,83	5,55	5,46
	Ph:7	6,42	6,22	6,10	6,05	5,98	5,90
	Ph:8	6,60	6,33	6,11	5,97	5,81	5,78
btuE	Ph:5.5	6,77	6,52	6,22	6,02	5,55	4,47
	Ph:7	6,70	6,18	5,87	5,55	5,12	4,98
	Ph:8	6,38	6,22	6,09	6,00	6,02	6,00

Tablo 4.39.Kurşun sülfatın etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

PbSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,0231	86,58009
	Ph:7	0,0163	122,6994
	Ph:8	0,0092	217,3913
sodA	Ph:5.5	0,0081	246,9136
	Ph:7	0,0048	416,6667
	Ph:8	0,0081	246,9136
sodB	Ph:5.5	0,0229	87,33624
	Ph:7	0,0232	86,2069
	Ph:8	0,0151	132,4503
sodC	Ph:5.5	0,0094	212,766
	Ph:7	0,0052	384,6154
	Ph:8	0,0075	266,6667
katE	Ph:5.5	0,0234	85,47009
	Ph:7	0,0086	232,5581
	Ph:8	0,0106	188,6792
katG	Ph:5.5	0,005	400
	Ph:7	0,0067	298,5075
	Ph:8	0,0047	425,5319
soxR	Ph:5.5	0,0044	454,5455
	Ph:7	0,0079	253,1646
	Ph:8	0,0051	392,1569
soxS	Ph:5.5	0,0084	238,0952
	Ph:7	0,0111	180,1802
	Ph:8	0,0221	90,49774
ahpC	Ph:5.5	0,0075	266,6667
	Ph:7	0,0034	588,2353
	Ph:8	0,0041	487,8049
oxyR	Ph:5.5	0,0085	235,2941
	Ph:7	0,0081	246,9136
	Ph:8	0,005	400
zwf	Ph:5.5	0,0092	217,3913
	Ph:7	0,0052	384,6154
	Ph:8	0,0082	243,9024
btuE	Ph:5.5	0,023	86,95652
	Ph:7	0,0172	116,2791
	Ph:8	0,0038	526,3158

Tablo 4.40.Kurşun sülfatın *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

PbSO ₄		0.gün	25.gün	50.gün	75.gün	100.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,52	6,12	5,81	5,32	4,82
	Ph:7	6,45	6,31	6,22	5,96	5,12
	Ph:8	6,33	6,05	5,85	5,74	5,55
sodA	Ph:5.5	6,21	6,18	6,12	6,02	5,75
	Ph:7	6,34	6,33	6,28	6,18	6,02
	Ph:8	6,71	6,51	6,32	6,15	5,98
sodB	Ph:5.5	6,28	5,96	5,82	4,96	4,21
	Ph:7	6,40	6,18	5,94	5,32	4,37
	Ph:8	6,31	6,02	5,75	5,55	4,98
sodC	Ph:5.5	6,22	6,14	6,00	5,78	5,40
	Ph:7	6,31	6,28	6,24	6,17	6,00
	Ph:8	6,57	6,33	6,12	5,96	5,92
katE	Ph:5.5	6,66	6,55	6,21	5,28	4,64
	Ph:7	6,38	6,21	5,98	5,76	5,41
	Ph:8	6,62	6,18	6,14	5,98	5,87
katG	Ph:5.5	6,33	6,28	6,22	6,00	5,91
	Ph:7	6,30	6,21	6,18	6,11	5,88
	Ph:8	6,72	6,34	6,25	6,21	6,18
soxR	Ph:5.5	6,24	6,11	5,96	5,98	5,91
	Ph:7	6,32	6,24	6,08	6,00	5,98
	Ph:8	6,41	6,32	6,16	6,14	5,97
soxS	Ph:5.5	6,34	6,28	6,17	5,88	5,62
	Ph:7	6,41	6,34	5,90	5,52	5,45
	Ph:8	6,62	6,17	5,87	5,86	5,88
ahpC	Ph:5.5	6,25	6,12	5,85	5,78	5,62
	Ph:7	6,24	6,20	6,21	6,00	5,98
	Ph:8	6,45	6,32	6,31	6,30	6,28
oxyR	Ph:5.5	6,54	6,33	6,18	6,08	5,92
	Ph:7	6,70	6,58	6,21	6,11	6,02
	Ph:8	6,64	6,54	6,41	6,34	6,24
zwf	Ph:5.5	6,27	6,20	6,12	5,94	5,55
	Ph:7	6,40	6,34	6,14	6,05	5,98
	Ph:8	6,55	6,28	6,11	6,10	6,00
btuE	Ph:5.5	6,72	6,58	6,22	5,74	5,55
	Ph:7	6,66	6,12	5,87	5,72	5,42
	Ph:8	6,40	6,21	6,09	6,04	6,02

Tablo 4.41.Kurşun sülfatın etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

