

582.282.232

Ö 99 k

MFN 4414



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

KLUYVEROMYCES TURU MAYALARDA METAL
DİRENÇLİLİĞİ, METAL BİYOSORPSİYONU VE
METAL-BAĞLANMA PROTEİNLERİNİN
TANIMLANMASINA İLİŞKİN ÇALIŞMALAR

PROJE NO: TBAG - 1010

1997-993

Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

582.282.232

ö 99 k

**KLUYVEROMYCES TÜRÜ MAYALARDA METAL
DİRENÇLİLİĞİ, METAL BİYOSORPSİYONU VE
METAL-BAĞLANMA PROTEİNLERİNİN
TANIMLANMASINA İLİŞKİN ÇALIŞMALAR**

PROJE NO: TBAG - 1010

1997-993

ODTÜ
Biyoloji Bl.

Doç. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

S. 85

Doç. Dr. F Bengi DİLEK

R. 88

Prof. Dr. Celal F. GÖKÇAY

Eylül 1993

ANKARA

18383

ÖNSÖZ

Bu rapor, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TBAG-1010 sayılı projenin yürütülmesi sırasında elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir.

Raporla ilgili bütün deneyler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında, Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre ile metal konsantrasyonu ölçümleri ise Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Gösterdikleri yardımdan dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na ve Temel Bilimler Araştırma Grubu'na şürkanlarımızı sunarız.

Proje süresince bizleri her yönden destekleyen hocamız Prof. Dr. Gürdal Alaeddinoğlu'na minnettarız.

Çalışmada kullanılan altın numunelerini temin eden Almet Metal End. Tic. A. Ş. Gn. Müdürü Sn. Mustafa Kaya'ya da bu vesile ile teşekkür ederiz.

Ayrıca, bu projede üstün bir görev anlayışı ile çalışan Kemal Demirtaş'a teşekkürü bir borç biliriz.

Doç. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

ÖZ

Saccharomyces cerevisiae'nin Cup1^R bir suşu ile karşılaştırıldığında, Kluyveromyces türlerinin toksik ağır metallere çok daha fazla dirençli oldukları bulunmuştur. Direnç kalıplarının daha net belirlenebilmesi amacıyla, metal konsantrasyonundaki artışların organizmaların üreme hızı ve maksimum biyokütle ağırlıkları üzerine etkileri çalışılmıştır.

S. cerevisiae ve K. marxianus'un metallere maruz bırakılmalarını takiben protein profilleri analiz edildiğinde, metalotiyonin sentezinin S. cerevisiae'da bakır ve gümüş ile indüklenmesine karşın K. marxianus'da konstitütif olduğu görülmüştür. Ayrıca, gümüş ve kadmiyum ile muamele edildiğinde, K. marxianus'da metalotiyoninden daha küçük molekül ağırlıkta bir diğer proteinin sentezlendiği bulunmuştur.

Bu organizmaların sentetik besiyerinde üretilen sallamalı kültürlerinde 24 saat süreyle metal biyosorpsiyonu izlenmiştir. Birçok metalin biyosorpsiyonu bakımından S. cerevisiae'nin K. marxianus'a göre çok daha az etkin olduğu saptanmıştır. K. marxianus tarafından en hızlı ve en fazla biriktirilen metal gümüşdür; bu metalin % 90'ı ilk 6 saat içinde hücreler tarafından bağlanmıştır. Bu organizmada bakır ve kadmiyum biyosorpsiyonu da oldukça yüksek olup 14 saatlik bir süre içerisinde sırasıyla % 60 ve % 65'lik etkinliklerle gerçekleşmiştir. Kobalt, çinko ve mangan akümüasyonu her iki organizmada da oldukça düşük seviyelerdedir; [bu da bu metallerin yüksek konsantrasyonlarına olan dirençliliğin, metallerin içeri alınmalarının sınırlandırılması ve/veya membranın geçirgen olmaması yoluyla sağlandığını düşündürmüştür.

Çözünür sitoplazmanın ve hücre kalıntılarının metal içeriklerinin analizi, metallerin sadece çok küçük miktarlarının çözünür sitoplazma içinde olduğunu, hücreler tarafından yüksek seviyede biriktirilen metallerin hücre duvarına ve vakuollere bağlandığını göstermiştir.

K. marxianus'un altın iyonlarının solusyonlardan geri kazanımında etkin bir şekilde kullanılabileceği de yine bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Metal dirençliliği, metallotiyonin, metal biyosorpsiyonu,

S. cerevisiae, K. marxianus.

ABSTRACT

Kluyveromyces spp were found to be much more resistant to toxic heavy metals than a Cup 1^R strain of Saccharomyces cerevisiae. The effect of increasing metal concentrations on growth rate and maximum dry weight of these organisms were determined to obtain precise patterns of resistance.

Analysis of the protein profiles of S. cerevisiae and K. marxianus upon metal exposure suggested constitutive production of metallothionein in K. marxianus while this protein was induced by copper and silver in S. cerevisiae. Furthermore, the synthesis of a smaller protein occurred in K. marxianus upon induction by silver or cadmium.

The extent of metal biosorption by these organisms was monitored during 24 h growth in shaking batch culture in synthetic medium. S. cerevisiae was markedly less effective than K. marxianus in biosorption of many metals. Silver was accumulated most rapidly and extensively by K. marxianus. As much as 90 % of this metal was found to be associated with cellular fraction within first 6 h. The levels of copper and cadmium biosorption were also high in this organism and occurred within 14 h with 60 % and 65 % efficiencies, respectively. Cobalt, zinc and manganese accumulations were rather poor with both organisms, suggesting that restricted uptake and/or impermeability are the mechanisms for tolerance to high concentration of these metals.

The analysis of metal contents of cell debris and soluble cytoplasm revealed that only a very small amount of metals was associated with cytosol, thus binding to the wall and vacuoles accounts for high levels of metal accumulation by the cells.

The present study also showed that K. marxianus can be effectively used in the recovery of gold as a noble metal.

Key Words: Metal resistance, metallothionein, metal biosorption,
S. cerevisiae, K. marxianus.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	v
TABLULARIN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GELİŞME	14
II.1. Materyal ve Metod	14
II.1.1. Maya Suşları	14
II.1.2. Kimyasallar	14
II.1.3. Kültür Ortamları	14
II.1.4. Maya Suşlarının Muhafaza Edilmesi	14
II.1.5. Plak Testleri ile Metal Dirençliliğinin Analizi	15
II.1.6. Kesikli Üretim Kinetiklerinin Belirlenmesi	15
II.1.7. Yüksek Metal Konsantrasyonlarına Dirençli Klonların Seçimi	16
II.1.8. Metallerle İndüksiyon ve Protein Profillerinin Analizi	16
II.1.9. Protein Miktarı Tayini	17
II.1.10. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Proteinlerin " Boyanması	17
II.1.11. Metal Biyosorpsiyonunun Ölçülmesi	21
II.1.12. Yüzey Bağlanma ve Hücre İçindeki Metal Değerlerinin Belirlenmesi	22
II.1.12.1. EDTA Uygulaması	24
II.1.12.2. Sıcak Tampon Uygulaması ve Ultrasantrifüj	24

II.1.13. Hücrelerin İmmobilizasyonu	25
II.1.14. Altın Tayini	25
II.2. Bulgular	26
II.2.1. <u>K. marxianus</u> , <u>K. fragilis</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'da Ağır Metal Dirençliliği Kalıpları	26
II.2.2. Yüksek Metal Konsantrasyonlarında Kesikli Üreme Kinetikleri	28
II.2.3. Metal Konsantrasyonun Kademeli Olarak Arttırılması Yoluyla Dirençli Klonların Seçimi	33
II.2.4. Ağır Metallerle İndüklenen Hücrelerde Protein Profilleri.40	
II.2.4.1. Bakırla İndüksiyon	40
II.2.4.2. Gümüş ve Kadmiyumla İndüksiyon.....	40
II.2.5. Hücrelerde Ağır Metal Biriktirilmesi	45
II.2.5.1. Bakır Biriktirilmesi	45
II.2.5.2. Gümüş Biriktirilmesi	49
II.2.5.3. Kadmiyum Biriktirilmesi	49
II.2.5.4. Kobalt, Çinko ve Mangane Biriktirilmesi	49
II.2.6. Metallerin Yüzeğe Bağlanma ve Hücre İçine Alınma Seviyeleri	55
II.2.6.1. Hücrelerin EDTA ile Muamelesi	55
II.2.6.2. Sitozol ve Döküntü (Debris) Kısımlarının Metal içeriği. .	55
II.2.7. <u>K. marxianus</u> 'un Serbest ve İmmobilize Hücreleri ile Altın'ın Solusyondan Geri Kazanımı	56
BÖLÜM III. SONUÇ	63
III.1 Tartışma	63
III.2. Öneriler	71
KAYNAKLAR	72
EK-1 Besi Ortamlarının kompozisyonu	
BİBLİYOGRAFİK BİLGİ	

TABLULARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I.1. Ağır Metal ve Radyonüklidlerin Mikroorganizmalarca Biriktirilmesine Bazı Örnekler	2
Tablo II.1. Modifiye Edilmiş Gümüş Boyama Yöntemi	19
Tablo II.2. Blum ve ark. (1987)'nin Tarif Ettiği Gümüş Boyama Yöntemi	20
Tablo II.3. <u>K. marxianus</u> , <u>K. fragilis</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'nin Çeşitli Metallerle Toleransları	32
Tablo II.4. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'da EDTA ile Desorpsiyon Yapılarak Belirlenen Yüzeysel Metal Bağlanma Değerleri ...	58
Tablo II.5. Bakırın <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> Hücrelerinde Sitozol ve Debris'deki Dağılımı	59
Tablo II.6. Gümüşün <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> Hücrelerinde Sitosol ve Debris'deki Dağılımı	60
Tablo II.7. Kadmiyumun <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> Hücrelerinde Sitozol ve Debris'deki Dağılımı	61
Tablo II.8. <u>K. marxianus</u> 'un Serbest ve Immobilize Hücreleri ile Altının Solusyonlardan Geri Kazanımı	62

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Şekil I.1. Mikrobiyal Biyokütle ile Solusyanlardan Metal Arıtımı/ Geri Kazanımının Ana Hatları	4
Şekil I.2. Değişik Organizmalardan İzole Edilen MT'ler Arasında bir Karşılaştırma	9
Şekil II.1. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'da Absorbansa Karşı Hücre Kuru Ağırlığı Kalibrasyon Eğrisi	18
Şekil II.2. Bakır Tayinlerinde Absorbans Değerlerinin Konsantrasyona Dönüşümünde Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	23
Şekil II.3. Ağır Metal Dirençliliğinin Plak Testleri ile Yarı Kantitatif Ölçümü	27
Şekil II.4. Cu, Ag, Cd, Co, Zn ve Mn'in Yükselen Konsantrasyonlarında <u>K. marxianus</u> Üreme Eğrileri	30
Şekil II.5. Cu, Ag, Cd, Co, Zn ve Mn'in Yükselen Konsantrasyonlarında <u>S. cerevisiae</u> Üreme Eğrileri	31
Şekil II.6. <u>S. cerevisiae</u> ve <u>K. marxianus</u> 'un Yükselen Cu Konsantrasyon- larında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri.	34
Şekil II.7. Ag Konsantrasyonlarında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri	35
Şekil II.8. Co Konsantrasyonlarında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri	36
Şekil II.9. Cd Konsantrasyonlarında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri	37
Şekil II.10. Zn Konsantrasyonlarında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri	38
Şekil II.11. Mn Konsantrasyonlarında Üreme Hızları ve Maksimum Biyokütle Değerleri	39

Şekil II.12. Metallerin Daha Yüksek konsantrasyonlarına Dirençli Klonların Seçimi	41
Şekil II. 13. <u>S. cerevisiae</u> ve <u>K. marxianus</u> 'un Bakırla İndüklenmiş ve İndüklenmemiş Hücrelerinden Ekstrakte Edilen Proteinlerin SDS İçermeyen Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
Şekil II.14. <u>S. cerevisiae</u> 'da Bakıra Maruz Bırakılma Süresinin MT'in indüksiyonu Üzerine Etkisi	43
Şekil II.15. <u>K. marxianus</u> 'da Bakır (0.25 mM), Gümüş (0.1 mM) ve Kadmiyumla (0.1 mM) İndüksiyon Sonrası Ekstrate Edilen Proteinlerin SDS içermeyen Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Analizi	44
Şekil II.16. <u>S. cerevisiae</u> ve <u>K. marxianus</u> 'da Bakır, Gümüş ve Kadmiyumla İndüksiyon Sonrası Ekstrakte Edilen Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Analizi	46
Şekil II.17. <u>S. cerevisiae</u> Metaflotiyoninin Bakır, Gümüş ve Kadmiyum Tarafından İndüklenmesi	47
Şekil II.18. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'nin 0.5 mM CuSO ₄ Varlığında Üreme ve Cu Biriktirme Profilleri	48
Şekil II.19. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'da Ag Varlığında Üreme ve Ag Biriktirme Profilleri	50
Şekil II.20. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'da Cd Varlığında Üreme ve Cd Biriktirme Profilleri	51
Şekil II.21. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'nin 0.5 mM CoCl ₂ Varlığında Üreme ve Co Biriktirme Profilleri	52
Şekil II.22. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'nin 2.5 mM ZnSO ₄ Varlığında Üreme ve Zn Biriktirme Profilleri	53
Şekil II.23. <u>K. marxianus</u> ve <u>S. cerevisiae</u> 'nin 2.5 mM MnSO ₄ Varlığında Üreme ve Mn Biriktirme Profilleri	54

BÖLÜM I.

GİRİŞ

Maden endüstrisi ve metal kaplama tesislerinin sıvı atıklarının içerdiği ağır metaller, kabul edilir seviyelerin çok üzerindedir. Toksik etkileri nedeniyle bu tip atıklardan uzaklaştırılmaları gerekli olan bu metallerin arıtılmasında en yaygın olarak kullanılan yöntemler kimyasal çöktürme, iyon değişimi ve elektrokimyasal arıtımı içermektedir. Geçtiğimiz yıllarda, mikroorganizmaların atık sularındaki metallerin arıtımı ve aynı zamanda maden ve metalurjik atıklardan metallerin geri kazanılması hususundaki potansiyelleri hem temel, hem de uygulamalı bilimlerin büyük ilgisini çekmiştir. (Macaskie ve Dean, 1989; Gadd, 1990). Metallerin biyolojik moleküllerle etkileşiminin anlaşılması temel bilimler açısından bu veriler daima önemli olmuştur; bu veriler ışığında mikropları temel alan teknolojiler kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre daima daha ucuz, daha basit ve çevrenin korunması yönünde daha sağlıklıdır.

Birçok mikroorganizma; bakteriler, algler, funguslar ve mayalar metalleri ve radyoaktif atomları değişik kapasitelerle bağlamaktadır. Bu konuda yapılmış çalışmalar Gadd (1990) tarafından gözden geçirilmiştir. (Tablo I. 1). Cu (II) arıtımında mayalar özellikle etkindir (Huang ve ark., 1988). Aurobasidium pullulans (Mowli ve ark. 1983), Saccharomyces cerevisiae (Murayama ve ark., 1989, 1990; Huang ve ark, 1989), Aspergillus oryzae (Huang ve ark, 1989), Citrobacter türleri (Macaskie ve ark, 1987), Pseudomonas putida (Higham ve ark, 1984) ve Pleurotus ostreatus (Favero ve ark, 1991)'in Cd bağlanmasında, birçok maya ve fungusun ise Zn bağlanmasında çok etkin olduğu rapor edilmiştir (Paton ve ark, 1972, Mowli ve ark, 1983, white ve ark, 1986). Algal ve fungal biyokütle, uranyum ve altın

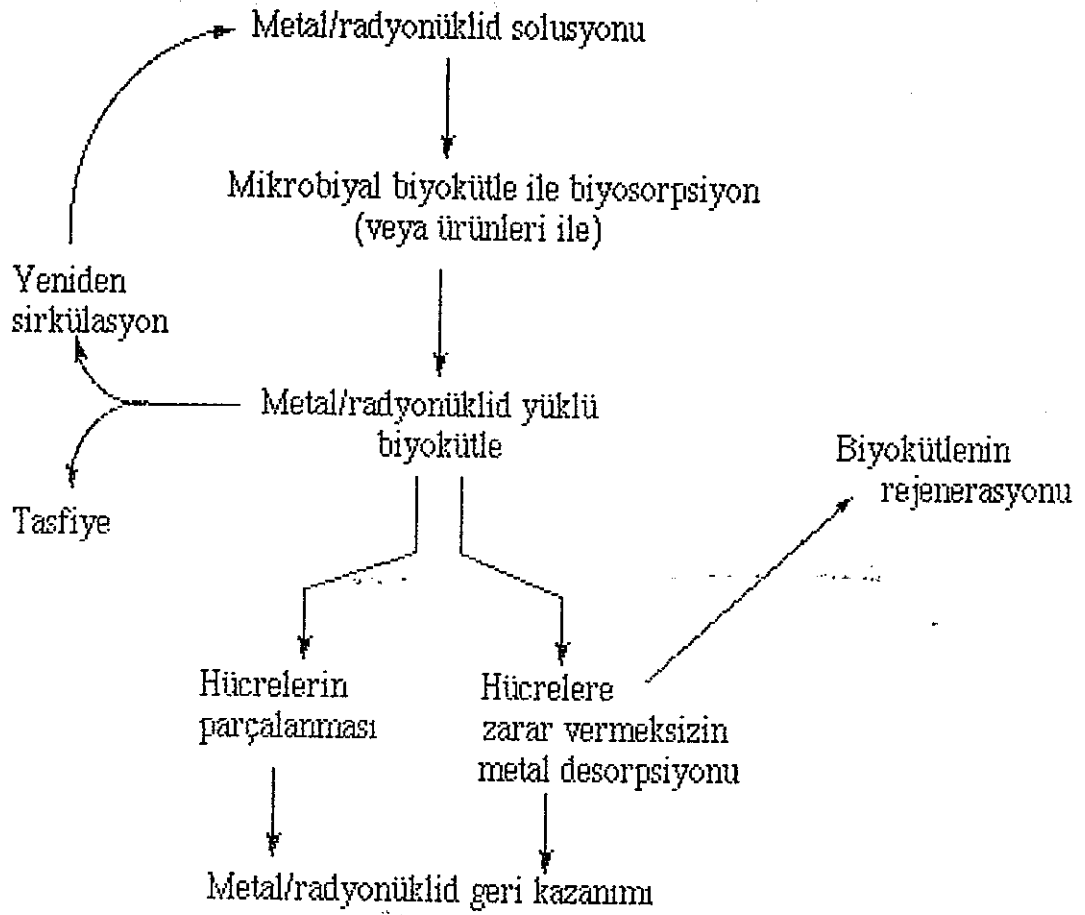
birikimi için çok uygun absorbantlar olarak kabul edilmektedir. (Galun ve ark., 1983; Greene ve ark., 1986; Darnall ve ark., 1986).