PbSO ₄		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,017	117,6471
	Ph:7	0,0133	150,3759
	Ph:8	0,0078	256,4103
sodA	Ph:5.5	0,0046	434,7826
	Ph:7	0,0032	625
	Ph:8	0,0073	273,9726
sodB	Ph:5.5	0,0207	96,61836
	Ph:7	0,0203	98,52217
	Ph:8	0,0133	150,3759
sodC	Ph:5.5	0,0082	243,9024
	Ph:7	0,0031	645,1613
	Ph:8	0,0065	307,6923
katE	Ph:5.5	0,0202	99,0099
	Ph:7	0,0097	206,1856
	Ph:8	0,0075	266,6667
katG	Ph:5.5	0,0042	476,1905
	Ph:7	0,0042	476,1905
	Ph:8	0,0054	370,3704
soxR	Ph:5.5	0,0033	606,0606
	Ph:7	0,0034	588,2353
	Ph:8	0,0044	454,5455
soxS	Ph:5.5	0,0072	277,7778
	Ph:7	0,0096	208,3333
	Ph:8	0,0074	270,2703
ahpC	Ph:5.5	0,0063	317,4603
	Ph:7	0,0026	769,2308
	Ph:8	0,0017	1176,471
oxyR	Ph:5.5	0,0062	322,5806
	Ph:7	0,0068	294,1176
	Ph:8	0,004	500
zwf	Ph:5.5	0,0072	277,7778
	Ph:7	0,0042	476,1905
	Ph:8	0,0055	363,6364
btuE	Ph:5.5	0,0117	170,9402
	Ph:7	0,0124	161,2903
	Ph:8	0,0038	526,3158

Kurşun sülfatın etkisi altında bakteriler yaklaşık 100 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 4.38). 20 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Kurşun sülfatın etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5’de 86 gün yaşamına devam etmesine rağmen pH-7’de yaklaşık 122 gün, pH-8’de 217 gün yaşamına devam etmişlerdir (Tablo 4.39).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB*, *btuE*, *katE*’nin yabani tipe benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB*, *katE* ve *btuE*’nin kurşun sülfatın etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.40). Elde ettiğimiz verilerin doğrulunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.41).

Tablo 4.42. Molibdenin *E.coli* ve mutantların yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

Mo		0.gün	10.gün	20.gün	30.gün	40.gün	50.gün	60.gün
E.coli W3110	Ph:5.5	6,28	6,22	5,88	5,54	5,33	4,86	4,18
	Ph:7	6,35	6,31	6,12	6,00	5,95	5,36	5,08
	Ph:8	6,22	6,18	5,85	5,72	5,68	5,41	5,33
sodA	Ph:5.5	6,28	6,14	6,22	5,88	5,81	5,72	5,66
	Ph:7	6,21	6,15	6,08	6,10	6,12	6,08	6,02
	Ph:8	6,45	6,31	6,28	6,21	6,14	6,00	5,98
sodB	Ph:5.5	6,29	6,21	5,80	5,55	5,12	4,18	4,22
	Ph:7	6,32	6,20	5,84	5,32	5,18	4,65	4,32
	Ph:8	6,28	6,21	5,85	5,18	4,92	4,80	4,81
sodC	Ph:5.5	6,48	5,98	6,00	5,82	5,82	5,58	5,38
	Ph:7	6,38	6,33	6,24	6,21	6,21	6,12	6,02
	Ph:8	6,45	6,41	6,32	6,28	6,20	6,21	6,12
katE	Ph:5.5	6,55	6,50	6,21	5,95	5,95	5,12	4,68
	Ph:7	6,18	6,10	5,95	5,86	5,76	5,63	5,46
	Ph:8	6,45	6,32	6,12	6,02	5,98	5,74	5,40
katG	Ph:5.5	6,21	6,20	6,12	6,10	6,08	6,00	5,90
	Ph:7	6,27	6,20	6,18	6,15	6,11	6,00	5,85
	Ph:8	6,85	6,55	6,30	6,35	6,27	6,22	6,31
soxR	Ph:5.5	6,32	6,21	6,05	6,00	5,93	5,94	5,91
	Ph:7	6,36	6,15	6,08	6,00	6,02	5,98	5,95
	Ph:8	6,45	6,38	6,26	6,17	6,10	6,02	5,97
soxS	Ph:5.5	6,35	6,22	6,17	6,08	5,91	5,90	5,82
	Ph:7	6,41	6,34	6,21	6,18	6,05	6,00	5,96
	Ph:8	6,74	6,62	6,45	6,27	6,21	6,17	6,18
ahpC	Ph:5.5	6,35	6,22	5,85	5,80	5,80	5,74	5,67
	Ph:7	6,36	6,26	6,21	6,12	6,10	6,04	5,98
	Ph:8	6,62	6,51	6,31	6,27	6,25	6,28	6,25
oxyR	Ph:5.5	6,34	6,33	6,18	6,04	6,02	6,00	5,96
	Ph:7	6,58	6,50	6,21	6,12	6,12	6,10	6,02
	Ph:8	6,58	6,55	6,41	6,33	6,33	6,30	6,24
zwf	Ph:5.5	6,31	6,30	6,12	5,83	5,84	5,76	5,55
	Ph:7	6,27	6,22	6,10	6,05	6,00	6,02	5,98
	Ph:8	6,34	6,33	6,11	5,97	5,95	5,88	5,81
btuE	Ph:5.5	6,62	6,51	6,22	6,12	6,02	5,85	5,55
	Ph:7	6,34	6,28	6,12	6,15	6,04	5,96	5,82
	Ph:8	6,32	6,22	6,09	6,00	6,00	6,02	6,02

Tablo 4.43.Molibdenin etkisi altında bakterilerin t_{99} değerleri

Mo		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli W3110	Ph:5.5	0,035	57,14286
	Ph:7	0,021167	94,48819
	Ph:8	0,014833	134,8315
sodA	Ph:5.5	0,010333	193,5484
	Ph:7	0,003167	631,5789
	Ph:8	0,007833	255,3191
sodB	Ph:5.5	0,0345	57,97101
	Ph:7	0,033333	60
	Ph:8	0,0245	81,63265
sodC	Ph:5.5	0,018333	109,0909
	Ph:7	0,006	333,3333
	Ph:8	0,0055	363,6364
katE	Ph:5.5	0,031167	64,17112
	Ph:7	0,012	166,6667
	Ph:8	0,0175	114,2857
katG	Ph:5.5	0,005167	387,0968
	Ph:7	0,007	285,7143
	Ph:8	0,009	222,2222
soxR	Ph:5.5	0,006833	292,6829
	Ph:7	0,006833	292,6829
	Ph:8	0,008	250
soxS	Ph:5.5	0,008833	226,4151
	Ph:7	0,0075	266,6667
	Ph:8	0,009333	214,2857
ahpC	Ph:5.5	0,011333	176,4706
	Ph:7	0,006333	315,7895
	Ph:8	0,006167	324,3243
oxyR	Ph:5.5	0,006333	315,7895
	Ph:7	0,009333	214,2857
	Ph:8	0,005667	352,9412
zwf	Ph:5.5	0,012667	157,8947
	Ph:7	0,004833	413,7931
	Ph:8	0,008833	226,4151
btuE	Ph:5.5	0,017833	112,1495
	Ph:7	0,008667	230,7692
	Ph:8	0,005	400

Tablo 4.44. Molibdenin *E.coli* ve komplementlerin yaşamı üzerine etkisi

(Log sayı-cfu/ml)

Mo		0.gün	20.gün	40.gün	60.gün
E.coli IPTG	Ph:5.5	6,34	6,21	5,85	4,96
	Ph:7	6,37	6,24	6,12	5,45
	Ph:8	6,42	6,18	5,89	5,97
sodA	Ph:5.5	6,64	6,18	6,20	5,61
	Ph:7	6,70	6,14	6,08	6,00
	Ph:8	6,78	6,31	6,22	6,18
sodB	Ph:5.5	6,12	6,20	5,85	4,88
	Ph:7	6,11	6,22	5,88	4,91
	Ph:8	6,14	6,21	5,85	5,42
sodC	Ph:5.5	6,35	5,98	6,00	5,58
	Ph:7	6,44	6,33	6,24	6,12
	Ph:8	6,40	6,41	6,32	6,21
katE	Ph:5.5	6,61	6,50	6,21	5,12
	Ph:7	6,22	6,10	5,95	5,63
	Ph:8	6,41	6,32	6,12	5,74
katG	Ph:5.5	6,34	6,20	6,12	5,66
	Ph:7	6,30	6,20	6,18	5,81
	Ph:8	6,72	6,55	6,30	6,00
soxR	Ph:5.5	6,52	6,21	6,05	5,74
	Ph:7	6,35	6,15	6,08	5,98
	Ph:8	6,44	6,38	6,26	6,00
soxS	Ph:5.5	6,33	6,22	6,17	5,90
	Ph:7	6,38	6,34	6,21	6,00
	Ph:8	6,52	6,62	6,45	6,17
ahpC	Ph:5.5	6,27	6,22	5,85	5,74
	Ph:7	6,32	6,26	6,21	6,04
	Ph:8	6,55	6,51	6,31	6,28
oxyR	Ph:5.5	6,32	6,33	6,18	5,65
	Ph:7	6,45	6,50	6,21	5,87
	Ph:8	6,48	6,55	6,41	6,00
zwf	Ph:5.5	6,28	6,30	6,12	5,76
	Ph:7	6,25	6,22	6,10	6,02
	Ph:8	6,30	6,33	6,11	5,88
btuE	Ph:5.5	6,54	6,51	6,22	5,85
	Ph:7	6,32	6,28	6,12	5,96
	Ph:8	6,80	6,22	6,09	6,18

Tablo 4.45. Molibdenin etkisi altında komplementlerin t_{99} değerleri

Mo		-K değeri	t_{99} değeri
E.coli IPTG	Ph:5.5	0,023	86,95652
	Ph:7	0,015333	130,4348
	Ph:8	0,0075	266,6667
sodA	Ph:5.5	0,0103	194,1748
	Ph:7	0,00875	228,5714
	Ph:8	0,006	333,3333
sodB	Ph:5.5	0,020667	96,77419
	Ph:7	0,02	100
	Ph:8	0,012	166,6667
sodC	Ph:5.5	0,012833	155,8442
	Ph:7	0,005333	375
	Ph:8	0,003167	631,5789
katE	Ph:5.5	0,024833	80,53691
	Ph:7	0,009833	203,3898
	Ph:8	0,011167	179,1045
katG	Ph:5.5	0,011333	176,4706
	Ph:7	0,008167	244,898
	Ph:8	0,012	166,6667
soxR	Ph:5.5	0,007833	255,3191
	Ph:7	0,005	400
	Ph:8	0,0055	363,6364
soxS	Ph:5.5	0,007167	279,0698
	Ph:7	0,006333	315,7895
	Ph:8	0,005833	342,8571
ahpC	Ph:5.5	0,008833	226,4151
	Ph:7	0,004667	428,5714
	Ph:8	0,0045	444,4444
oxyR	Ph:5.5	0,011167	179,1045
	Ph:7	0,009667	206,8966
	Ph:8	0,008	250
zwf	Ph:5.5	0,008667	230,7692
	Ph:7	0,003833	521,7391
	Ph:8	0,007	285,7143
btuE	Ph:5.5	0,0115	173,913
	Ph:7	0,006	333,3333
	Ph:8	0,010333	193,5484

Molibdenin etkisi altında bakteriler yaklaşık 60 gün boyunca takip edilmiştir (Tablo 4.42). 20 gün aralıklarla örnekler alınmış ve yaşam grafikleri çıkarılmıştır. Molibdenin etkisi altında pH-5.5 bakterilerin yaşamını diğer pH lardan daha fazla etkilendiği görülmektedir. Yabani tip *E.coli* pH-5.5’de 57 gün yaşamına devam etmesine rağmen pH-7’de yaklaşık 94 gün, pH-8’de 134 gün yaşamına devam etmişlerdir (Tablo 4.43).