Tablo I. 1. Ağır metal ve radyonüklidlerin mikroorganizmalarca biriktirilmesine bazı örnekler (Gadd, 1990)

Organizma	Element	Bağlanma (kuru ağırlığın %'si)
<u>Streptomyces sp</u>	Uranium	2-14
<u>Citrobacter sp.</u>	Lead	34
	Cadmium	13.5
<u>Thiobacillus ferroxidans</u>	Silver	25
<u>Bacillus cereus</u>	Cadmium	3.9-8.9
<u>Escherichia coli</u>	Cadmium	0.16-0.98
<u>Zoogloca sp.</u>	Cobalt	25
	Copper	34
	Nickel	13
<u>Chlorella vulgaris</u>	Gold	10
<u>Chlorella regularis</u>	Uranium	15
<u>Chlorella regularis</u>	Uranium	0.39
	Manganese	≤0.8
<u>Scenedesmus obliquus</u>	Cadmium	0.3
<u>Phoma sp.</u>	Silver	2
<u>Rhizopus arrhizus</u>	Copper	1.6
	Cadmium	3.0
	Uranium	19.5
	Lead	10.4
	Thorium	9.7
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Cadmium	0.24-3.12
	Zinc	0.45
	Uranium	10-15
	Thorium	11-6

Metallerin dış ortamdan mikroorganizmalarca bağlanması fizyokimyasal mekanizmalarla (adsorpsiyon) ve/veya metabolik aktivite (transport) ile sağlanmaktadır. (Shumate ve Strandberg, 1985); Brierley ve ark. 1985; Gadd, 1988) Bazı fizyokimyasal etkileşimler dolaylı olarak metabolizmaya bağlı olabilir-ki, bazı hücre komponentlerinin veya metabolitlerin etkin bir biçimde metal bağlaması buna bir örnektir. (Kelly ve ark, 1979). Dolayısıyla hem canlı, hem de ölü biyokütlenin metal biriktirme potansiyeline sahip olduğu açıktır.

Uygulama yalnızca metallerin uzaklaştırılması amacını güttüğünde, metal yüklü biyokütlenin tasfiyesi yoluna da gidilebilmekte, ancak değerli metallerin geri kazanımı söz konusu olduğunda hücrelere zarar vermeden metallerin deşorbe edilmesi ve biyokütlenin yeniden kullanılması tercih edilmektedir (Brierley ve ark., 1986; Hutchins ve ark., 1986) (Şekil I. 1).



Şekil I. 1. Mikrobiyal biyokütle ile solusyonlardan metal arıtımı/geri kazanımının ana hatları (Gadd, 1990).

Birçok metalin düşük konsantrasyonları mikrobiyal üreme için esasyeldir. Örneğin Cu, Zn, Mn ve Co, oksidasyon, elektron transferi ve diğer birçok enzimatik reaksiyona katılmak gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Diğer yandan Au, Ag, Cd, Pb ve Sn gibi metaller ve U, Tn gibi radyonüklidlerin hiçbir biyolojik fonksiyonu yoktur ama büyük toksisiteye sahiptirler. Dolayısı ile proses için canlı veya ölü biyokütlenin seçimi oldukça önemlidir. Ölü biyokütle ile veya ürünleri ile toksisite problemi yoktur, ayrıca bu tip bir adsorbant için sıcaklık ve besin gerekmemektedir. Diğer yandan canlı hücrelerin çeşitli metal biriktirimi mekanizmalarına sahip olmaları, morfolojik, fizyolojik ve genetik manipulasyonlara izin vermeleri gibi avantajları vardır.

(Gadd, 1988). Ağır metallerin metabolizmadan bağımsız olarak hücre duvarına bağlanmaları hem canlı, hem de ölü biyokütle için geçerli olup oldukça hızlı bir prosestir. Metabolizmaya bağlı hücre içine alınımları ise sadece canlı hücreler tarafından gerçekleştirilen ve toksik semptomlar gösterebilen bir prosestir. Birçok metal için (Pb, U, Th gibi) biriktirilme olayı sadece hücre yüzeyinde olmaktadır.

Gram-pozitif bakterilerde metaller teikoik ve teikuronik asitler ve özellikle peptidoglikanın -glutamik asitinin -karboksil- gruplarına bağlanmaktadır. Gram-negatif bakterilerde ise dış membranın polar grupları başlıca metal bağlayan bölgedir. Genelde bakterilerde bağlanan metallerin çok önemli bir bölümü yüzeyde bulunmaktadır. (Beveridge ve Fyfe, 1985). Alglerde de hücre duvarlarında bulunan protein ve polisakkaritlere iyonik veya kovalent bağlanma önemli bir rol oynamaktadır.

Hücre immobilizasyonu tekniklerinin gelişmesi, metal biyosorpsiyonu çalışmalarının ilerlemesine katkıda bulunmuştur. Costa ve ark. (1991) sodyum aljinat matrisine immobilize edilmiş Chlorella homosphaera hücreleri ile Cd, Zn ve Au biriktirilmesi üzerine çalışmışlardır. Bu yolla Cd ve Zn'in %100 oranında, altının ise % 90 oranında geri kazanıldığını rapor etmişlerdir. Poliakrilamid jelle immobilize Streptomyces ile U, Cu ve Co biriktirilmesi (Nakajima ve Sakaguchi, 1986), immobilize Citrobacter ile birçok metallerin etkin biçimde bağlanması, (Macaskie ve ark., 1987b), poliakrilamidde tutuklanmış Chlorella ile U, Au, Cu, Hg ve Zn uzaklaştırılması (Greene ve ark., 1986), ilgili reaktör (Hutchins ve ark., 1986) ve biyofilm çalışmaları (Macaskie ve Dean, 1987; Schumate ve Stranberg, 1985)) bu konuda yapılmış çalışmalar arasındadır.

Immobilize hücrelerle metal depolama türünden bir yaklaşımda biyoreaktörde kalış süresi, metallerin desorpsiyonu ve biyokütle rejenerasyonu, dinlenen ve üreyen biyokütle, biyofilm üretimi, ısıya dayanıklılık vb. konular Macaskie ve Dean (1989) tarafından çok geniş biçimde dökümente edilmiştir. Immobilize sistemlerde hem canlı, hem de ölü biyokütle kullanılabilen olup bunların avantaj ve dezavantajları aynı yazarlar tarafından tartışılmıştır.

Maya ve fungusların ağır metal biriktirmede diğer mikroorganizmalara göre daha etkin oldukları düşünülmektedir; i) metallerin yüksek konsantrasyonlarına tolerans gösterirler, ii) metalleri hücre duvarına bağlama kapasiteleri yüksektir, iii) hücre içine metal alınımında daha etkindirler, iv) düşük pH vb. gibi olumsuz dış ortam koşullarına daha toleranslıdırlar. Bu organizmalarda metal alınımının iki fazda gerçekleştiği kabul edilmektedir: i) metallerin hücre duvarında negatif yüklü bölgelere hızlı bir biçimde bağlanması, ii) bunu takiben bir kısım metalin yavaş ve enerji gerektiren bir prosesle hücre içine alınımı (Gadd, 1986; Huang ve ark., 1990, Bhatnager, 1990; ve ark., 1988; Klin ve ark., 1990). Hücre içine metal transportu hücre membranındaki elektrokimyasal proton gradiyentine dayanmakta olup hem esasiyel, hem de esasiyel olmayan elementler hücre içine alınabilir. Bazı mikroorganizmalarda hücre içine alınan metal miktarı hücre duvarına bağlanan miktardan fazla olabilmekte, diğer birçok mikroorganizmada ise (örneğin filamentöz funguslar) duvara bağlanan miktar toplam bağlanmanın çok önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Metal dirençliliği genellikle içeri alınımın sınırlandırılması ve/veya hücre membranının metallere geçirgen olmaması ile sağlanmakta, ancak metali hücre içinde etkin bir biçimde bağlayabilen mikroorganizmalar da bir diğer dirençli grubu oluşturmaktadırlar (Bianchi ve ark., 1981). Hücre içine alınan metaller ya kompartmentalize edilerek izole

edilmekte, ya da çeşitli moleküllere bağlanarak veya çökerek daha zararsız formlara dönüştürülmektedir. Örneğin Pseudomonas aeruginosa'da uranyumun yoğun hücre içi depozitlerine rastlanmıştır (Strandberg ve ark., 1981). Ökaryotik mikroorganizmalarda hücre içine alınmış metallerin büyük bir bölümünün (Ni, Zn, Cd, Pb, Cr, Al ve Co gibi metallerle çalışılmıştır) polifosfat granüllerine bağlandığı, bu granüllerin ise daha sonra vakuollerde yerleştiği gösterilmiştir. (Kunst ve Romans, 1985; Godd ve White, 1989). Bir diğer yaygın mekanizma ise hem prokaryotik, hem ökaryotik mikroorganizmalarda hücre içi metal bağlama proteinlerinin sentezlenmesi ve metallerin bu proteinlere bağlanmasıdır.

Metallotiyoninler (MT); düşük molekül ağırlıklı, olağanüstü yüksek sistein içeriğine sahip ve ağır metallere bağlanabilen proteinler grubudur. (Karin, 1985; Hammer, 1986). Bu proteinler omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde funguslarda ve mayalarda gösterilmiştir. Fizyolojik ve fizikokimyasal özellikleri bakımından ökaryotik MT'e benzeyen bir prokaryotik MT ise mavi-yeşil bakterilerde bulunmuştur. (Olafson ve ark., 1979; Robinson ve ark., 1990).

Memelilerde bulunan MT, 61-62 amino asit içermekte olup bunların 20'si sisteindir. Aromatik amino asitlerin ve histidinin hiç yer almaması ile karakterize edilirler. Memeli MT'i 7 Zn (II) veya 7 Cd (II) veya 12 Cu (I)'i bağlarken maya (S. cerevisiae) MT'i 4 Zn (I) veya 8 Cu (I) bağlamaktadır. Her iki tip MT'in de kristal yapıları nükleer manyetik rezonans çalışmaları ile aydınlatılmış ve konformasyon farklılıkları belirlenmiştir (Baulanger ve ark., 1983; Furey ve ark., 1986; Nielsan ve ark., 1985, Hunaiker ve Kagi, 1985).

S. cerevisiae MT'i ilk kez 1975 yılında bulunmuştur (Premakumar ve ark., 1975; Prinz ve Weser, 1975) ve "bakır-tiyonin" şeklinde isimlendirilmiştir.

Safılaştırılmış protein amino asit analizine tabi tutulduğunda, MT geninin DNA dizisi analizleri sonucuna göre beklenen ilk 9 amino asitin proteinde yer almadığı görülmüştür. Bu da, proteinin translasyon sonrası proses edildiğini göstermiştir ki, bu durum memeli MT'i için söz konusu değildir. Hidrofabik amino asitlerden oluşan 9 amino asitlik nc peptidin görevi bilinmemektedir. Nihai maya MT'i ise 53 amino asitten oluşmuş olup molekül ağırlığı 5,655'dir (Hartman and Weser, 1985; Weser ve ark., 1986; Winge ve ark., 1986). İzole edilmiş proteinin 1 mol'nde 12 sistein olduğu ve bunlara 8 mol Cu (I) bağlandığı, bakırın proteinde, tiyolat grupları olarak yer aldığı gösterilmiştir. Maya MT'i bakırın yanısıra Ag(I), Cd (II), Zn(II) ve Co(II)'ye de bağlanabilmektedir. (Ecker ve ark., 1986); maksimum stokiometri ise 1 mol protein için bu metallerin 4 iyonunu öngörmektedir.

Kompüter programları ile maya MT ile memeli MT arasındaki benzerlikler araştırıldığında, amino asit dizilimindeki tek homolojinin merkezde yer alan Lys-Lys-Ser-Cys-Cys-Ser dizisi olduğu saptanmıştır (Butt ve Ecker, 1987). Maya ve memeli MT'de korunan bu dizinin deniz kestanesi, yengeç, Drosophila ve Neurospora MT'lerinde yer almadığı da not edilmiştir (şekil I. 2). Neurospora crassa MT'i 7'si sistein olmak üzere sadece 26 amino asit içermekte ve 6 bakır atomuna bağlanmaktadır (Lerch, 1980) Agaricus bisporus Cu-MT'i ise 25 amino asitlik olup sistein içeriği % 28'dir Bu protein N. crassa MT ile % 80, memeli MT ile ise % 40 homoloji göstermektedir (Mnger ve Lerch, 1985).

Metallotiyonin'in hücrede spesifik metallerin metalloenzimlere transfer edilmesi gibi kompleks fonksiyonları olduğu kabul edilirse, bunun için özel bir tersiyer yapı gereklidir. böyle bir yapının sistein rezidülerinin aranjanı ile sağlandığı ileri sürülmektedir (Nemer ve ark., 1985). MT ailesine bağlı

proteinlerin evrimindeki anahtar noktanın, pek fazla değişiklik göstermeyen merkezi segment olduğu kabul edilmektedir.

MT'ler, ağır metallerin depolanması, metal transportu ve metalloenzimlerin aktivasyonu gibi fonksiyonlara sahip olsalar dahi, en azından memeli canlılarda bu proteinlerin birincil fonksiyonununun ağır metallere karşı hücrenin korunması olduğu görüşü benimsenmemektedir (Karin, 1985).

Yeast	mfsef infqneghCqCqCgsCknneqCqk sCsCptgC nsddkCpCgnkseetkksCCsgk			
Neurospora	gdCgCsgss sCnCgsgCsCs nCgsk			
Drosophila	mp CpCgsgCkC asqtkg sCnCgsdCkC ggdkksaCgCse			
Human 1	mdprCsCatgg	sCtCtgsCkC	keCkCnsCkk	sCCsCCpmsCakCaqgCiCkgasekCsCCA
Human 2	-----aagd	--t-ags-k-	-e-k-t----	-----v-ak-s---i--g--d--s---
Equine 1A	-----ptgg	--t-ags-k-	-e-r-t----	-----g-ar-s---v--g--d--s---
Equine 1b	-----vage	--t-ags-k-	-q-r-a----	-----v-ak-a---v--g--d--s---
Sheep	-----ptgg	--s-ags-t-	-a-r-p----	-----v-ak-a---v--g--d--s---
Rabbit 2	-----aagd	--t-ats-k-	-e-k-t----	-----s-ak-a---i--g--d--s---
C. Hamster 1	-----stgs	t-t-sss-g-	-d-k-t----	-----vg-sk-a---v--g--d--t---
C. Hamster 2	-----atdg	--s-ags-k-	-e-k-tt----	-----vg-ak-s---v--e--d--s---
Monkey 1	-----atgv	--t-ads-k-	-e-k-t----	-----vg-ak-a---v--g--d--n---
Monkey 2	-----vagd	--t-ags-k-	-e-k-t----	-----vg-ak-a---i--kg--d--n---
Mouse 1	-----stgg	--t-tss-a-	-n-k-tt----	-----v--sk-a---v--g--d--t---
Mouse 2	mdprCsCasdg	sCsCagaCkC	kqCkCtsCkk	sCCsCCpvsCakCsagCiCkeasdkCsCCA
Sea urchin:	mpdvkCvCCtegkeCaCfqqdCCvtgeCCkdgtCCg iCtnaaCkCang CkCgsgCsCt egnCaC			
	Domain I		Domain II	
Crab 1	pgpCCnçkCvCkegg	CkegCqC	tsCrCs	pCvk CsgCkC ankeeCsktCskaCsCCpt
Crab 2	pdpCCndkCdCkegg	CktgCkC	tsCrCp	pCeq CsgCkC ankedCrktCskpCsCCp

Şekil 1. 2. Değişik kaynaklardan izole edilen MT'ler arasında bir karşılaştırma.

Metinde sözü edilen merkezi segment kutu içerisine alınmıştır. a, ala; C, cys; d, asp acid, e, glu, acid; f, pheala; g, gly; h, his; i, isoleu; k, lys; l, leu; m, met; n, asp; p pro; g, glu; r, arg; s, ser; t, thr; v, val (Butt ve Ecker, 1987).

Zira, bu protein ağır metallerle maruz kalmamış hücrelerde de basal seviyede sentezlenmektedir. Memelilerde MT'in transkripsiyon hızı akut streslerde, bakteri enfeksiyonlarında, glukokortikoid hormonlarla ve ayrıca Interferon ve Interlökin-1 ile artmaktadır. Replikasyon, transkripsiyon, protein sentezi ve degradasyonu, enerji metabolizması Zn'ya gereksinimi olan enzimlerle sağlanmaktadır-ki, böyle apoenzimlerin MT ile aktive edildikleri kabul edilmektedir. Lösemi hastalarında MT sentezinin bozulması ve fare embriyolarının erken gelişim dönemlerinde MT seviyelerinde gözlenen değişimler bu proteinin farklılaşma ve hücre çoğalması gibi önemli proseslerin genel kontrolünde yer aldığına işaret etmektedir. Bunların yanısıra, MT'in memelilerde UV'ye cevap sisteminde ve serbest radikallerin yakalanması sürecinde fonksiyonları olduğu gösterilmiştir (Kagi ve Schaffer, 1988).

Tüm bunlara karşın, MT'in mikroorganizmalarda ağır metal detoksifikasyonu dışında herhangi bir fonksiyonu olabileceğine dair hiçbir delil yoktur. Hamer ve ark (1985), MT genini içermeyen suşlar elde ederek bu proteinin maya hücrelerinde metal zehirlenmesine karşı koruma sağladığını, ancak normal hücresel yaşam siklusu ve gelişimi açısından bu proteinin gerekli olmadığını göstermişlerdir.

S. cerevisiae'da bakır direnci, genetik anlamda, kromozom VIII'de yer alan ve sentromere 42 santimorgan uzaklıkta CUP 1 lokusunun fonksiyonu olarak ifade edilmektedir (Fagel ve Welch, 1982). Bakıra duyarlı hücreler (CUP 1^S), bakır konsantrasyonu 10 µM'in üzerine çıktığında ölürlerken, bakıra dirençli (CUP 1^R) hücreler 1 mM gibi yüksek bir bakır konsantrasyonunda bile üreyebilmektedirler. bakırı yüksek miktarda içeren agar plaklarında üreyebilen hücreler muhtemelen bakırın hücre içinde bulunmasından dolayı

koyu kahverengi koloniler oluşturmakta (Minagania ve ark., 1951) olup bakır konsantrasyonu giderek arttırıldığında daha dirençli klonlar elde etmek mümkündür.

CUP 1^S özellikte bir S. cerevisiae suşunun maya DNA'sı ile transformasyonu yoluyla CUP 1 lokusunun klonlanması ilk kez Fogel ve Welch (1982) tarafından rapor edilmiştir. Bu gen daha sonra diğer araştırma grupları tarafından da klonlanmıştır (Butt ve ark., 1983; Henderson ve ark., 1985; Sugimoto ve ark., 1988; Berka ve ark., 1988; Macreadie ve ark., 1991; Tommey ve ark., 1991). CUP 1 geni 2 Kb büyüklüğünde olup intornlarla kesintiye uğramamaktadır. CUP 1^R suşlar CUP 1 lokusunun çoklu kopyalarını içermekte ve bu kopyalar ardışık biçimde tekrarlanmaktadır. Genelde, S. cerevisiae'da bakır direncinin büyüklüğü CUP 1 geninin kopya sayısı tarafından belirlenmektedir. CUP 1 geninin amplifikasyonunu açıklayan teorik bir model geliştirilmiş bulunmaktadır (Butt ve Ecker, 1987).