Mutantlar üzerine etkinin nasıl olduğuna bakıldığında, *sodB* ve *katE*’nin yabani tiple benzer yaşam süreleri göstermesine rağmen diğer mutantların daha uzun yaşama sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da bize *sodB* ve *katE*’nin molibdenin etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Mutasyonların etkilerini doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır (Tablo 4.44). Elde ettiğimiz verilerin doğruluğunu test ettiğimiz bu deneyler ile yabani tip gibi veriler elde edilmesi bu genlerin rollerini kontrolünü sağlamıştır (Tablo 4.45).

4.4. Katı Besiyerinde Metallerin Etkisi

Tablo 4.46. Kadmiyumun katı besiyerinde bakterilere etkisi

Cd	0,06mM	0,07mM	0,08mM
E.coli W3110	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
sodA	10 ⁷ +	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
sodA kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
sodB	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ² + 10 ³ -
sodB kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
sodC	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
sodC kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
katE	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ³ + 10 ⁴ -
katE kom	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
katG	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
katG kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
soxS	10 ⁷ +	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
soxS kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
soxR	10 ⁷ +	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
soxR kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
ahpC	10 ⁷ +	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ² + 10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ¹ + 10 ² -
btuE	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -
btuE kom	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
oxyR	10 ⁷ +	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ² + 10 ³ -
oxyR kom	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ⁵ + 10 ⁶ -	10 ¹ + 10 ² -
zwf	10 ⁷ +	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ² + 10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ + 10 ⁷ -	10 ⁴ + 10 ⁵ -	10 ¹ + 10 ² -

Tablo x: 10^x+ = x tüpünde üremenin olduğunu gösterir.

10^x- = x tüpünde üremenin olmadığını gösterir.

Kadmiyumun etkisi altında, katı besiyerinde, üç konsantrasyonda yaptığımız çalışmada kadmiyumun mutantların ve komplementerlerin üzerindeki etkisine bakıldı; *sodA*, *katE*, *ahpC*, *oxyR* ve *zwf* nin yabancı tipe nazaran daha dirençli olduğu gözlemlendi. Yani yabancı tipten daha uzun süre yaşadıkları anlaşılmıştır.

Tablo 4.47.Manganın katı besiyerinde bakterilere etkisi

Mn	2mM		2,5mM		3mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
katG kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁷ +		10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -	10 ² +	10 ³ -
soxR kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
btuE kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -

Manganın etkisi altında, katı besiyerinde, üç konsantrasyonda yaptığımız çalışmada, manganın mutantların ve komplementerlerin üzerindeki etkisine baktığımızda; *sodB*, *btuE*, *oxyR* ve *zwf* nin yabancıl tipe nazaran daha dirençsiz olduğu gözlemlendi. Bu da bize *sodB*, *btuE*, *oxyR* ve *zwf* nin manganezin etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.48. Nikelinkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Ni	0,7mM		0,8mM		0,9mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
sodB	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
sodB kom	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
sodC	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG kom	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
soxS	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
soxR	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
ahpC	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
btuE	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
oxyR	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
zwf	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -

Nikelin etkisi altında, katı besiyerinde, üç konsantrasyonda yaptığımız deneyler sonucunda; yabancı tipe oranla *sodC*, *soxS*, *soxR*, *ahpC*, *oxyR* ve *zwf* nin daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Yani bu mutantlar daha uzun süre yaşamaya devam etmişlerdir. Diğer mutantlar yabancı tip ile benzer sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.49.Çinkonunkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Zn	0,3mM		0,4mM		0,5mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -

Çinkonun etkisi altında, katı besiyerinde üç konsantrasyonda yaptığımız çalışmada; çinkonun mutantların ve komplementerlerin üzerindeki etkisine bakıldı. *sodB*'nin yabancı tipe nazaran daha dirençsiz olduğu gözlemlendi. Yani daha kısa sürede öldüğü anlaşıldı. Bu da bize *sodB*'nin çinkonun etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgesi olduğunu göstermektedir. *katE*, *katG* ve *soxR*'nin yabancı tipe oranla daha dirençli olduğu görülmektedir.

Tablo 4.50. Kobaltın katı besiyerinde bakterilere etkisi

Co	0,3mM		0,4mM		0,5mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁷ +		10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -

Kobaltın etkisine üç konsantrasyonda, kat besiyerinde bakıldı ve *sodB*'nin yabancı tipe oranla daha dirençsiz olduğu görüldü yani *sodB*'nin kobaltın etkisinde bakteriler için önemli bir gen bölgesi olduğu anlaşıldı.

Tablo 4.51. Bakırın katı besiyerinde bakterilere etkisi

Cu	0.6 mM		0.7mM		0.8mM	
E.coli W3110	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
sodA	10^7+		10^6+	10^7-	10^2+	10^3-
sodA kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
sodB	10^6+	10^7-	10^6+	10^7-	10^2+	10^3-
sodB kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
sodC	10^7+		10^5+	10^6-	10^1+	10^2-
sodC kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
katE	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^2+	10^3-
katE kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
katG	10^7+		10^2+	10^3-	10^1+	10^2-
katG kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
soxS	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
soxS kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
soxR	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
soxR kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
ahpC	10^6+	10^7-	10^5+	10^6-	10^1+	10^2-
ahpC kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
btuE	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^2+	10^3-
btuE kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
oxyR	10^6+	10^7-	10^5+	10^6-	10^1+	10^2-
oxyR kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
zwf	10^7+		10^3+	10^4-	10^1+	10^2-
zwf kom	10^6+	10^7-	10^3+	10^4-	10^1+	10^2-

Bakırın etkisine üç konsantrasyonda, katı besiyerinde bakıldı ve yabancı tipile mutantların direnç oranlarında benzerlikler gözlemlendi.

Tablo 4.52. Kromunkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Cr	1mM		2mM		3mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -
sodA kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -	10 ² +	10 ³ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
katG kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -	10 ² +	10 ³ -
soxR kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
btuE kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -

Tablo 4.52 'de Kromun katı besiyerinde, üç konsantrasyonda etkisine bakıldı ve *sodB* *sodC*, *ahpC* ve *oxyR*'nin yanlı tipe nazaran daha dirençsiz olduğu gözlemlendi. Bu da bize *sodB* *sodC*, *ahpC* ve *oxyR*'nin kromun etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.53. Civanınkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Hg	0,05mM		0,06mM		0,07mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ² +	10 ³ -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
sodC	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ¹ +	10 ² -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
katG	10 ⁷ +		10 ² +	10 ³ -	10 ¹ +	10 ² -
katG kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
soxS	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
soxR	10 ⁷ +		10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
btuE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ² +	10 ³ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ¹ +	10 ² -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf	10 ⁷ +		10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ³ +	10 ⁴ -	10 ¹ +	10 ² -

Tablo 4.53’de civanın üç konsantrasyonda katı besiyerinde etkisine bakıldığında yabancı tipile mutantların direnç oranlarında benzerlikler gözlemlendi.

Tablo 4.54. Molibdenin katı besiyerinde bakterilere etkisi

Mo	0,5mM		0,6mM		0,7mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katE	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ --	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -

Tablo 4.54'de Molibdenin katı besiyerinde üç konsantrasyonda, mutantların ve komplementerlerin üzerindeki etkisine bakıldı. *sodB*'nin yabancı tipe nazaran daha dirençsiz olduğu gözlemlendi. Bu da bize *sodB*'nin molibdenin etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir. Diğer mutantlar yabancı tip ile benzer sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.55. Kurşununkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Pb	0,07mM		0,08mM		0,09mM	
E.coli W3110	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodA	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodA kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodB kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodC	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
sodC kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
katE	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ³ +	10 ⁴ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
katG kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
soxS kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
soxR	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
soxR kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
ahpC	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ¹ +	10 ² -
btuE	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR kom	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ¹ +	10 ² -
zwf	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -

Tablo 4.55’de katı besiyerinde, üç konsantrasyonda kurşunun etkisine bakıldığında yabancı tipile mutantların direnç oranlarında benzerlikler görülmektedir.

Tablo 4.56. Alüminyumunkatı besiyerinde bakterilere etkisi

Al	1mM		1,5mM		2mM	
E.coli W3110	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodA	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodA kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodB	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ¹ +	10 ² -
sodB kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
sodC	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
sodC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katE	10 ⁷ +		10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁴ +	10 ⁵ -
katE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
katG	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -
katG kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxS kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxR	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
soxR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC	10 ⁷ +		10 ⁴ +	10 ⁵ -	10 ² +	10 ³ -
ahpC kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
btuE kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR	10 ⁷ +		10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
oxyR kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -
zwf kom	10 ⁶ +	10 ⁷ -	10 ⁵ +	10 ⁶ -	10 ² +	10 ³ -

Tablo 4.56’da katı besiyerinde, üç konsantrasyonda alüminyumunun mutantların ve komplementerlerin üzerindeki etkisine bakıldı. *sodB*’nin yabancıl tipe nazaran daha dirençsiz olduğu gözlemlendi. Bu da bize *sodB*’nin alüminyumun etkisi altında bakteriler için önemli gen bölgeleri olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 11 farklı metal ile 11 farklı oksidatif stres geninin ilişkisinin araştırılması ve metallere karşı dirençte global moleküler mekanizmanın açıklanmaya çalışılması amaçlanmıştır.

Kullandığımız metallerin farklı pH'larda, farklı molaritede mutantlar üzerinde toksik etki oluşturduğu gözlemlenmiştir. Herbir mutant için bu metallerin toksisitesinin değiştiği, daha çabuk ölümüne neden olduğu mutantın önemli bir gen bölgesi olduğu anlaşılmıştır.

Tek tek kullandığımız ağır metallerin etkisine baktığımızda; Zn'nin DNA'nın elektrostatik gücünde ve çeşitli enzimlerin stabilizasyonunda görev aldığı bilinmektedir. Ancak bu elementin yüksek seviyelerde toksik özellik gösterdiği ve bu nedenle bu metalin fazla olduğu durumlarda hücreleri korumak üzerine düzenlemelerde bulunduğu bilinmektedir (Konopka ve Zakharova, 1999; Lim ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada çinko tip III sekresyon sisteminin fonksiyon kaybına neden olduğu görülmüştür (Mellies ve ark., 2012). Yaptığımız çalışmalarda da çinko sülfatın toksik etkisinin asidik ortamda daha çok olduğunu gözlemledik. Özellikle *sodB* gen bölgesinin bu pH'da çinko sülfatın bulunduğu ortamda bakterileri koruduğunu gözlemledik.

Bakır reaktif oksijen radikal üretimine sebep olan metal olarak en fazla çalışılan metallerdendir. *E. coli*'de bakır direnci koromozomal kodlanan bakır direnç genleri ile kontrol edilmektedir. Metalleri dışarıya veya içeriye taşıyan sistemlere sahiptirler. Bakır toksistesinin en temel nedeninin reaktif oksijen üretimini sağlaması olarak ifade edilmektedir (Rensing ve Grass, 2003). Yapılan bir çalışmada oksidatif DNA tamir mekanizması veya SOD eksik olan strainlerin bakır varlığına aşırı hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir (Kimura ve Nishioka, 1997; Battiston ve ark., 2000). Yaptığımız çalışmalarda da bakır sülfatın toksik etkisinin asidik ortamda daha fazla olduğunu gözlemledik. Özellikle *sodB* gen bölgesinin bu pH'da bakır sülfatın bulunduğu ortamda bakterileri koruduğunun anlaşılmasını sağladık yani global kontrol ağlarında metal direncinde bu gen bölgesinin rol oynadığı görülmektedir.