CUP 1 geninin Cu ile indüklenen transkripsiyonunun cis etkisi gösteren "upstream" aktivasyon dizileri (UAS) ve trans etkisi gösteren hücresel faktörlerle sağlandığı bilinmektedir (Huibregtse, 1989). Pozitif düzenleyici bir gen olan ACE 1 (= CUP 2) geninin ürünü olan proteine Cu'in bağlanması sonucu bu protein aktive olmakta ve CUP 1 UAS'ye bağlanıp MT sentezini indüklemektedir. ACE 1 proteini MT'e büyük benzerlikler gösteren, sistince zengin bir DNA-bağlanma proteindir. Sadece CUP 1 genini değil, Zn-Süper oksit dismutaz (SOD 1) genini de indüklemektedir (Gralla ve ark., 1991). Bu proteinde bakırın yığıldığı bölgenin proteinin konformasyonunu organize ve stabilize ettiği ve DNA'ya özgün bir bağlanma için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Dameron ve ark., 1991).

ACE 1' e benzer ve metallerle aktive olan bir diğerk transkripsiyon faktör geni de (AMT 1) Candida glabrata'dan izole edilmiştir. AMT 1 proteininde de amino terminalinde bulunan 11 sistein molekülü metal aktivasyonu ile DNA'ya bağlanma kabiliyeti için gereklidir (Zhou ve Thiele, 1991).

Daha sonraki çalışmalarda, ace 1 delesyonu ile elde edilen suşların Cu'a dirençli supressör mutantlarında CUP 1 transkripsiyonunun ısı şoku geni transkripsiyon faktörü ile indüklendiğı bulunmuş ve oldukça ilgi çekmiştir (Yang ve ark., 1991). Ayrıca, CUP 1 ile ilgili bir diğerk gen (ACE 2) izole edilmiş ve CUP 1 mRNA'sının bazal ifadesi için gerekli olduğu öne sürülmüştür (Buttler ve ark., 1990). S. cerevisiae'nin CUP 1 geni Kluyveromyces lactis'de ifade edildiğinde, K. lactis ACE 1 proteininin bakıra gereksinim duymaksızın indüksiyon yaptığıının gözlenmesi de ilginç bir bulgudur (Macreadie ve ark., 1991).

Maya MT sisteminin biyoteknolojik uygulamaları Butt ve Ecker (1987) tarafından tartışılmıştır. Rekombinant DNA teknolojisinde MT geni promotonu, etkin ve regule olabilme özellikleri nedeniyle heterolog gen ekspresyonu için birçok kriteri karşılamaktadır. Bunun yanı sıra CUP 1 lokusu, yabancı genlerin maya kromozomu üzerinde amplifiye edilebilmesi için çok uygundur. Maya MT sisteminin altın, gümüş, uranyum ve platin gibi değerli metallerin solusyonlardan geri kazanılmasında kullanılabileceğı, hücre içine alınmayan metaller için, ise MT'in sekresyonu için uygun sinyal dizilerinin MT genine eklenebileceğı öne sürülmüştür (Zsebo ve ark., 1986). Ayrıca MT sisteminin endüstriyel atıklardan toksik ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanıma olanakları tartışılmıştır.

Diğer maya ve fungus türlerinde metallere düzenlenen sistemlerin analizi üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Molekül ağırlıkları 1800 ile 4000 arasında değişen ve Murasugi (1985) tarafından "kadistin" (cadystin) olarak isimlendirilen proteinler, metal-bağlanma proteinlerinin yeni bir sınıfını oluşturmaktadır. Grill ve ark. (1985) bu proteinlere "fitokelatin" (phytochelatin) adını vermektedir. Örneğin Schizosaccharomyces pombe (fizyon mayası) Cu'a maruz bırakıldığında MT sentezlememekte, fakat Cd varlığında sadece glutamik asit, sistein ve glisin'den oluşan iki ayrı Cd-bağlanma peptidi oluşturmaktadır. (Murasugi ve ark., 1985) Hibridizasyon çalışmaları, S. pombe DNA'sı ile S. cerevisiae MT geni arasında hiç bir hibridizasyon olmadığını göstermiştir. Ağır metallerle muamele edildiğinde tüm bitki türleri (α -Glu-Cys)_n Gly (n= 2 veya 7) genel yapısındaki metal bağlayan peptidleri sentezlemektedirler. Fitokelatin adı verilen bu peptidler primer gen ürünleri olmayıp glutatiyondan itibaren peptidin birer ünite uzatılması yoluyla oluştururlar (Grill ve ark., 1985). S. cerevisiae'de fitokelatin benzeri peptidler mevcut değildir. Bu anlamda S. pombe, bir maya olmasına karşın metal bağlanma proteinleri bakımından daha ziyade bitkilere yakınlık göstermektedir. Fitokelatinlerin biyosentezini sağlayan enzimlerin metallere indüksiyonu veya aktivasyonunu sağlayan mekanizmalar henüz bilinmemektedir.

Çalışmamızda, Kluyveromyces marxianus'da ağır metal dirençlilik kalıplarının ve metal biyosorpsiyonunun analizi, metallere muamele sonrası protein profillerinin belirlenmesi ve metallere hücredeki lokasyonlarının anlaşılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar metallere etkileşimi yönünden en iyi tanımlanmış maya türü olan S. cerevisiae'nin CUP 1^R bir suşu ile elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM II

GELİŞME

II.1.1. MATERYAL VE METOD

II.1.1. Maya Suşları

Kluyveromyces marxianus var marxianus ATCC 8603, Kluyveromyces fragilis, UCD 55-61 ve Saccharomyces cerevisiae UCD 552 bu çalışmada kullanılmış maya suşlarıdır.

II.1.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma veya Merck Chem. Co.4'den temin edilmiştir. Altın solusyonu [potasyum disiyano aurat (I)] ise Almet Metal End. A. Ş. (Ostim, Ankara) tarafından sağlanmıştır.

II.1.3. Kültür Ortamları

Rutin laktöz agar veya broth ve Synthetic Complete (SC) besiyeri (Sherman ve ark. 1982) bu çalışmada kullanılan besi ortamları olup kompozisyonları Ek-1'de verilmiştir.

II.1.4. Maya Suşlarının Muhafaza Edilmesi

Maya suşları rutin lactoz agar üzerinde 30°C'de aylık transferlerle sürdürülmüştür. Kültürler 4°C'de saklanmıştır. Her suşun

ayrıca % 15 gliserol içeren bir laktöz broth kültürü -20°C'de saklanmıştır.

II.1.5. Plak Testleri ile Metal Dirençliliğinin Analizi

Metal dirençliliğinin analizinde 5 mL SC sıvı besiyerinde midlogaritmik faza kadar üretilmiş kültürler kullanılmıştır. Bu kültürlerden birer öze dolusu alınarak metal tuzlarını aşağıdaki konsantrasyon aralıklarında (mM) içeren SC agar plaklarına yayılmıştır: Bakır sülfat, 0.075-4; gümüş nitrat, 0.015-2.5; kadmiyum nitrat, 0.015-2.5; kobalt klorür, 0.1-2.5; çinko sülfat, 0.25-12.5; mangan sülfat, 0.25-15. Her bir metal konsantrasyonu için, sonuçların güvenilir olması açısından üç agar plağı kullanılmıştır. 30°C'de 3 gün inkübe edilen plaklarda üreme yarı kantitatif olarak (-, +, ++, +++) kaydedilmiş ve metallerin minimum inhibe edici konsantrasyonları belirlenmiştir.

II.1.6. Kesikli Üretim Kinetiklerinin Belirlenmesi

Metal tuzlarını değişik konsantrasyonlarda içeren 30 mL'lik SC sıvı besiyerleri hazırlanmış ve mikroorganizmaların 16 saatlik kültürlerinin 1 mL'si ile inokule edilmişlerdir. Kültürler 30°C'de 16 saat süreyle üretilmişler ve bu süre içinde üreme 620 nm deki absorbans olarak (Bausch-Lomb Spectronic 20 spektrofotometre) belirli aralıklarla ölçülmüştür. Metal içermeyen kültürler de kontrol olarak üretilmiştir. Üreme eğrileri elde edilmiş ve spesifik üreme hızları standard formüle göre hesaplanmıştır. (Bailey ve Ollis, 1977). Hücre kuru ağırlıklarının belirlenmesinde; kültür numuneleri filtre edilmiş (0.20 µm, Sartorius SM-11307 kağıt diskleri ile), filtre diskleri yıkanmış, 105°C'de

kurutulmuş ve tartılmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi (absorbansa karşı mg kuru ağırlık) Şekil II.1'de verilmektedir.

II.1.7. Yüksek Metal Konsantrasyonlarına Dirençli Klonların Seçimi

Metallerin maya suşları için minimum inhibe edici konsantrasyonları ile başlanarak, suşlar her seferinde metalleri biraz daha yüksek konsantrasyonda içeren SC agar plaklarına ardışık olarak transfer edilmişler, her transferde bir önceki konsantrasyonda üreyebilmiş dirençli klonlar kullanılmıştır. Transferler sonrası plaklar 30°C'de 3-4 gün boyunca inkübe edilmişlerdir.

II.1.8. Metallerle İndüksiyon ve Protein Profillerinin Analizi

Sıvı SC kültürleri, optik densiteleri 1.0'e ulaşıncaya dek 30°C'de sallamalı olarak üretilmişler, daha sonra metaller uygun konsantrasyonlarda ilave edilmiş (CuSO₄, 0.25mM; CoCl₂, AgNO₃ ve Cd(NO₃)₂, 0.1 mM) ve hücreler metal varlığında 2 saat daha inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek toplanmışlardır. Hücreler yıkanmış ve 1 mL inhibitör solusyonu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 içerisinde (1mM PMSF, 1 mM TPCK, 1 mM TLCK, 0.5 mM EDTA ve 10 mM merkaptoetanol) içinde suspende edilmişlerdir (Butt ve ark, 1984). 13000 rpm'de 5 dak. süreyle mikrofüj sonrası çökeltiler 0.3 mL inhibitör solusyonunda yeniden suspende edilmişler ve 1 mm'lik cam boncuklarla vorteks edilerek parçalanmışlardır. 1 dak. lık vorteksleme işlemi buz içinde 15 sn.'lik fasılalarla ve 3 kez tekrarlanmıştır. 13000 rpm'de 5 dak santrifüj sonrası dökelti kısmı toplanmış, numunelerin

protein konsantrasyonları eşitlenmiş ve poliakrilamid jeline uygulanmışlardır.

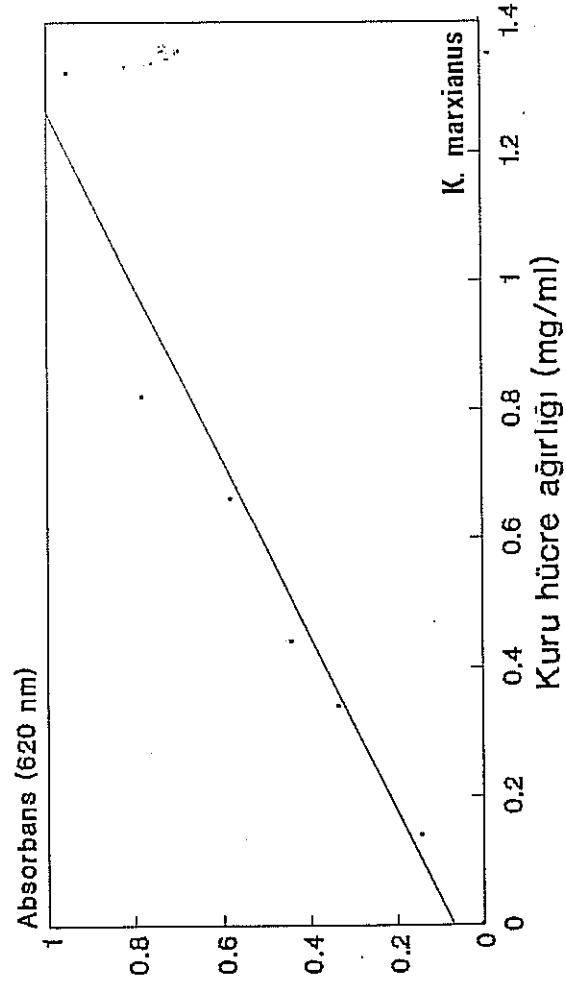
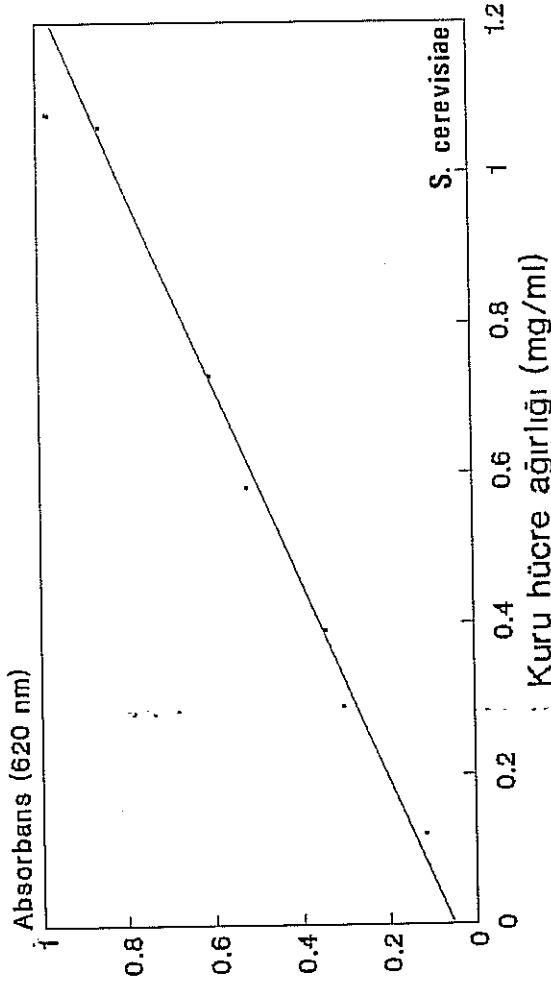
II.1.9. Protein Miktarı Tayini

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Whitaker ve Granum (1980)'un tarif ettiği yöntem, kullanılmıştır. Bu yöntem, 235 nm'de ve 280 nm'deki absorbans değerleri arasındaki farka dayanmaktadır:

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/mL)} = \frac{A_{235} - A_{280}}{2.51}$$

II.1.10 Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Proteinlerin Boyanması

Proteinler %18'lik ve SDS içermeyen (denatüre etmeyen) poliakrilamid jelleri üzerinde ve vertikal bir aparatusda elektrofrez edilerek ayrılmışlardır. Elektrofrez 15 mA'da 15 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Bazı deneylerde ise SDS-jel elektrofrez yapılmıştır. Elektrofrez sonrası jeller Yasmin (1989) tarafından tarif edilen modifiye bir gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır. (Tablo II. 1).



Şekil II.1.1. *K. marxianus* ve *S. cerevisiae*'da absorbansa karşı hücre kuru ağırlığı kalibrasyon eğrisi.

Tablo II. 1. Modifiye edilmiş gümüş boyama yöntemi (Yasmin, 1989)

<u>Step</u>	<u>Solusyon</u>	<u>İşlem süresi</u>
1. Fiksasyon	% 50 MeOH; % 12 AcOH	1 saat
2. Yıkama	% 10 MeOH; % 5 AcOH	2 x 10 dak
3. Ön işlem	0.034 M $K_2Cr_2O_7$; 0.032 N HNO_3	5 dak
4. Yıkama	H_2O	4 x 30 saniye
5. Boyama	0.04 M $AgNO_3$	30 dak
6. Yıkama	H_2O	2 x 30 saniye
7. Renk oluşumu	0.8 M Na_2CO_3 ; 5 ml % 37 $HCOH/L$	5 dak.
8. Durdurma	% 1 AcOH	5 dak.
9. Yıkama	% 30 MeOH	> 30 dak.

Bazı deneylerde ise Blum ve ark (1987) tarafından tarif edilen gümüş boyama yöntemi kullanılmıştır (Tablo II. 2)

Tablo II. 2. Blum ve ark. (1987)'nin tarif ettiği gümüş boyama yöntemi

<u>Step</u>	<u>Solusyon</u>	<u>İşlem süresi</u>
1. Fiksasyon	% 50 MeOH; % 12 AcOH; 0.5 mL % 37 HCOH/L	≥ 1 saat
2. Yıkama	% 50 EtOH	3 x 20 dak
3. Ön işlem	Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O (0.2 g/L)	1 dak
4. Yıkama	H ₂ O	3 x 20 saniye
5. Boyama	AgNO ₃ (2g/l); 0.75 ml % 37 HCOH/l	20 dak
6. Yıkama	H ₂ O	2 x 20
7. Renk oluşumu	Na ₂ CO ₃ (60g/L); 0.5 mL % 37 HCOH/L; Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O (4mg/l)	10 dak
8. Yıkama	H ₂ O	2 x 2
9. Durdurma	% 50 MeOH; % 12 ACOH	10 dak
10 Yıkama	% 50 MeOH	≥ 20 dak.

Bovine albumin (66000), Ovalbumin (45000), β -Lactoglobulin (36800), Pepsin (34700), Trypsinogen (24000) and Lysozyme (14300) standard molekül ağırlığı marker'ları olarak kullanılmıştır.

II. 1. 11. Metal Biyosorpsiyonunun Ölçülmesi

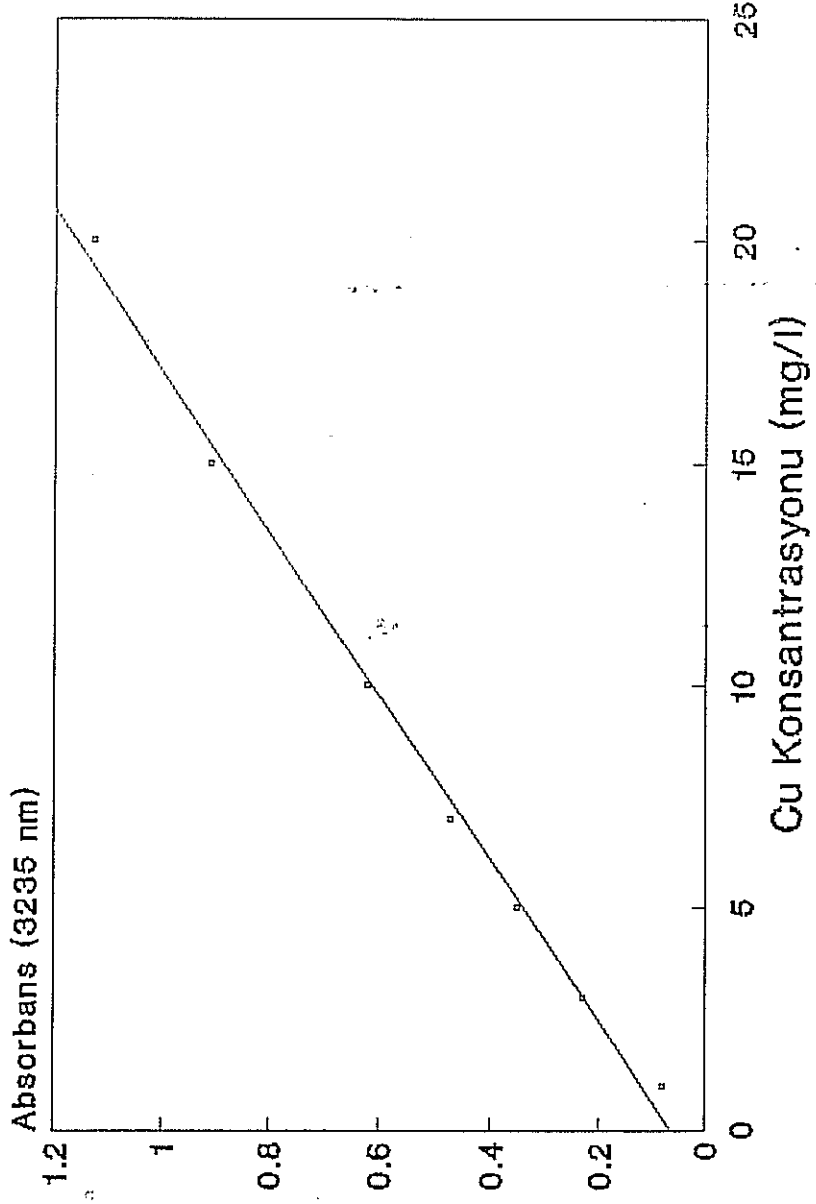
Sıvı kültürler metal ilave edilmiş 50 mL'lik SC ortamlarını içeren 250 mL Erlenmayerlerde 24 saat süreyle, 30°C'de ve karıştırılmalı olarak üretilmiş, bu süre içinde belirli aralıklarla 4'er mL'lik numuneler alınarak metal içeriğine bakılmıştır. Başlangıç metal konsantrasyonları metin içinde belirtilmiştir.

Alınan numuneler santrifüj edilerek hücreler ve kültür sıvısı birbirinden ayrılmış, her iki faz ayrı porselen krozeler içine alınarak 80°C'de bir gece boyunca kurutulmuşlardır. Materyalden metal ölçümleri öncesi organik maddenin yakılarak uzaklaştırılması için materyal 1 saat süreyle 700°C'ye maruz tutulmuş ve daha sonra % 40 hidrojen florid (0.4 mL) içeren % 70'lik nitrik asit (1 mL) solusyonu içerisinde çözülmüştür. Numunenin toplam hacmi distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Hücrelerdeki ve hücre dışı sıvıdaki metal konsantrasyonu daha sonra atomik absorpsiyon spektrofotometre (Nippon Jarrel Ash Model AA-850) ile ölçülmüştür. Metallere özgül lambaların ölçüm limitleri içerisindeki metal konsantrasyonlarını içeren standart solusyonlar kullanılmak suretiyle kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Bakır tayininde kullanılmış olan kalibrasyon eğrisi, bir örnek teşkil etmek üzere Şekil II. 2'de verilmektedir. O. zamanda, yani inokulasyonun asyonun yapıldığı anda alınan örneklerin metal içerikleri

ile daha sonraki örneklerin metal içerikleri arasındaki fark esas alınarak "% metal bağlanma" değerleri hesaplanmıştır.

II.1.12. Yüzey Bağlanma ve Hücre İçindeki Metal Değerlerinin Belirlenmesi

Hücelere bağlanan metallerin hücredeki lokasyonları hakkında bilgi edinilebilmesi amacıyla iki farklı yöntem izlenmiştir: i) Hücre yüzeyindeki metalleri uzaklaştırmak amacıyla metal tutucu bir ajan olan EDTA ile hücreler muamele edilmiş, daha sonra solusyonu geçen metallerin konsantrasyonu ölçülmüştür, ii) Hücreler parçalanmış ve lizatlar ultrasantrifüj edilerek sitozol ve debris fraksiyonları ayrı ayrı elde edilerek metal konsantrasyonları ölçülmüştür.



Şekil II.2. Bakır tayinlerinde absorbans değerlerinin konsantrasyona dönüştürülmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

II.1.12.1. EDTA Uygulaması

Maya suşları metal içeren besiyerlerinde 30°C'de, karıştırmalı olarak 16 saat süreyle üretilmişler ve bu periyot içinde kültürlerden 3 saatlik fasilalarla 4'er mL örnekler alınmıştır. Her örnek 5000 rpm'de 20 dak santrifüj edilerek hücreler ayrılmıştır. Dökelti 80°C'de kurutulularak metal analizine hazırlanmış, çökelti (hücreler) ise 3 mL 10 mM EDTA (μM 3.0) ile suspende edilerek 30°C'de 30 dak. süreyle 50 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra 5000 rpm'de (20 dak) santrifüj edilmiş, dökelti ve çökelti kısımları ayrı ayrı alınarak kurutulmuş ve metal analizleri yapılmıştır. Kültür sıvısından, hücrelere uygulanan EDTA solusyonundan ve EDTA uygulaması sonrası hücrelerden elde edilen metal değerlerinin sırasıyla hücrelere bağlanmayan, hücre duvarına bağlanan ve hücre içine alınan metal değerlerini temsil edeceği düşünülmüştür.

II.1.12.2. Sıcak Tampon Uygulaması ve Ultrasantrifüj

Bu yöntem, Inouhe ve ark. (1989) tarafından kullanılmış bir yöntemdir. Metal içeren besiyerlerinde üretilen hücreler santrifüj edilerek toplanmış, dökeltinin 3 mL'si hücrelere bağlanmayan metal miktarlarının analizi için ayrılmıştır. Hücreler 4 ml sıcak tampon içerisinde (5mM merkaptoetanol içeren 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 75°C) suspende edilmiş ve 75°C'de 20 dak. inkübe edilmişlerdir. Hücreler daha sonra cam boncuklarla vorteks edilerek parçalanmış ve homojenat 100.000 g'de 60 dak santrifüj edilmiştir. Bu yolla sitozol ve debris kısımlarında metal konsantrasyonları ölçülmüştür.

II.1.13. Hücrelerin İmmobilizasyonu

K. marxianus hücrelerinin aljinat (alginate) matriksine tutuklanmaları Costa ve ark. (1991) tarafından tarif edildiği şekilde yapılmıştır. Üretilen hücreler santrifüj edilmiş ve dist. su ile 3 kez yıkanmıştır. Dökelti atılarak, toplanan hücrelere (0.45 g) 0.48 gr. sodyum aljinat ve 0.26 g sodyum klorür içeren 30 mL'lik solusyon ilave edilmiştir. Elde edilen karışım iyice çalkalanmış ve 50 mL'lik bir şiringaya aktarılmıştır. Karışım şiringa aracılığı ile % 1'lik kalsiyum klorür solusyonu içerisine damlatılmış ve böylece oluşan tanecikle % 0.85' lik tuz solusyonu ile yıkanmışlardır. Tanecikler % 1'lik kalsiyum klorür solusyonu içerisinde muhafaza edilmiştir.

II.1.14. Altın Tayini

Altını potasyum disiyanoaurat formunda içeren solusyonlarda gravimetrik altın analizleri standard metodlardan adapte edilmiştir (Kaya, 1992) 15 mL'lik altın örnekleri 600 mL'lik beherlere alınmış ve herbirine önce 5 mL konsantre nitrik asit, sonra 5 mL sülfirik asit (yoğ.1.84) ilave edilip karışım kalın beyaz bir sülfür trioksit dumanı oluşuncaya dek ısıtılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan karışıma 50 mL dist. su katılarak seyreltme yapılmıştır. Su ilavesinden sonra altın toplanmaya başlamaktadır. Solusyon filtre kağıdı ile süzölmüş ve filtre kağıdı 2.5 mL nitrik asit içeren 50 mL su ile yıkanmıştır. Filtre kağıdı sıcak su ile son kez yıkandıktan sonra boş ağırlığı bilinen bir kroze içine alınmış, kroze ateşe tutularak filtre kağıdı kül haline getirilmiş ve daha sonra kroze oda sıcaklığına kadar

soğutulmuştur. Krozenin dolu ağırlığı tartılmış ve altın konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Altın miktarı (g/L)} = (\text{Krozenin dolu ağırlığı} - \text{Krozenin boş ağırlığı}) \times 40$$

II.2. BULGULAR

II.2.1. K. marxianus, K. fragilis ve S. cerevisiae'da Ağır Metal Dirençliliği Kalıpları

K. marxianus, K. fragilis ve S. cerevisiae'da ağır metal dirençlilik kalıpları, plak testleri ile belirlenmiş ve bu üç farklı maya türü arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. (Şekil. II. 3). Kullanılan metaller ve denenen konsantrasyonları (mM) aşağıda yerilmektedir.

$$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 0.075; 0.125; 0.25; 0.50; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0.$$

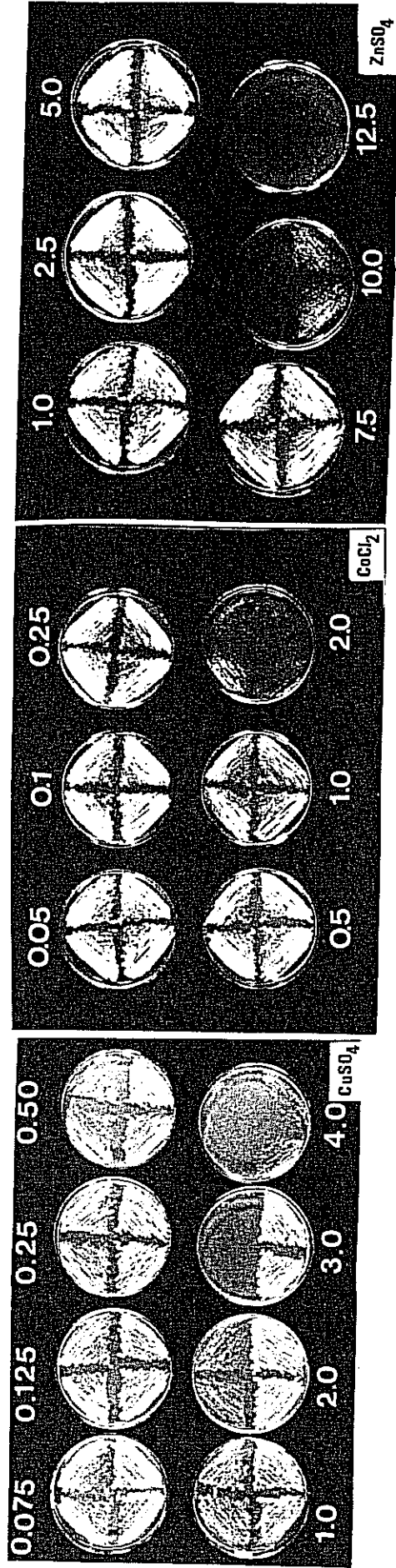
$$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 0.10; 0.25; 0.50; 1.0; 1.25; 2.0; 2.5.$$

$$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 = 0.015; 0.025; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 1.0; 1.25; 1.50; 2.0; 2.25; 2.5.$$

$$\text{AgNO}_3 = 0.015; 0.025; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 1.0; 1.25; 1.50; 2.0; 2.25; 2.5.$$

$$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.25; 0.50; 0.75; 1.0; 1.50; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0; 10.0; 12.5$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.25; 0.50; 0.75; 1.0; 1.50; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0; 10.0; 11.0; 12.0; 13.0; 14.0; 15.0.$$



Şekil II.3. Ağır metal dirençliliğinin plak testleri ile yarı kantitatif ölçümü. Agar plaklarının üst bölümü *S. cerevisiae* ile, alt bölümü ise *K. marxianus* ile inokule edilmiştir.

Her iki Kluyveromyces türünün de S. cerevisiae'dan daha dirençli olduğu ve en dirençli türün K. marxianus olduğu gösterilmiştir. Bu organizmalar için minimum inhibe edici metal konsantrasyonları Tablo II'3'de verilmektedir. S. cerevisiae ile karşılaştırıldığında, K. marxianus'un Co, Cu, Ag ve Cd'a sırasıyla 1,5, 2, 100 ve 150 misli dirençli olduğu bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda S. cerevisiae için daha az toksik olan tek metal Mn'dir; Zn dirençliliği tüm organizmalar için hemen hemen aynıdır.

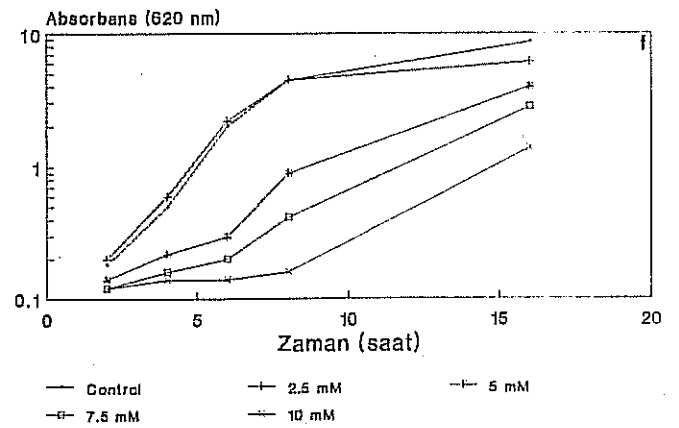
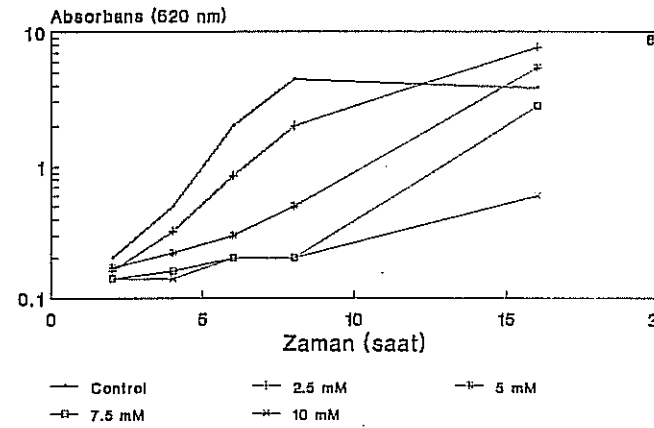
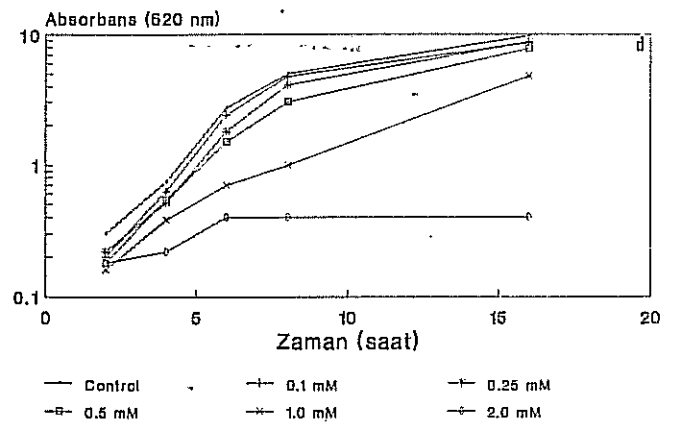
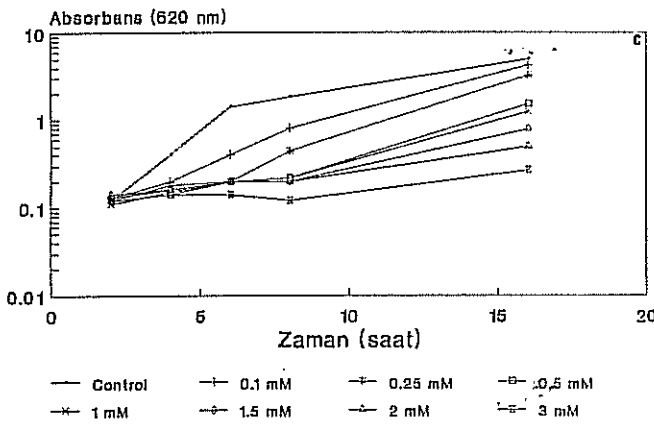
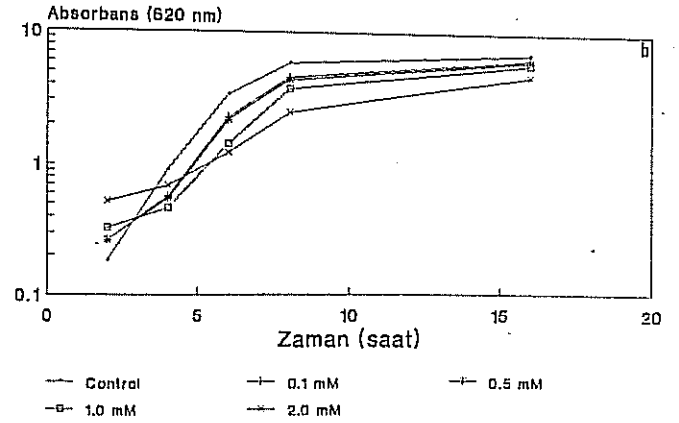
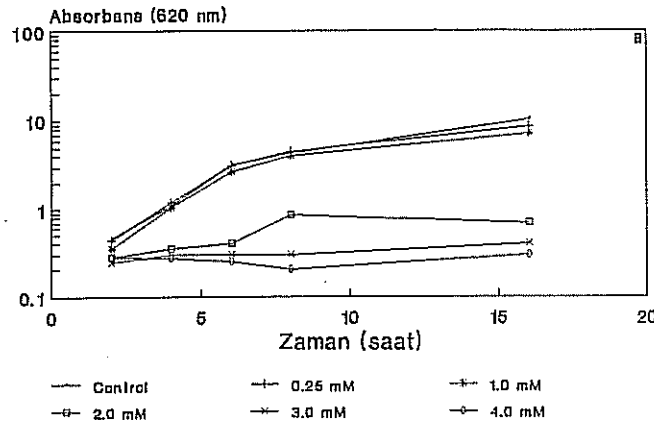
Maya MT'nin Cu ile indüklenmesinin bu proteinin bazal seviyenin üzerinde sentezlenmesi için gerekli olduğu gözönüne alınarak metallere yapılan tüm plak testleri 10 µM bakırın indüktör olarak plaklara katılması suretiyle tekrarlanmıştır. Bu konsantrasyonun indüksiyon için kafi olduğu bilinmektedir. Bakır varlığında organizmaların metal dirençlilik kalıpları değişmemiş, bu nedenle ağır metallerin etkilerinin incelendiği sonraki çalışmalarda bakır ilavesi yapılmamıştır.