Kadmiyum biyolojik bir fonksiyonu olmadığı bilinmesine rağmen hücreler tarafından kolayca transfer edilebilmektedir. Bakterilerde Cd büyüme oranını azaltır, lag fazını uzaltır, hücre yoğunluğunun azalmasına ve hatta doz artışı ile ölümüne neden olmaktadır (Sinha ve Mukherjee, 2009). Ayrıca son yapılan bir çalışma Cd stresinin *E. coli*'nin morfolojisindedeki değişimlere neden olduğunu göstermiştir (Hossain ve ark., 2012). Cd stresinin *E. coli*'de DNA tamir, ısı şok, soğuk şok, osmotik stres, asit stres, antibiyotik direnci, SOS, stringent cevap sistemi oksidatif stress cevaplarını indüklediği gösterilmiştir (Vanbogelen ve ark., 1987; Blom ve ark., 1992; Ferienc ve ark., 1998; Wang ve Crowley, 2005; Shen ve ark., 2012). Kadmiyum sülfatın etkisi altında yaptığımız çalışmalarda fosfat tamponunda bazik pH'nın bakteriler üzerinde daha fazla etkili olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle *sodB* ve *katE* gen bölgesinin kadmiyum sülfatın bulunduğu ortamda bakterileri koruduğunun anlaşılması sağlanmıştır.

Birçok bakteride civa toksistesine karşı direnç genleri bulunmaktadır. MerR regülatörü Hg yokluğunda baskılanır ve bu regülatör tarafından kontrol edilen bu genler dolayısı ile civa varlığında eksprese edilir (Guoh ve ark., 2010). Regülatörün aktivasyonu ortamdaki civa varlığı ile olmaktadır. Civa regülatörünün kontrolündeki genler *merT*, *merP*, *merA*, *merB*, *merD* dir. (Mason ve ark., 1995; Barkay ve ark., 2003; Clarkson ve ark., 2007). Civanın bakteriler üzerindeki etkisini yaptığımız deneylerle incelemiş olduk. Civanın toksik etkisinin asidik ortamlarda daha çok olduğunu gözlemledik. Yapmış olduğumuz bütün deneyler sonucunda *sodB* gen bölgesinin civanın varlığında bakterileri koruduğunu tespit etmiş olduk.

Mangan hidroksil radikal oluşumu reaksiyonunu katalizlememektedir (Cheton ve Archibald, 1988). *E. coli*'de Mn taşınması ile ilgili genler henüz tanımlanmamıştır (Kehres ve ark., 2000). Fotosentez, aminoasit metabolizması, aromatik asit metabolizması, sinyal transdüksiyonu, nükleik asit degradasyonu gibi bir çok metabolik yolda mangan gereklidir (Jakubovics ve Jenkinson, 2001). Yapmış olduğumuz deneyler sonucunda manganın toksik etkisinin varlığını saptamış olduk. Asidik pH'da daha fazla bir etki oluşturduğunu gözlemledik. En fazla etkiyi *sodB*,

katE ve *zwf* genlerinde gördük. Böylece bu gen bölgelerinin manganın etkisi altında bakterileri koruduğunun anlaşılmasını sağlamış olduk.

Cu, Cr, Co redoks döngü reaksiyonlarını sağlayarak toksik olurken, Hg, Cd, Ni glutasyon eksikliği ve proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak etki gösterir. Yapılan çalışmalarda demir, bakır, kadmiyum, kromium, civa, nikel, ve vanadium gibi metallerin reaktif oksijen radikal üretimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Brocklehurst ve Morby 2000).

Yapılan deneyler sonucunda kromun, alüminyumun, kurşunun ve molibdenin pH:5.5'de toksisitesinin daha fazla olduğu anlaşıldı ve özellikle *sodB* gen bölgesinin bakterileri koruduğunun anlaşılması sağlandı.

Nikelin bilinen biyolojik fonksiyonu olmamakla beraber az oranda zehirleyici özelliği vardır (Kartal ve ark., 2004). Nikelin fosfat tamponunda etkisinin bazik ortamda daha toksik olduğu görülmektedir. Özellikle *sodB* gen bölgesinin bu pH'da nikel sülfatın bulunduğu ortamda bakterileri koruduğunun anlaşılması sağlandı.

Sonuçlara göre *sodB*, *katE*, *btue*, *zwf*, genlerinin fotooksidatif stres altında yaşam için oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. Ancak oksidatif stres ile ilişkili genler arasında *katE* ve özellikle *sodB* genlerinin fazla hassasiyet göstermesi ve diğer genlerin arasından seçim göstermesi dikkat çekici bir sonuçtur. Kullandığımız ağır metallere de en hızlı toksisite gösterenin bakır olduğun gözlemlenmiştir.

Metaller ile ilgili kapsamlı çalışmalar yetersiz olduğu için kullandığımız metallere farklı ortamlarda da etkisine bakılmalıdır. Bu çalışmada fosfat tamponu kullanılmıştır. Tatlı su, göl suyu, deniz suyu ya da farklı koşullar altında da çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Çalışmalar sonucunda etkilenen gen bölgelerinin daha ayrıntılı testleri yapılmalıdır. Bu genlerin regülatör bölgeleriyle ilişkisinin nasıl olduğu araştırılmalıdır.