Ayrıca Tablo II. 3'de verilen ön bulgular ışığında, K. marxianus'un daha sonraki çalışmalarda S. cerevisiae ile karşılaştırılacak Kluyveromyces türü olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

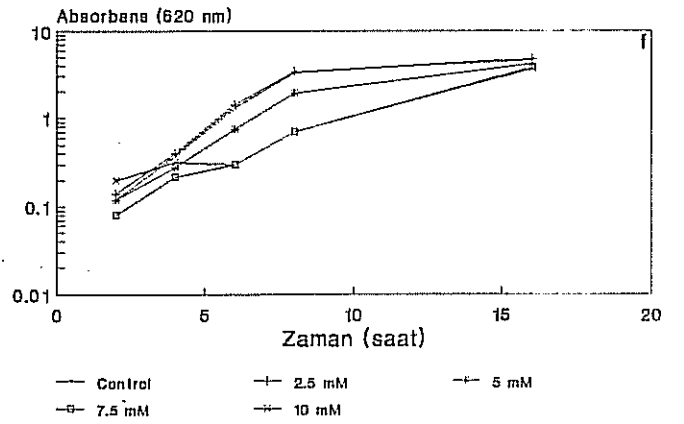
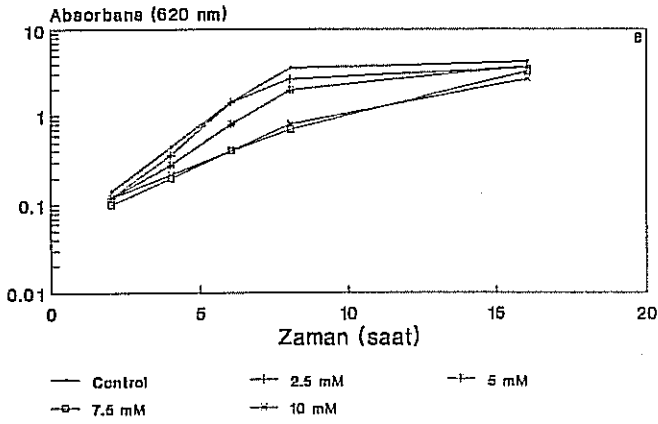
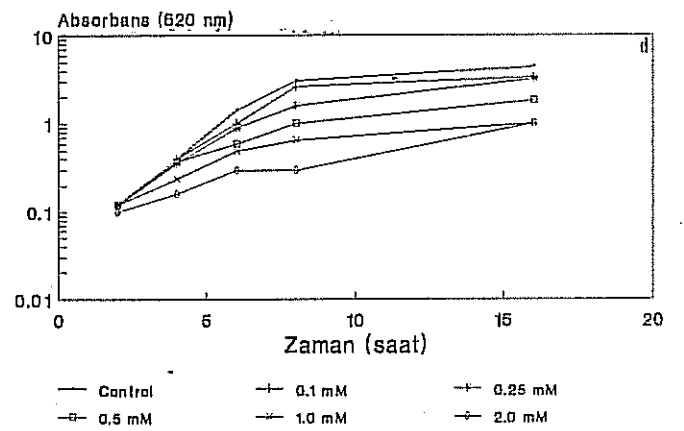
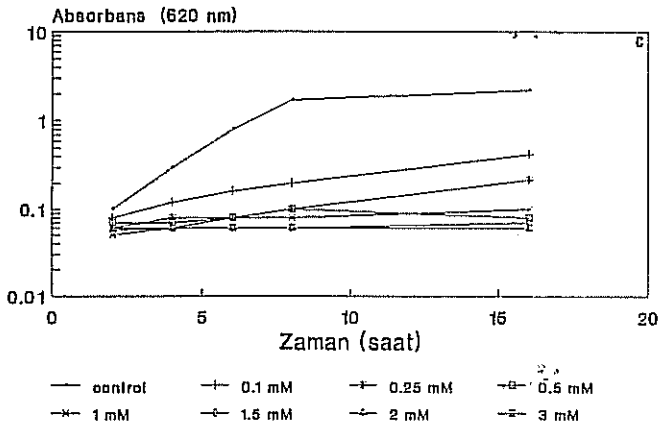
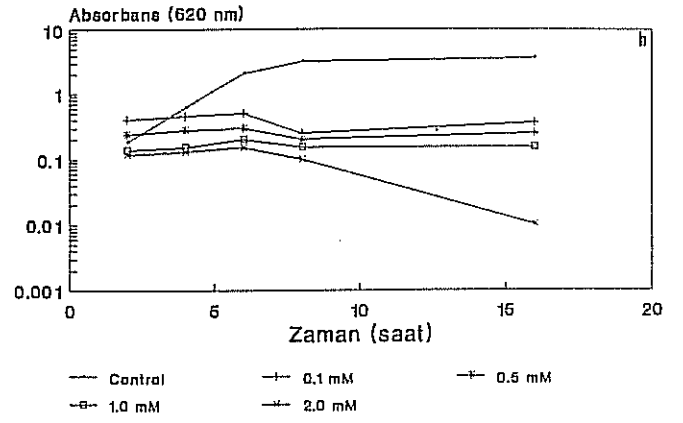
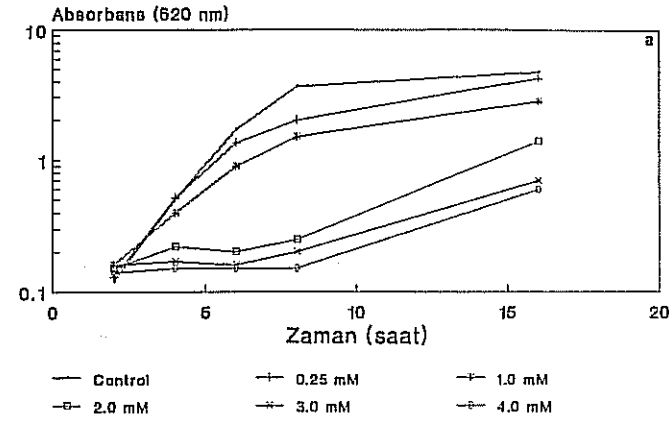
II.2.2. Yüksek Metal Konsantrasyonlarında Kesikli Üreme Kinetikleri

Sıvı Kültürlerde üreme ile ilgili ölçümler yapılarak kademeli olarak arttırılan metal konsantrasyonlarının organizmaların üreme siklusu, üreme hızı ve maksimum biyokütle değerleri üzerine etkileri

belirlenmiştir. Çalışılan metal konsantrasyonu aralıkları ön plak testlerinin sonuçlarına göre seçilmiştir. K. marzianus ve S. cerevisiae'da yüksek metal konsantrasyonlarının üreme siklusu üzerine etkileri Şekil II.4 ve Şekil II.5'de gösterilmektedir.



Şekil II. 4. Cu(a), Ag(b), Cd(c), Co(d), Zn(e) ve Mn(f)'in yükselen konsantrasyonlarında *K. marxianus*'un üreme eğrileri.



Şekil II. 5. Cu(a), Ag(b), Cd(c), Co(d), Zn(e) ve Mn(f)' nin yükselen konsantrasyonlarında *S. cerevisiae*'nin üreme eğrileri.

Organizma	Metallerin Minimum inhibe edici konsantrasyonları (mM)					
	Cu	Co	Ag	Cd	Mn	Zn
<u>K. marxianus</u>	4.0	2.0	2.25	2.5	12.0	10.0
<u>K. fragilis</u>	4.0	1.5	2.0	2.25	12.0	12.5
<u>S. cerevisiae</u>	2.0	1.25	0.025	0.015	15.0	12.5

Tablo II.3. K. marxianus, K. fragilis ve S. cerevisiae'nin çeşitli metallere toleransları. Metaller sentetik ağıar ortamına ilave edilmişlerdir.

K. marxianus'da üreme hızı ve maksimum kuru biyokütle değerleri 2mM'lık bir $CuSO_4$ konsantrasyonuna dek çok önemli bir değişim göstermemiş, daha yüksek konsantrasyonlarda düşerek 3mM'da tam bir inhibisyon görülmüştür. (Şekil II.6). Organizmanın gümüşe dirençliliği de oldukça yüksek olup 0.1, 0.5 ve 1.0 mM $AgNO_3$ varlığında sırasıyla 1.2, 0.98, 0.91 ve 0.78 h^{-1} gibi üreme hızlarıyla ve 6.2, 5.6, 5.5 ve 5.1 mg biyokütle/mL verimliliği ile üremişlerdir (Şekil II.7). 2.5 mM gümüş içeren ortamda üreme olmamıştır. Kobaltın 0.1 - 2 mM'lık bir konsantrasyon aralığında üremedeki düşüş hemen hemen lineer olup üreme 2 mM kobalt içeren ortamda oldukça zayıftır (Şekil

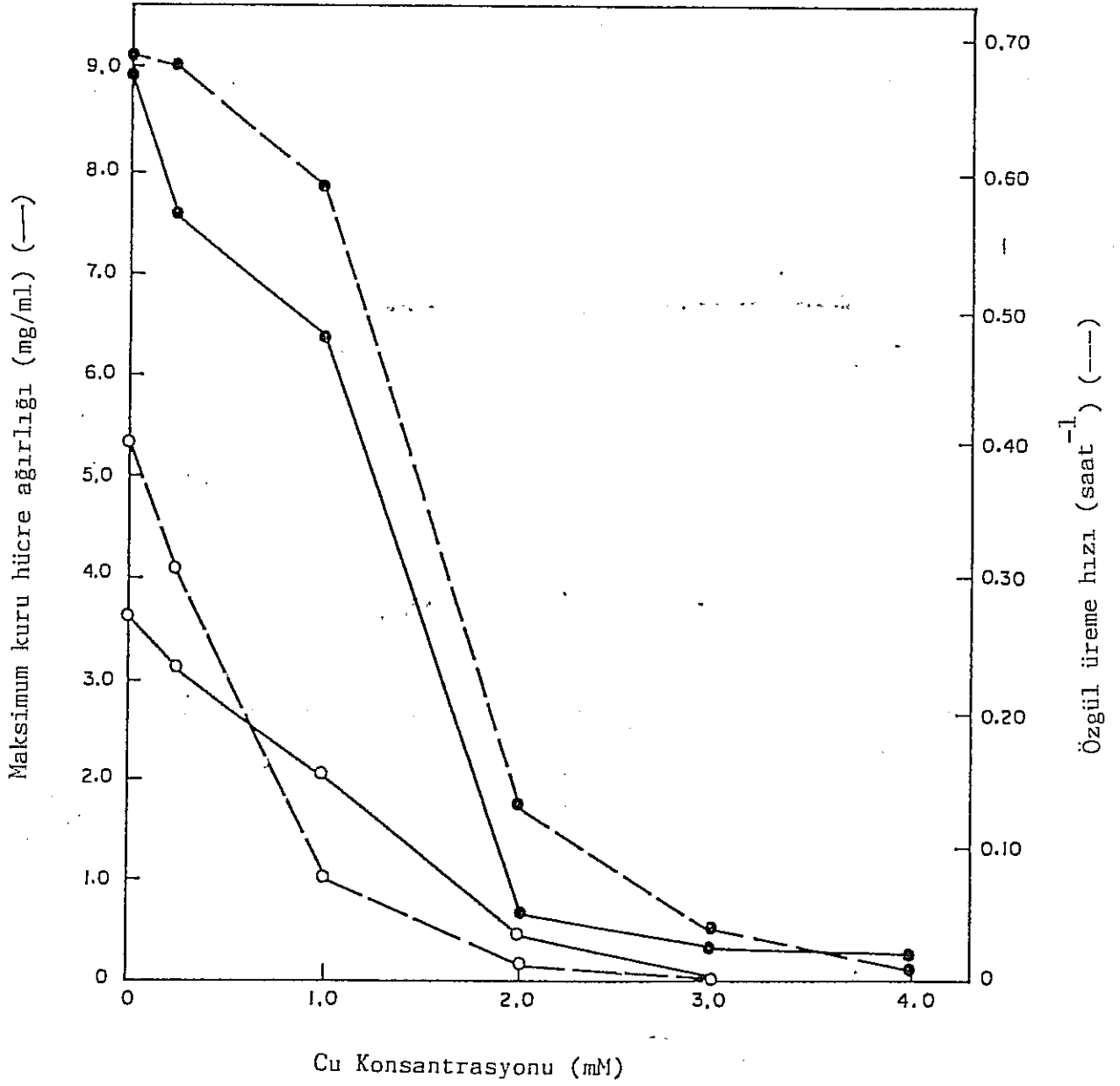
II.8). 0.1 mM Cd(NO₃)₂ varlığında üreme hızı ve verimi kontrole göre % 66 ve % 43 düşüş göstermiş, daha sonra 1 mM'lik bir konsantrasyona dek hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil II.9). Zn ve Mn'a ise S. cerevisiae daha dayanıklı gözükmektedir. (Şekil II.10, II.11).

Bulguların tümü ele alındığında K. marxianus'un önemli ağır metallere S. cerevisiae'dan çok daha dirençli olduğu, Ag ve Cd'ye dirençliliğinin ise özellikle çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

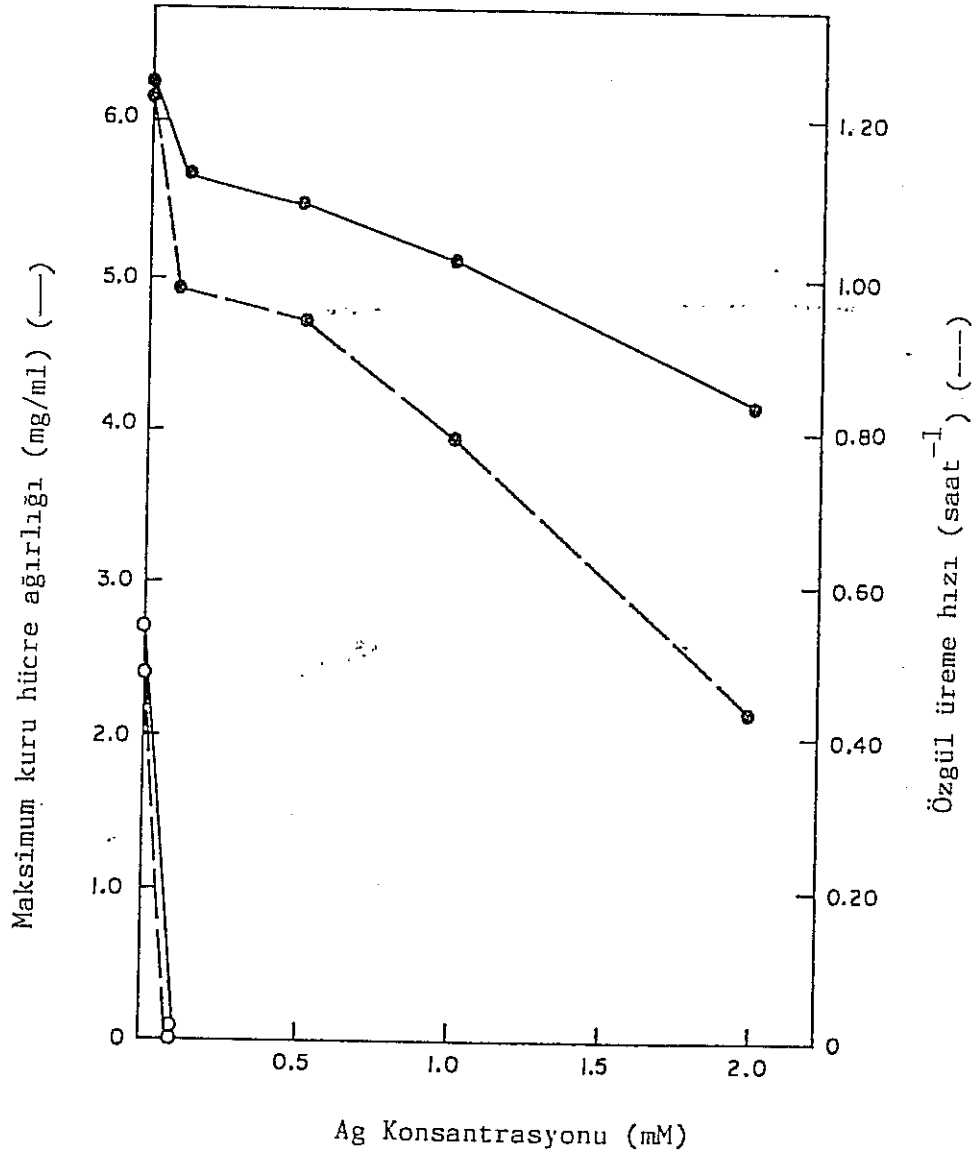
II.2.3. Metal Konsantrasyonunun Kademeli Olarak Arttırılması Yoluyla Dirençli Klonların Seçimi

Dirençli klonların seçimi amacıyla kullanılan ağır metaller Ag, Cd ve Cu olmuş ve her iki organizmanın da bu metallere alışılmadık ölçüde yüksek derçlilik gösteren klonları elde edilmiştir.