Bakterilerin en çok etkilediği ağır metallere daha farklı stres koşullarında metal toksisitesine karşı etkilerine bakılıp literatüre daha kapsamlı sonuçlar eklenmelidir.

6. KAYNAKÇA

Akman Ö., Atasever S., Güçlü E., Gümüş G., Çandar T., Alüminyum ve İnsan, tip.baskent.edu.tr/egitim/mezuniyetoncesi/calismagrp, (2014).

Altaş S., *Cedrus Libani* (Sedir) ve *Abies Clicia* (Kökmar) Reçine Öütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (2009).

Altınışik M., Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar Tıp Fakültesi Biyokimya, *ADU Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı*, s. 2-9 (2000)

Aono, R., Tsukagoshi, N., & Yamamoto, M., Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12, *Journal of bacteriology*, 180(4), 938-944 (1998).

Babai, R., & Ron, E. Z., An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals, *FEMS microbiology letters*, 167(2), 107-111 (1998).

Barkay, T., Miller, S. M., & Summers, A. O., Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 355-384 (2003).

Barras, F., & Fontecave, M., Cobalt stress in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: molecular bases for toxicity and resistance, *Metallomics*,3(11), 1130-1134 (2011).

Battistoni, A., Pacello, F., Folcarelli, S., Ajello, M., Donnarumma, G., Greco, R., ... & Valenti, P, Increased expression of periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase enhances survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells, *Infection and immunity*, 68(1), 30-37 (2000).

Belliveau, B. H., Starodub, M. E., & Trevors, J. T., Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment, *Canadian journal of microbiology*, 37(7), 513-520 (1991).

Blom, A., Harder, W., & Matin, A., Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*, *Applied and environmental microbiology*, 58(1), 331-334 (1992).

Braun, V., & Killmann, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem, *Trends in biochemical sciences*, 24(3), 104-109 (1999).

Brocklehurst, K. R., & Morby, A. P., Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology, *Microbiology*, 146(9), 2277-2282 (2000).

Brown, N. L., Brocklehurst, K. R., Lawley, B., & Hobman, J. L., Metal regulation of gene expression in bacterial systems. In *Molecular Microbiology* (pp. 159-173), Springer Berlin Heidelberg (1998).

Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W., Microbial resistance to metals in the environment, *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207 (2000).

Cheton, P. L., & Archibald, F. S., Manganese complexes and the generation and scavenging of hydroxyl free radicals, *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5), 325-333 (1988).

Clarkson, T. W., Vyas, J. B., & Ballatori, N., Mechanisms of mercury disposition in the body, *American Journal of Industrial Medicine*, 50(10), 757-764 (2007).

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., ... & Smeets, K., Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940 (2010).

Demiray, E., ve Bekmen, N. Helicobacter Pylori Enfeksiyonu Ve Fagositoz (2008).

Dempe, B., Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon—a review, *Gene*, 179(1), 53-57 (1996).

Ferianc, P., & Farewell, A., The cadmium-stress stimolon of *Escherichia coli* K-12, *Microbiology*, 144(4), 1045-1050 (1998).

Gelegen, L., ve Yeşilada, E., Drosophila melanogaster'in bazı gelişimsel özellikleri üzerine kadmiyum nitratın etkisi, *Turk J of Biol*, 24, 585-591 (2000).

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y., Algal antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23(1-1), 85-89 (2006).

Güner U., Toksikoloji, *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi*, (2008).

Harnett, N. M., & Gyles, C. L., Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains, *Applied and environmental microbiology*, 48(5), 930-935 (1984).

Hantke, K., Iron and metal regulation in bacteria, *Current opinion in microbiology*, 4(2), 172-177 (2001).

Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J., & Nies, D. H., Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology*, 190(15), 5431-5438 (2008).

Hossain, S. T., & Mukherjee, S. K., Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells, *Journal of hazardous materials*, 260, 1073-1082 (2013).

Imlay, J. A., & Linn, S., DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 240(4857), 1302-1309 (1988).

İdil Ö., Farklı Dalga Boylu Işınlardan Etkisinde Fotosensitizasyonun Karadeniz Suyunda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamına ve Oksidatif Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması , *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* (2006).

Jakubovics, N. S., & Jenkinson, H. F., Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria, *Microbiology*, 147(7), 1709-1718 (2001).

Jamieson, D. J., & Storz, G., Transcriptional regulators of oxidative stress responses, *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34, 91-115 (1997).

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., & Timur, S., Metallerin çevresel etkileri-I., *Metaller Dergisi*, 136, 47-53 (2004).

Kan F., Afyon Manda Kaymağı Ve Kaymakaltı Sütlerinde Bazı Ağır Metallerin İçeriklerinin Araştırılması, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü* (2015).

Karlı, Ş., Ceran, N., Genç, İ., İnan, A., Öztürk, D., Taşdemir, C., ... & Göktaş, P., Toplum Ve Hastane Kaynaklı İnfeksiyonlardan İzole Edilen Gsbl Pozitif *Escherichia Coli* Suşlarında Tigesiklin Duyarlılığının Araştırılması, *Ankem Derg*, 24(4), 209-214 (2010).

Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., ve Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-II, *İTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İstanbul*, 15s (2004).

Kayış T., Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla Turionellae* L.'nin Eşey Oranı Ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (2010).

Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., & Maguire, M. E., The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen, *Molecular microbiology*, 36(5), 1085-1100 (2000).

Kimura, T., & Nishioka, H., Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 389(2), 237-242 (1997).