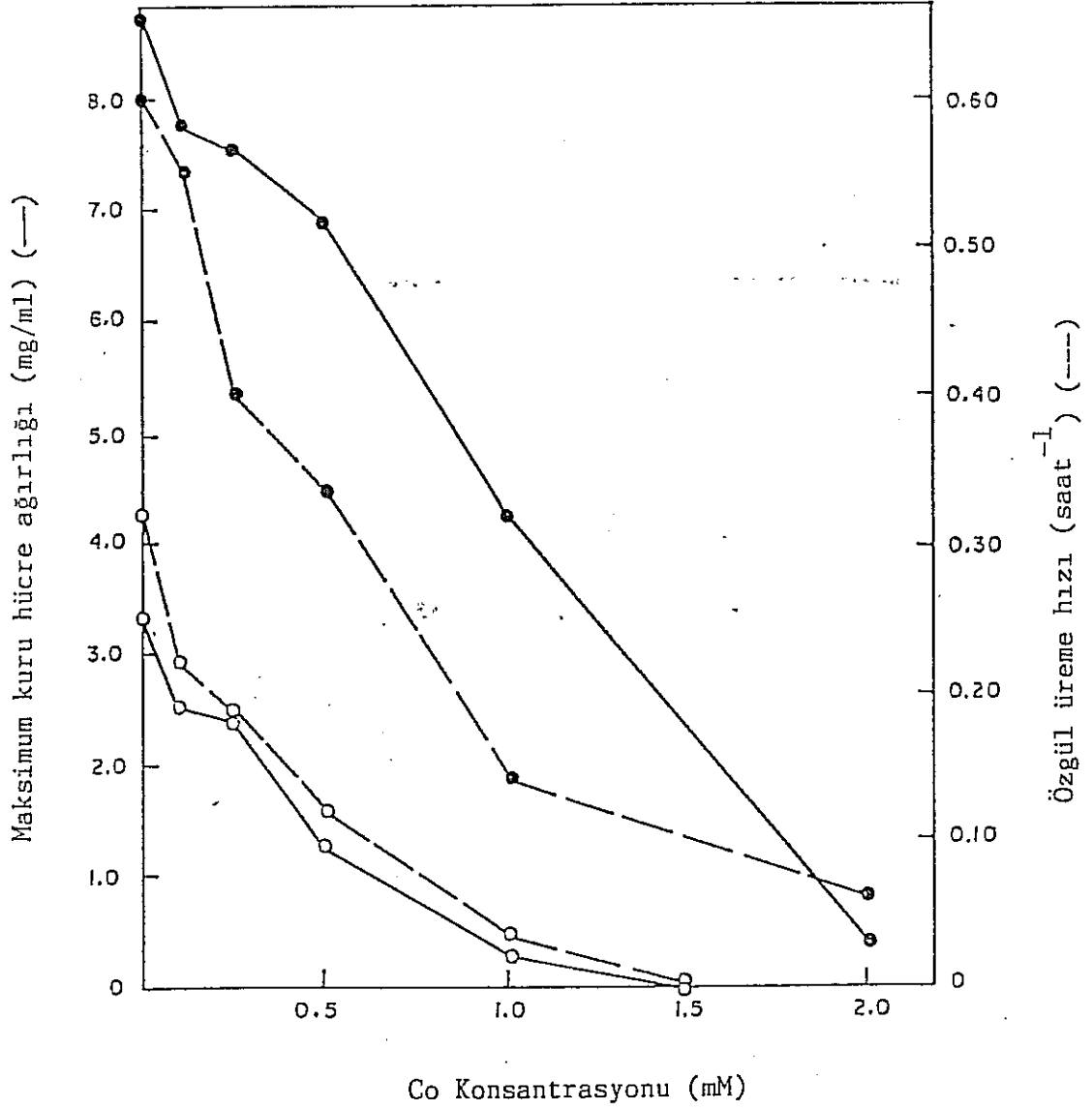
Öncelikle Cu direnci ele alınmış ve K. marxianus'un 15 mM, S. cerevisiae'nin ise 10 mM CuSO₄ varlığında üreyebilen kolonileri seçilerek diğer metallerin artış gösteren konsantrasyonlarını içeren plaklara ardışık transferler yoluyla S. cerevisiae'nin 4 mM AgNO₃ ve 0.5 mM Cd(NO₃)₂, K. marxianus'un ise 5 mM AgNO₃ ve 5 mM Cd(NO₃)'e dirençli klonları elde edilmiştir (Şekil II. 12)



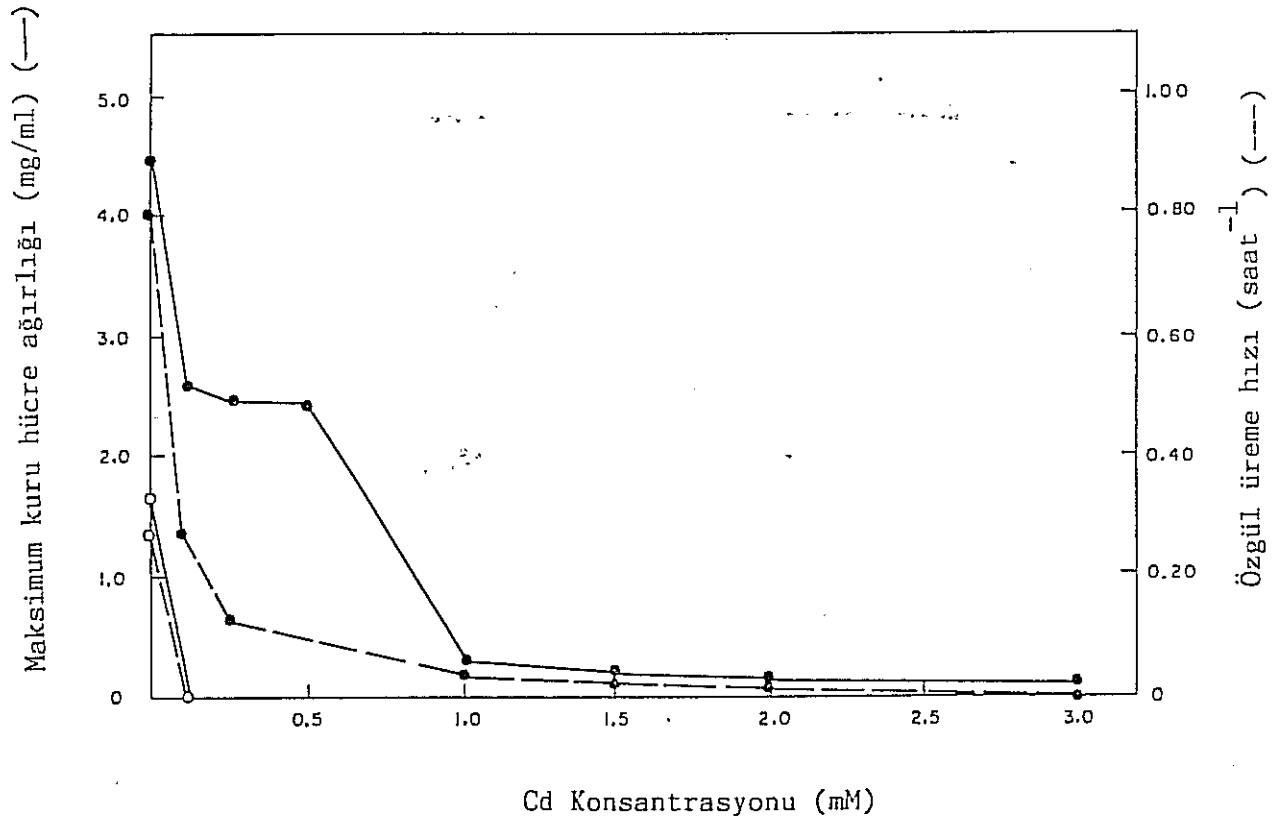
Şekil II. 6. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Cu konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.



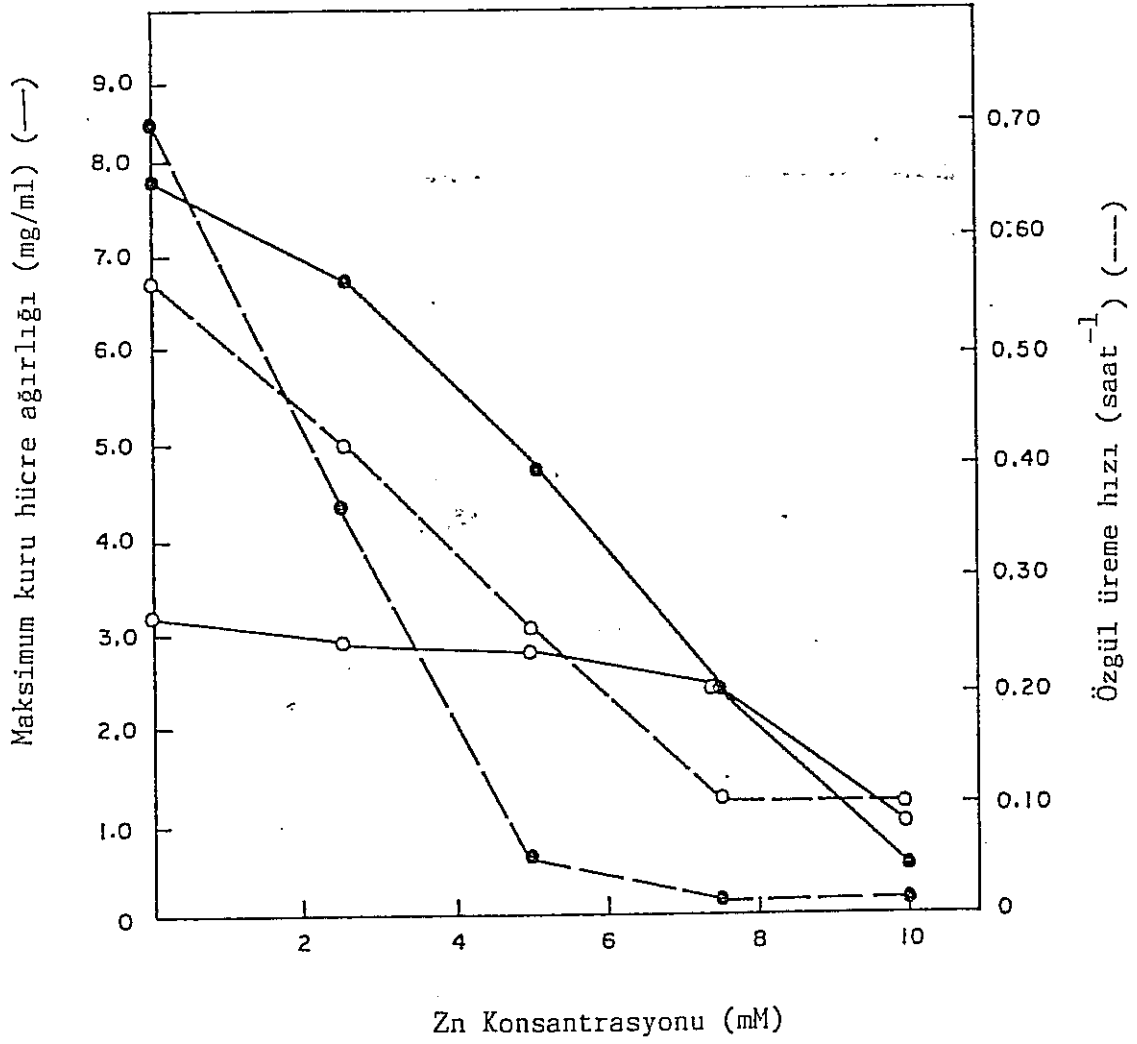
Şekil II. 7. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Ag konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.



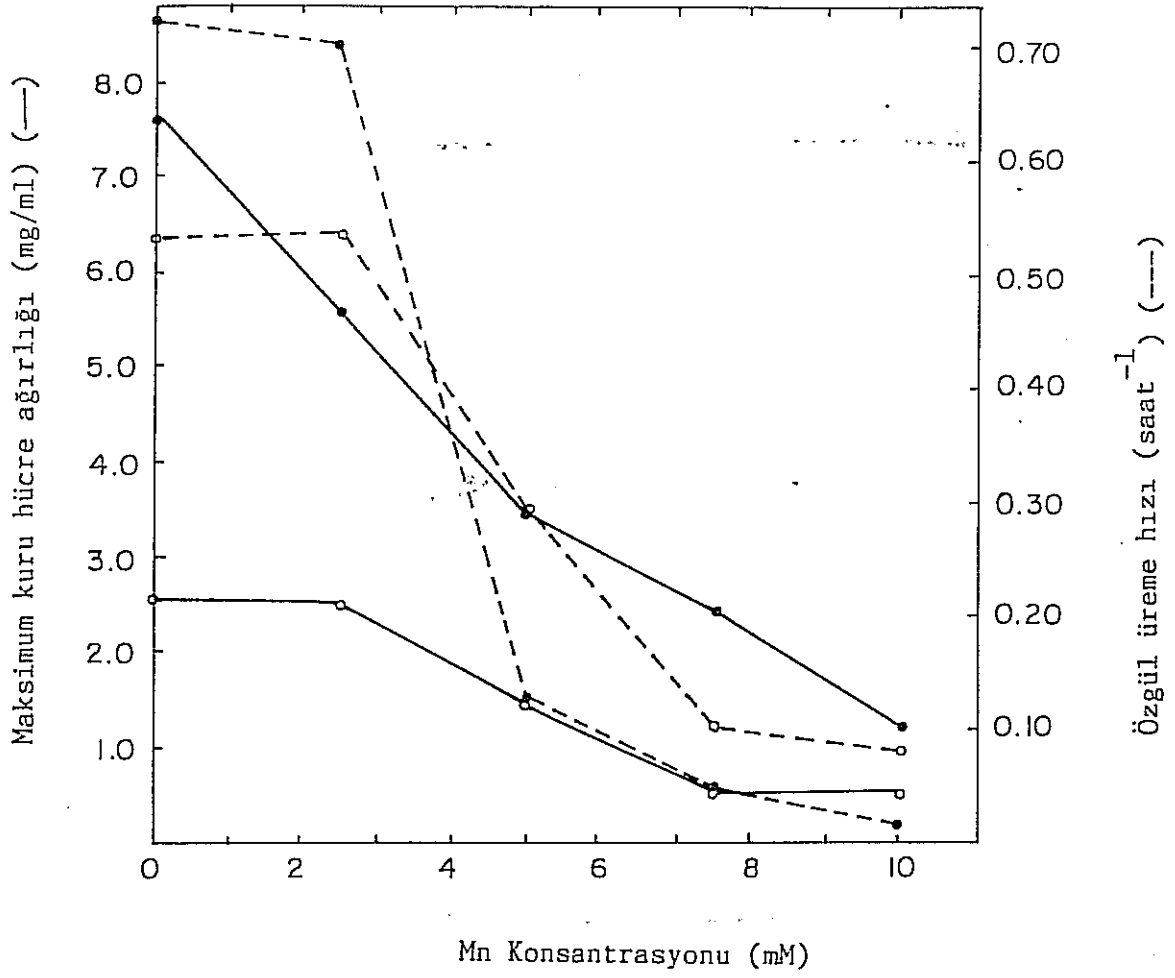
Şekil II. 8. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Co konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.



Şekil II. 9. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Cd konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.



Şekil II.10. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Zn konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.



Şekil II.11. *S. cerevisiae* (o) ve *K. marxianus* (*)'un çeşitli Mn konsantrasyonlarında üreme hızları ve maksimum biyokütle değerleri.

II. 2.4. Ağır Metallerle İndüklenen Hücrelerde Protein Profilleri

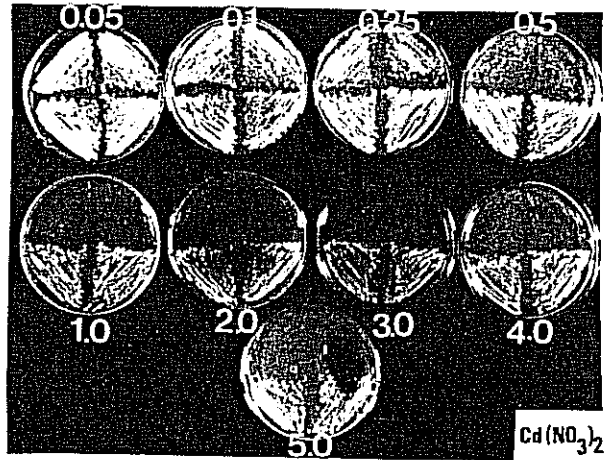
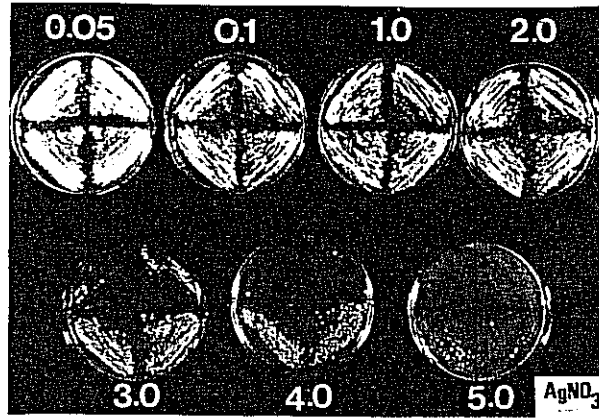
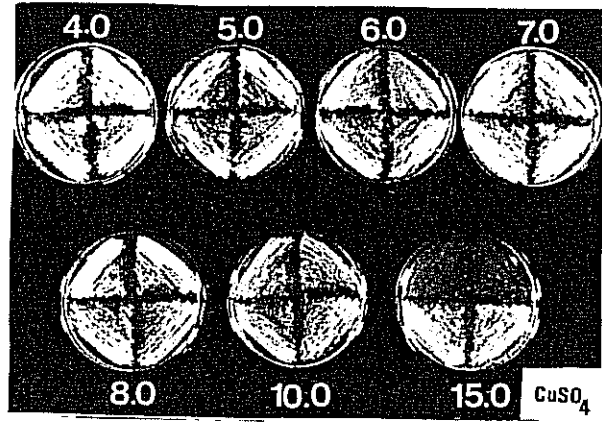
II.2.4.1. Bakırla İndüksiyon

S. cerevisiae ve K. marxianus'un bakırla indüklenmiş ve indüklenmemiş kültürlerinde hücrelerden izole edilen proteinlerin SDS içermeyen poliakrilamid jeli üzerinde elektroforetik analizi Şekil II.13'de gösterilmektedir. S. cerevisiae'da bakır ile muamele sonrasında metalotiyonine karşılık gelen protein bandının kalınlığında bir artış olurken böyle bir farklılık K. marxianus metalotiyonini için söz konusu değildir.

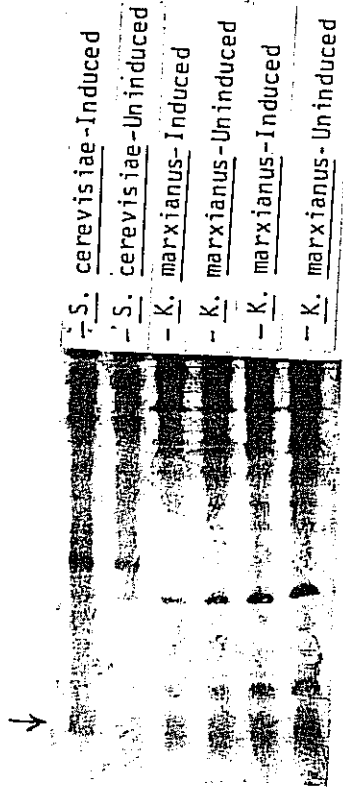
S. cerevisiae'da metalotiyonin indüksiyonu için kültürlerin bakıra maruz kalma süresinin etkisi incelenmiştir. 90 dak. lık bir periyodun bu proteinin yeterince indüklenmesi için yeterli olduğu, 120 dak. ve 150 dak. lık daha uzun periyotlarda daha etkin bir sentez elde edilemeyeceği bulunmuştur. (Şekil II.14.).

II.2.4.2. Gümüş ve Kadmiyumla İndüksiyon

Gümüş ve kadmiyumla indüksiyon yapıldığında, K. marxianus'da metalotiyoninden daha düşük molekül ağırlıklı (5 kDa'dan küçük) bir proteinin sentezlendiği görülmüştür (Şekil II.15). Bu protein bakırla muamele sonrasında sentezlenmemiştir.



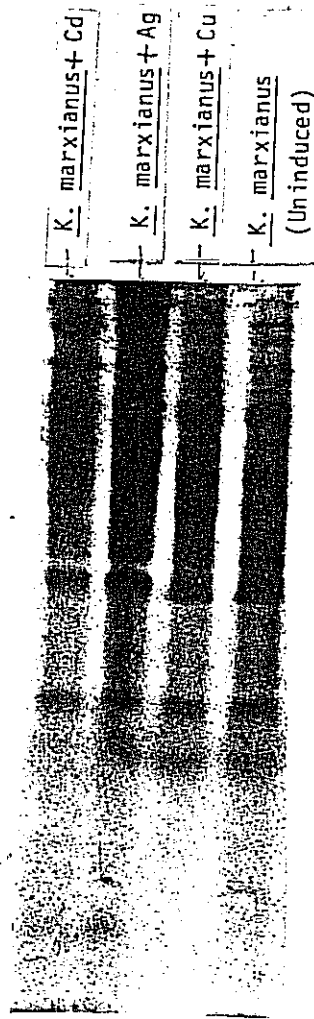
Şekil II.12. Metallerin daha yüksek konsantrasyonlarına dirençli klonların seçimi.