Konopka, A., & Zakharova, T., Quantification of bacterial lead resistance via activity assays, *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 17-22 (1999).

Lee, J., Hwang, K. T., Chung, M. Y., Cho, D. H., & Park, C. S., Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect, *Journal of food science*, 70(8), m388-m391 (2005).

Lushchak, V. I., Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 175-190 (2011).

Moore, C. M., Gaballa, A., Hui, M., Ye, R. W., & Helmann, J. D., Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress, *Molecular microbiology*, 57(1), 27-40 (2005).

Mason, R. P., Morel, F. A., & Hemond, H. F., The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters, *Water, Air, and Soil Pollution*, 80(1-4), 775-787 (1995).

Matuszewska, E., Kwiatkowska, J., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. ***Microbiology***, 154(6), 1739-1747 (2008).

McENTEE, J. D., Woodrow, J. R., & Quirk, A. V., Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp., ***Applied and environmental microbiology***, 51(3), 515-520 (1986).

Mellies, J. L., Thomas, K., Turvey, M., Evans, N. R., Crane, J., Boedeker, E., & Benison, G. C., Zinc-induced envelope stress diminishes type III secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*, ***BMC microbiology***, 12(1), 123 (2012).

Mercan, U., Toksikolojide serbest radikallerin önemi, ***Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, 15(1), 91-96 (2004).

Mitra, R. S., Gray, R. H., Chin, B., & Bernstein, I. A., Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd²⁺, ***Journal of Bacteriology***, 121(3), 1180-1188 (1975).

Mitra, R. S., & Bernstein, I. A., Nature of the repair process associated with the recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd²⁺, ***Biochemical and biophysical research communications***, 74(4), 1450-1455 (1977).

Okcu M, Tozlu E, Kumlay A.M, Pehlivan M., Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri, ***Review*** 14-26 ISSN:1307-3311 17 (B) – 2009

Pierre, J. L., & Fontecave, M., Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry, ***Biometals***, 12(3), 195-199 (1999).

Rensing, C., & Grass, G., *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment, ***FEMS microbiology reviews***, 27(2-3), 197-213 (2003).

Sabuncuoğlu, S., & Özgüneş, H., Kemoterapi, Serbest Radikaller Ve Oksidatif Stres, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 137-150 (2011).

Sağlık Bakanlığı, *Escherichia Coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması (2005).

Schwarz, S. T., & Blobel, H., Plasmids and resistance to antimicrobial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* from pigs and cattle, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 36(1-10), 669-673 (1989).

Shen, J., Qiao, Z. J., Xing, T. J., Zhang, L. P., Liang, Y. L., Jin, Z. P., ... & Pei, Y. X., Cadmium toxicity is alleviated by AtLCD and AtDCD in *Escherichia coli*, *Journal of applied microbiology*, 113(5), 1130-1138 (2012).

Silver, S., Bacterial resistances to toxic metal ions-a review, *Gene*, 179(1), 9-19 (1996).

Sinha, S., & Mukherjee, S. K., *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1, a possible candidate for cadmium bioremediation., *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 655-662 (2009).

Storz, G., & Imlay, J. A., Oxidative stress, *Current opinion in microbiology*, 2(2), 188-194 (1999).

Şimşek S., Düşük Tenörlü Mangan Cevherlerinin Zenginleştirilmesinin Araştırılması, *Maden Mühendisliği Anabilim Dalı* (2011).

Tekelioğlu, Ö., Cyanex 923 immobilize edilmiş sol jel silika ile sulardaki Cr (VI)'nin giderilmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2010).

Touati, D., Iron and oxidative stress in bacteria, *Archives of biochemistry and biophysics*, 373(1), 1-6 (2000).

Uzzau, S., Bossi, L., & Figueroa-Bossi, N., Differential accumulation of Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity, *Molecular microbiology*, 46(1), 147-156 (2002).

Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D., Metals, toxicity and oxidative stress, *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208 (2005).

VanBogelen, R. A., Acton, M. A., & Neidhardt, F. C., Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*, *Genes & development*, 1(6), 525-531 (1987).

Wang, A., & Crowley, D. E., Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology*, 187(9), 3259-3266 (2005).

Yazoğlu, P. T., Pirinç Kabuğu K÷lünden Üretilen Kalsiyum Silikatın Ve Aktif Karbonun Ağır Metal Adsorpsiyon Özelliklerinin Kıyaslanması, *Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2010).

Yüzereroğlu T. A., Oreochromis Niloticus'da Bakır, Kadmiyum Ve Bakırkadmiyum Etkileşiminde Metallerin Doku Ve Organlarda Birikimi, Eliminasyonu Ve Antioksidant Enzim Aktivitelerine Etkileri, *Çukurova Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü* (2011).

Yüzüğüllü, Y., ve Ögel, Z. B., Çift Aktiviteli Katalaz-Fenol Oksidazının ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi, *Gıda Dergisi*, 38(2) (2013).

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., & Storz, G., OxyR and SoxRS regulation offur, *Journal of bacteriology*, 181(15), 4639-4643 (1999).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MACİT, İkbal
Uyruğu : T.C.
Doğumtarihi ve yeri : 06.04.1985 Merzifon
Medenihali : Bekar
Telefon : 0 535 254 97 09
e-mail : ikma85@hotmail.com.

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Lisans	ESKİŞEHİR Osmangazi Üni./Biyoloji	2009
Lise	AMASYA Anadolu Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Proje

TUBİTAK 3001-Başlangıç AR-GE Projeleri Destekleme Programı –
Escherichia coli'de oksidatif stres ile ilişkili genlerin metal direncindeki rollerinin araştırılması -2014-2016