Şekil II. 13. S. cerevisiae ve K. marxianus 'un bakırla indüklenmiş ve indüklenmemiş hücrelerinden ekstrakte edilen proteinlerin SDS içermeyen poliakrilamid jel elektroforezi. MT'in pozisyonu okla gösterilmiştir.



Şekil II. 14. *S. cerevisiae*'da bakıra maruz bırakılma süresinin (dak) MT'in indüksiyon seviyesi üzerine etkisi.



Şekil II.15. *K. marxianus*'da bakır (0.25mM), gümüş (0.1 mM) ve kadmiyumla (0.1 mM) indüksiyon sonrası ekstrakte edilen proteinlerin SDS içermeyen poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi. Gümüş ve kadmiyumla indüklenen düşük molekül ağırlıklı protein okla gösterilmiştir.

Aynı örnekler SDS-poliakrilamid jeline uygulandığında K. marxianus'da gümüş ve kadmiyum ile indüklenen bu proteinin varlığı bir kez daha gösterilmiş, S. cerevisiae'da ise bu protein sadece gümüşle muamele edilmiş hücrelerde çok zayıf bir bant vermiştir (Şekil II. 16).

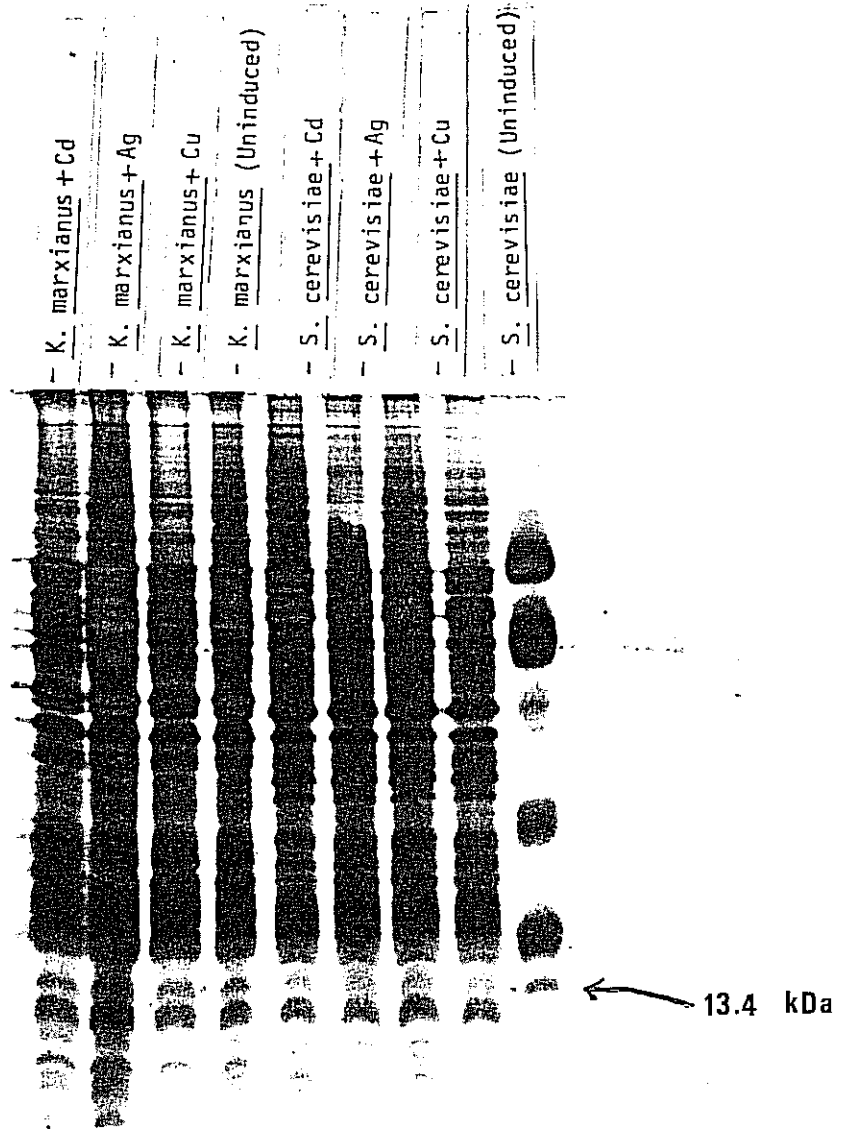
Diğer yandan, S. cerevisiae metalotiyoninin sadece bakırla değil, gümüş ve kadmiyum ile de indüklendiği gösterilmiştir (Şekil II.17).

II.2.5. Hücrelerde Ağır Metal Biriktirilmesi

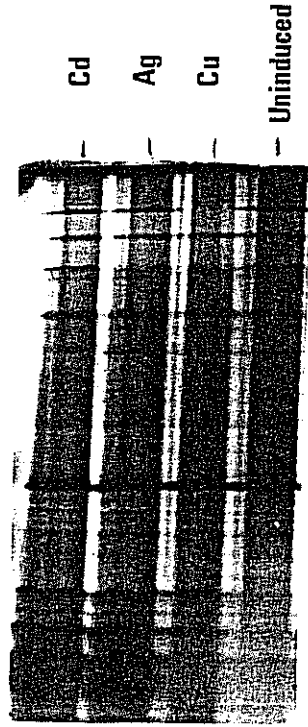
Maya hücreleri çeşitli metallerin metin içinde belirtilmiş konsantrasyonlarını içeren besiyerlerinde üretilmiş, belirli aralıklarla kültür örnekleri alınarak üreme spektrofotometrik olarak ölçülmüş, daha sonra örneklerin santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre ve kültür sıvısı fraksiyonlarının her ikisinde de metal analizi yapılarak hücrelerde biriktirilen metal miktarları belirlenmiştir.

II. 2.5.1. Bakır Biriktirilmesi

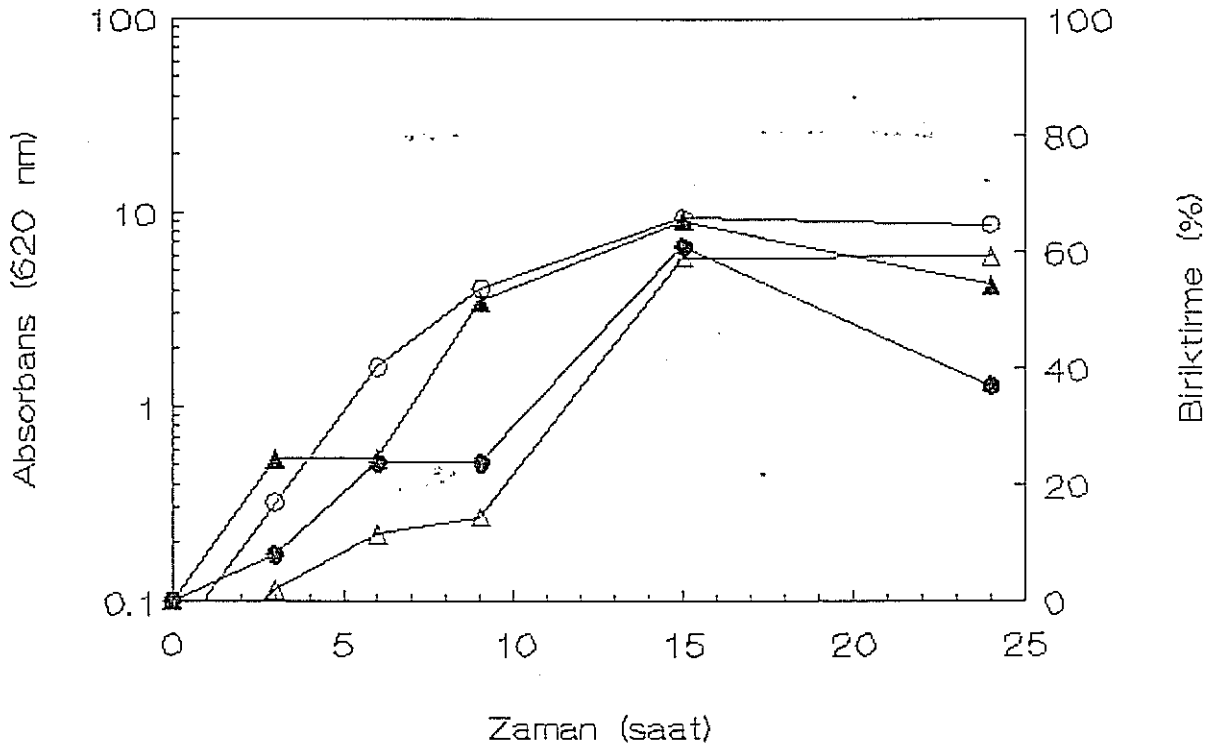
Hem S. cerevisiae, hem de K. marxianus'da bakır biriktirilmesinin iki fazda gerçekleştiği ve bakırın büyük bir kısmının üremenin midlogaritmik fazından sonra absorbe edildiği gözlenmiştir. (Şekil II.18) 14 saatlik bir inkübasyon süresi içinde, kültür ortamlarına ilave edilmiş bakırın biriktirilme oranı S. cerevisiae için % 65, K. marxianus için ise % 60'dır.



Şekil II. 16. *S. cerevisiae* ve *K. marxianus*'da bakır, gümüş kadmiyumla indüksiyon sonrası ekstrakte edilen proteinlerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi.



Şekil II. 17. *S. cerevisiae* metallothiyoninin bakır, gümüş ve kadmiyum tarafından indüklenmesi.



Şekil II. 18. *K. marzianus* (o) ve *S. cerevisiae*'nin (Δ) 0.5 mM CuSO₄ varlığında üreme (açık semboller) ve Cu biriktirme (kapalı semboller) profilleri.

II. 2.5.2 Gümüş Biriktirilmesi

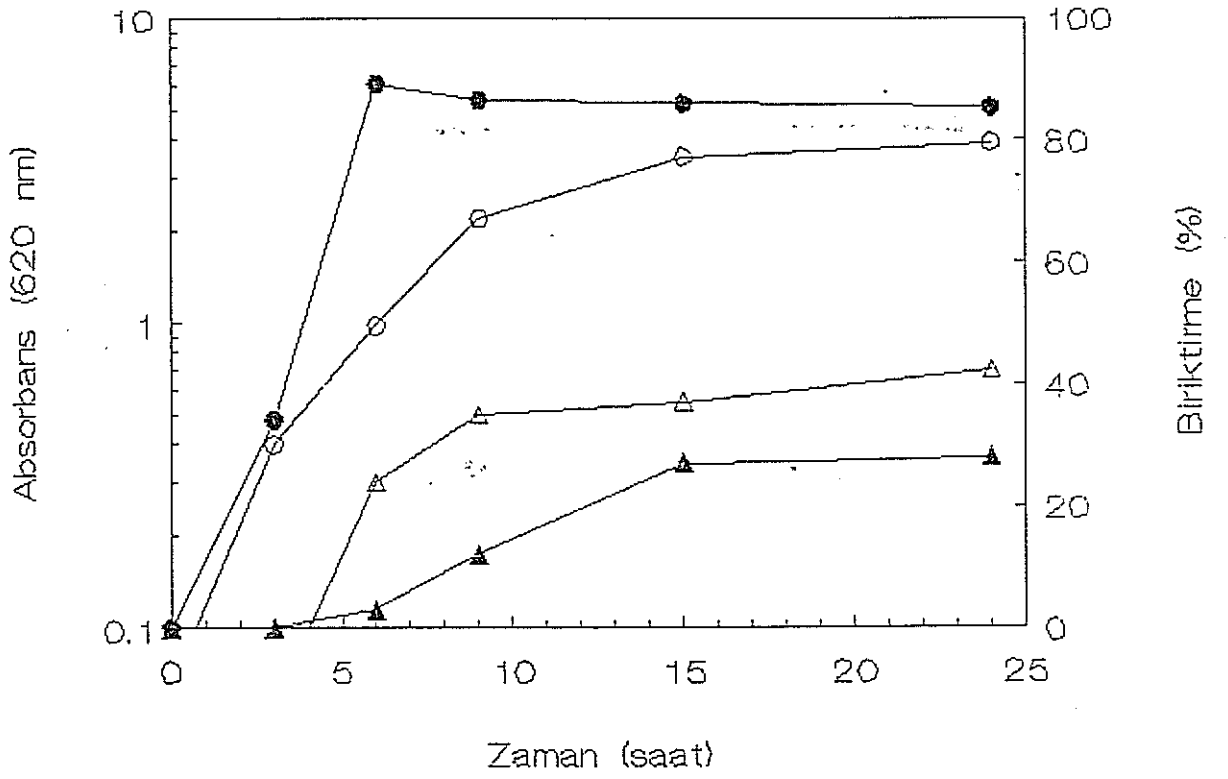
Gümüş, K. marxianus tarafından en hızlı ve en yüksek miktarda biriktirilen metal olmuştur. Besiyerine 0.5 mM'lik bir konsantrasyonda katılan bu metalin % 90 gibi çok yüksek bir miktarı ilk 6 saat içerisinde hücrelerde toplanmıştır. S. cerevisiae'nin gümüşe toleransının düşük olduğu gözönünde tutularak bu organizma için gümüş konsantrasyonu daha düşük tutulmuş (0.1 mM), buna karşın hücreler tarafından bunun sadece % 30'u oldukça yavaş biçimde bağlanmıştır. (Şekil II.19).

II.2.5.3. Kadmiyum Biriktirilmesi

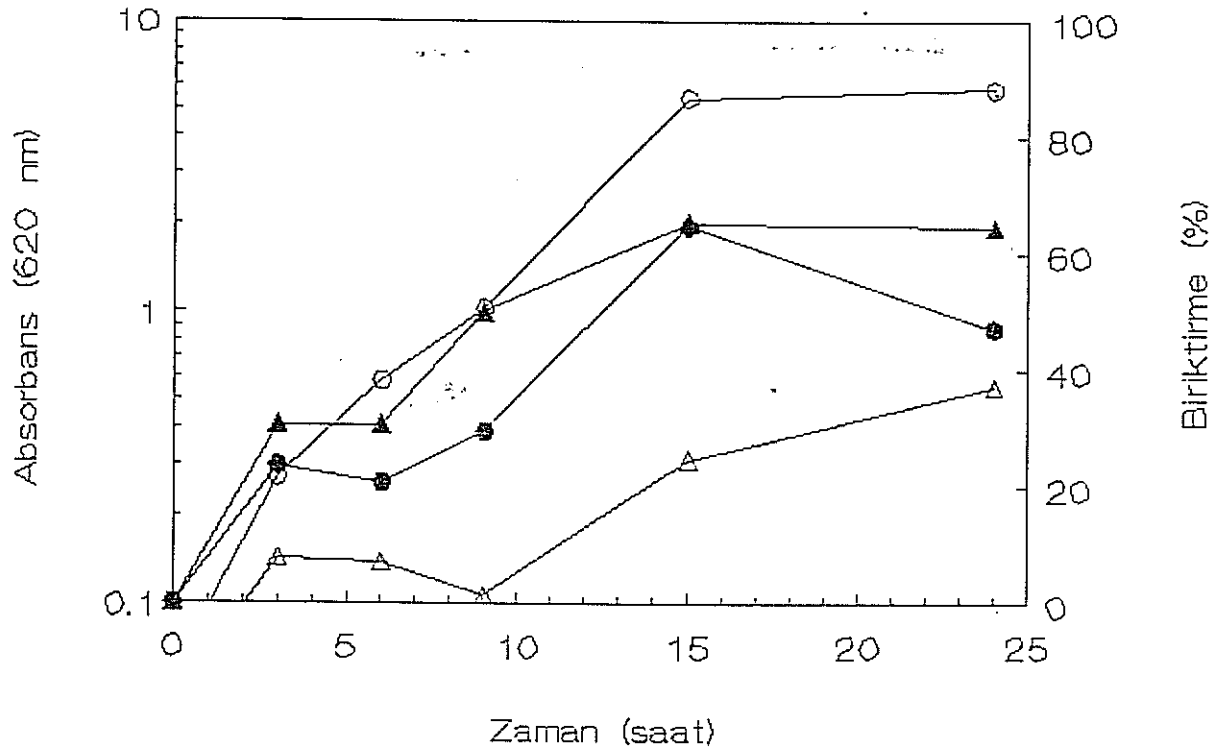
0.25 mM $Cd(NO_3)_2$ ilavesi yapılmış K. marxianus kültürlerinde kadmiyumun % 65'inin absorblandığı gözlenmiştir. S. cerevisiae ise, 10 misli az $Cd(NO_3)_2$ içeren bir ortamda aynı oranda kadmiyum biriktirmiştir (Şekil II.20).

II.2.5.4. Kobalt, Çinko ve Mangan Biriktirilmesi

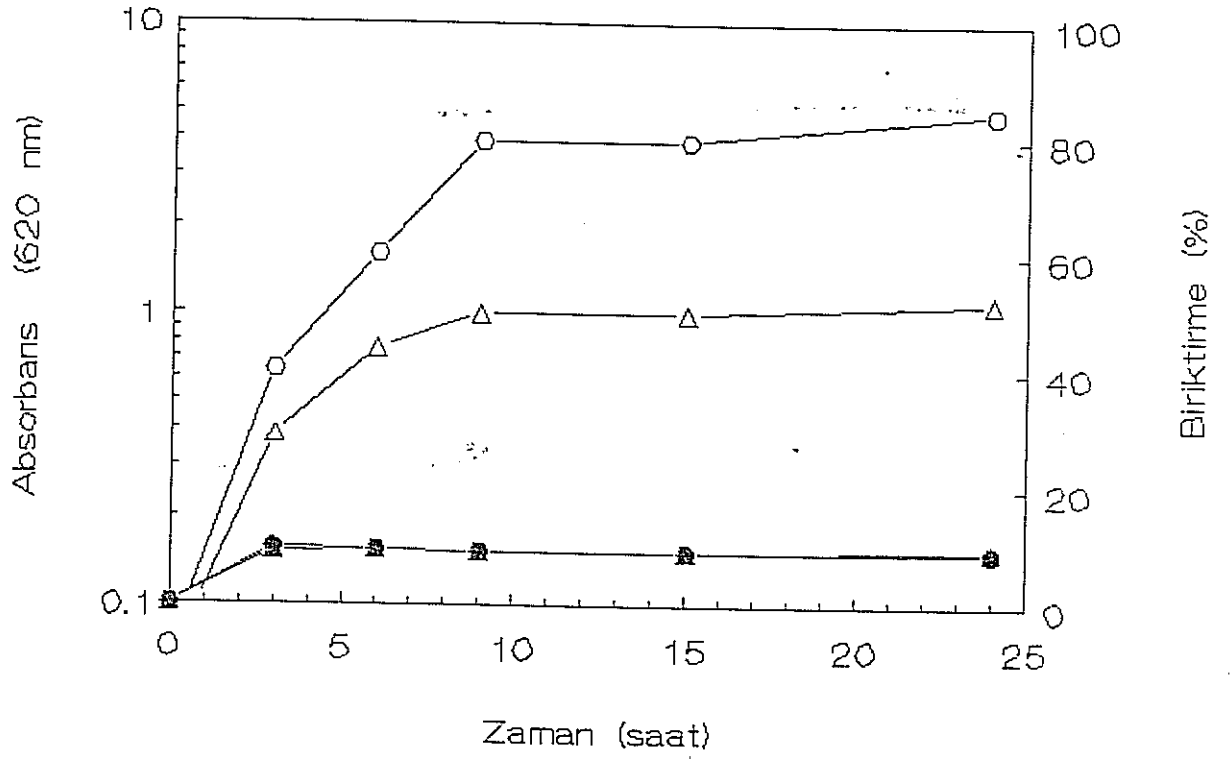
Her iki organizma için de kobalt biriktirimi oldukça zayıf olup %10-15 civarında kalmıştır (Şekil II. 21). K. marxianus tarafından çinko ve mangan absorpsiyonu % 10'dan azdır. (Şekil II.22 ve Şekil II. 23). Mangan biriktiriminde S. cerevisiae göreceli olarak daha etkindir, yine de bu metalin % 20'sini toplayabilmiştir.



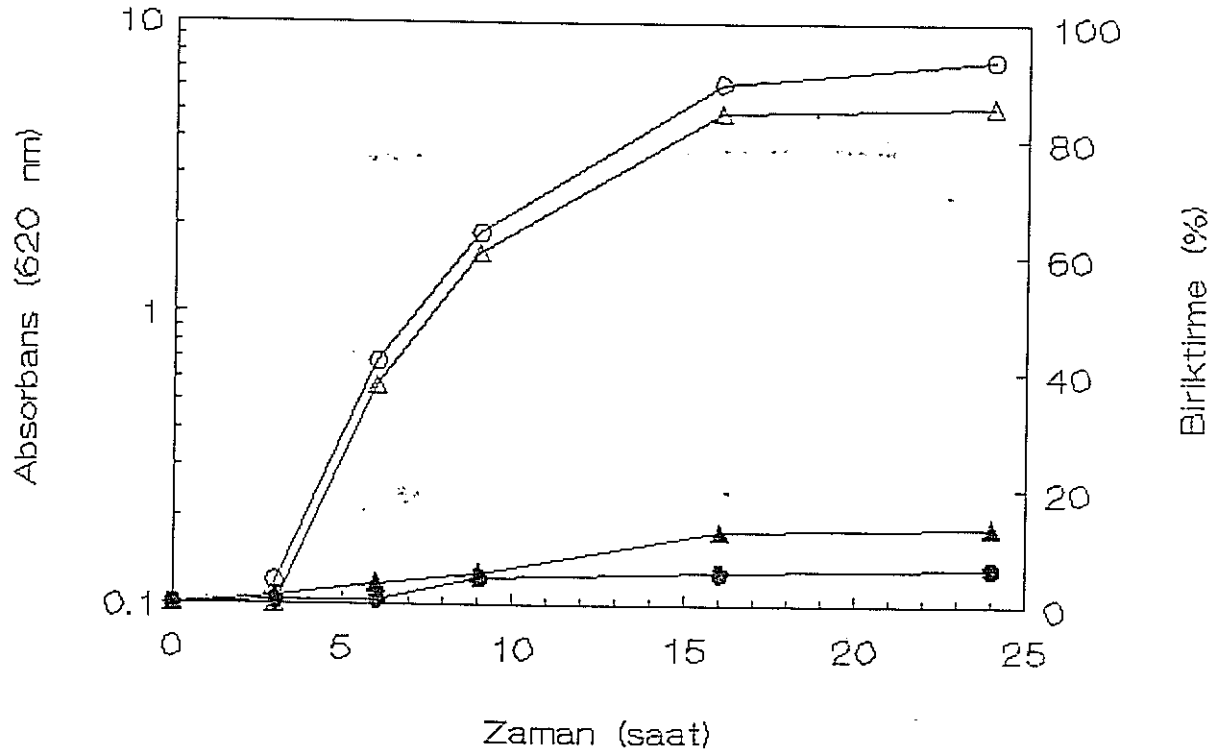
Şekil II. 19. *K. marzianus* (o) ve *S. cerevisiae*'da (Δ) Ag varlığında üreme (açık semboller) ve Ag biriktirme (kapalı semboller) profilleri. Başlangıç AgNO₃ konsantrasyonu *K. marzianus* için 0.5 mM, *S. cerevisiae* için ise 0.1 mM'dir.



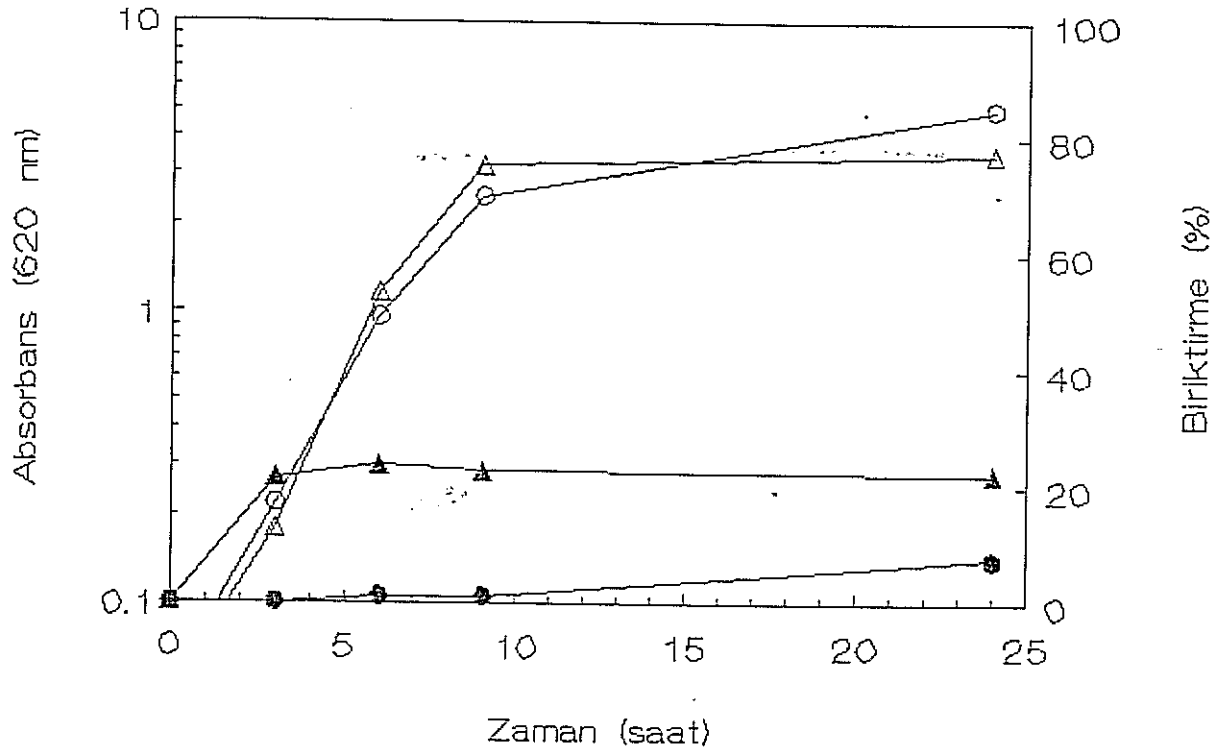
Şekil II. 20. *K. marxianus* (o) ve *S. cerevisiae*'da (Δ) Cd varlığında üreme (açık semboller) ve Cd biriktirme (kapalı semboller) profilleri. Başlangıç Cd(NO₃)₂ konsantrasyonu *K. marxianus* için 0.25 mM, *S. cerevisiae* için ise 0.025 mM'dir.



Şekil II. 21. *K. marzianus* (o) ve *S. cerevisiae*'nin (Δ) 0.5 mM CoCl_2 varlığında üreme (açık semboller) ve Co biriktirme (kapalı semboller) profilleri.



Şekil II. 22. *K. marxianus* (o) ve *S. cerevisiae*'nin (Δ) 2.5 mM ZnSO₄ varlığında üreme (açık semboller) ve Zn biriktirme (kapalı semboller) profilleri.



Şekil II. 23. *K. marxianus* (o) ve *S. cerevisiae*'nin (Δ) 2.5 mM $MnSO_4$ varlığında üreme (açık semboller) ve Zn biriktirme (kapalı semboller) profilleri.

II.2.6. Metallerin Yüzeyle Bağlanma ve Hücre İçine Alınma Seviyeleri

Hücrelere metal bağlanmasında yüzeyle bağlanma (biyosorpsiyon) ve hücre içine alınımın rollerinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmış, Cu, Ag ve Cd bu amaçla kullanılacak metaller olarak seçilmiştir.

II.2.6.1. Hücrelerin EDTA ile Muamelesi

Bu yaklaşımda, ağır metallerin hücre yüzeylelerinde desorbe edilmesi amaçlanmıştır. Maya hücreleri kùltür sıvısından ayrıldıktan sonra metal tutucu bir ajan olan EDTA (10 mM, pH 3.0) ile muamele edilmişlerdir. Daha sonra bu solusyonun metal içeriği ölçülerek hücrelerde kalan metal miktarı ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular Tablo II.4'de verilmektedir. Organizmalarda yüzeyle (duvar) bağlanması sadece % 1.5 ile % 4 arasında kalmıştır. Ancak bu değerler sitozol ve duvarın ayrı fraksiyonlar halinde ele alındığı daha sonraki deney sonuçlarına uygunluk göstermemektedir.

II.2.6.2. Sitozol ve Döküntü (Debris) Kısımlarının Metal İçeriği

Hücrelerin sitozol ve debris fraksiyonları Kısım II.1.12.2'de tarif edildiği şekilde hazırlanmış ve metal içerikleri karşılaştırılmıştır.

EDTA uygulaması ile alınan sonuçların tam tersine, metallerin duvar ve membranlara bağlanmasının bu organizmalarca biriktirilen metallerin çok önemli bir bölümünü oluşturduğu bulunmuştur. Her

üç metal için de, biriktirilen metallerin çok yüksek bir yüzdesi çözünür olmayan fraksiyonda olup, örneğin, K. marxianus'da çözünür sitoplazma bağlı metalin sadece % 2-6'sını içermektedir. Bu miktar da, metal-bağlanma proteinlerine bağlanmış olan metal miktarıdır (Tablo II.5, II.6 ve II.7). Metal biriktirme kapasitesi yönünden bu organizmadan daha az etkin olmasına karşın, S. cerevisiae sitozolünde daha fazla metal içermektedir.

Önceki tüm deneylerde kadmiyum akümülyasyonu % 65 düzeylerinde bulunmuştu. Kadmiyum ile yapılan şimdiki çalışmada bu metalin hücrelerdeki toplam birikimi % 30 düzeyinde kalmıştır (Tablo II. 7). Ancak, diğer metallerde olduğu gibi sitozolün kadmiyum içeriğinin oldukça düşük olduğu, bunun da bu metalin hücredeki lokasyonu hakkında yeterince fikir verdiği gözönünde tutularak deney tekrarlanmamıştır.

II.2.7. K. marxianus'un Serbest ve Immobilize Hücreleri ile Altın'ın Solusyondan Geri Kazanımı

K. marxianus kullanılarak değerli bir metal olan altının solusyonlardan geri kazanımı olanağı araştırılmış ve bunun için hem serbest, hem de aljinata tutuklanmış hücreler kullanılmıştır. Deneyler 30 mL. lik altın solusyonu örneklerinin (stok solusyon, litrede 0.92 g potasyum disiyano aurat (I) içermektedir) yıkanmış hücrelerle veya hücrelerin tutuklandığı aljinat tanecikleri ile muamelesini içermiştir.

K. marxianus'un 16 saat boyunca üretilen 30 mL.lik kültüründe hücreler santrifüjle toplanmış ve dist. su ile iki kez yıkanmıştır. Elde

edilen çökelti (0.45 g hücre) 250 mL'lik bir erlen içerisinde 30 mL altın solusyonuna ilave edilerek düşük hızda (dak'da 50 vuruş) 1 saat süreyle ajite edilmiştir. Daha sonra hücreler solusyondan ayrılıp solusyonun altın içeriğine bakılmıştır.

Tutuklanmış hücrelerle yapılan işlemde serbest hücreler yerine 8 g aljinat taneciği kullanılmış, yine 60 dak. lık bir ajitasyondan sonra solusyonun Whatman No.1 kağıdından süzülmesi yoluyla tanecikler uzaklaştırılmıştır. Aljinat tanecikleri de adsorbant teşkil edeceğinden, taneciklere bağlanan altın miktarının belirlenebilmesi için aynı deneyler boş aljinat tanecikleri ile de tekrarlanmıştır.

Sonuçlar Tablo II.8'de verilmektedir. Serbest K. marxianus hücreleri tarafından altın biyosorpsiyonu % 53.5 seviyesindedir. Immobilize hücrelerle bu değer % 90'a yükselmektedir. Ancak, boş taneciklerle yapılan kontrol deneyi bunun % 40'ının gerçekte polimerik matrikse bağlandığını, kalan % 50 seviyesindeki bağlanmanın immobilize hücrelerle sağlandığını göstermektedir.

Başlangıç metal konsantrasyonu (mg/mL)	Hücrelere bağlanan metal (mg/ml)			Desorbe olan metal (mg/ml)			Yüzey Bağlanma (%)					
	Cu	Ag	Cd	Cu	Ag	Cd	Cu	Ag	Cd			
<u>K. marxianus</u>	0.033	0.050	0.053	0.016	0.046	0.031	0.0013	0.0008	0.00075	3.94	1.6	1.4
<u>S. cerevisiae</u>	0.033	0.012	0.006	0.02	0.0039	0.0035	0.001	- ^a	0.00013	3.0	nd	2.17

^a ölçüm limitinin altındadır.

Tablo II.4. K. marxianus ve S. cerevisiae'da EDTA ile desorpsiyon yapılarak belirlenen "yüze metal bağlanma" değerleri

Organizma	Cu başlangıç konsantrasyonu (mg/ml)	Hücrelere bağlanmayan Cu (mg/ml)	Debris içindeki Cu (mg/ml)	Sitozol içindeki Cu (mg/ml)	Sitozol içindeki Cu (hücrelere bağlı Cu'nun %si)
<u>K. marxianus</u>	0.24 (100)	0.010 (41.7)	0.013 (54.2)	0.00088 (3.7)	6.4
<u>S. cerevisiae</u>	0.024 (100)	0.0113 (47.1)	0.011 (45.8)	0.0017 (7.1)	13.4

Tablo II.5. Bakırın K. marxianus ve S. cerevisiae hücrelerinde sitozol ve debrisdeki dağılımı. parantez içindeki değerler bakırın % dağılımını göstermektedir.

Organizma	Ag başlangıç konsantrasyonu (mg/ml)	Hücrelere bağlanmayan Ag (mg/ml)	Debris içindeki Ag (mg/ml)	Sitozol içindeki Ag (mg/ml)	Sitozol içindeki Ag (hücrelere bağlı Ag'nin %'si)
<u>K. marxianus</u>	0.0114(100)	0.0007(6.14)	0.010(87.7)	0.00053(4.65)	5
<u>S. cerevisiae</u>	0.0009(100)	0.00055(61.1)	0.00028(31.1)	0.00007(7.8)	20

Tablo II. 6. Gümüşün K. marxianus ve S. cerevisiae hücrelerinde sitozol ve debrisdeki dağılımı. Parantez içindeki değerler gümüşün % dağılımını göstermektedir.

Organizma	Cd başlangıç konsantrasyonu (mg/ml)	Hücrelere bağlanmayan Cd (mg/ml)	Debris içindeki Cd (mg/ml)	Sitozol içindeki Cd (mg/ml)	Sitozol içindeki Cd (hücrelere bağlı Cd'nin %'si)
<u>K. marxianus</u>	0.0112 (100)	0.00805 (71.8)	0.031 (27.7)	0.00006(0.54)	2
<u>S. cerevisiae</u>	0.00245 (100)	0.00195 (78)	0.00053 (21.2)	0.00002 (0.8)	3.6

Tablo II.7. Kadmiyumun K. marxianus ve S. cerevisiae hücrelerinde sitozol ve debrisdeki dağılımı. Parantez içindeki değerler kadmiyumun % dağılımını göstermektedir.

Tablo II. *Ø. K. marxianus*'un serbest ve immobilize hücreleri ile altının solusyondan geri kazanımı.

	Solusyonda kalan altın miktarı (g/30 ml)	Altın geri kazanımı (%)
Serbest hücreler	0.010	53.5
Aljinata tutuklanmış hücreler	0.0023	89.3
Hücretsiz aljinat tanecikleri (kontrol)	0.013	39.5
Hücrelerle veya aljinatla işlem görmemiş altın solusyonu (Kontrol)	0.0215	0

BÖLÜM III

SONUÇ

III.1. Tartışma

Ağır metaller, her yıl giderek artan miktarlarda çeşitli kaynaklardan çevreye karışmakta ve organik kimyasalların yarattığından daha önemli bir toksisiteye neden olmaktadır. Ağır metalleri çözünür formda içeren atıkların arıtılmasında, bu metallerin mikroorganizmalarca biriktirilmesi hem pahalı, hem de çoğunlukla etkin olmayan fiziksel/kimyasal teknolojilere iyi bir alternatif oluşturmakta; bu nedenle de çeşitli mikroorganizmaların ağır metal dirençliliğinin ve ilgili mekanizmaların anlaşılması önem kazanmaktadır (Brierley, 1983). Bölüm I'de de söz edildiği gibi, mikroorganizmalar tarafından ağır metal biriktirilmesinin bir diğer önemli uygulaması maden ve metalurji atıklarından metallerin geri kazanılmasıdır. Tüm bu nedenlerle, son yıllarda bu yönde çalışmalara ağırlık verilmiştir. Mayalar ve diğer fungusların ağır metal biriktiriminde en etkin mikroorganizmalar olarak ilgili biyoteknolojik uygulamalar için daha uygun oldukları kabul edilmektedir (Huang ve ark., 1990).

Maya-metal etkileşimi konusunda S. cerevisiae en fazla çalışılmış tür olup yapılan çalışmaların çoğu moleküler biyologlar tarafından ve CUP 1 lokusu (MT geni) üzerinedir. S. pombe, N. crassa ve C. glabrata gibi mayalarda da, MT ve diğer düşük molekül ağırlıklı peptidlerin sentezi üzerine çalışmalar yapılmıştır. (Butt ve Ecker, 1987, Zhou ve Thiele, 1991). Bugüne değin, adı geçen mayalar dışında hiçbir maya türü ile ağır metal etkileşimi çalışılmamıştır. Bu nedenle, şimdiki çalışmamızda bir diğer maya türü olan K. marxianus'da ağır metal toleransı, metal biriktirme kapasitesi ve metallerle

indüklenen düşük molekül ağırlıklı proteinlerin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmamızda, K. marxianus'un, metallere etkileşimi bakımından kendisine taksonomik olarak oldukça yakın bir tür olan S. cerevisiae'dan önemli farklılıklar gösterdiğini belirlemiş bulunuyoruz. Ayrıca S. cerevisiae ile yapılmış daha önceki çalışmalarda bakır ve kadmiyuma ağırlık verilmiş olup diğer metallere tolerans gösterilen konsantrasyonları ve bunların hücrelerce bağlanma profilleri ilk kez bu çalışmada rapor edilmektedir.

Çalışmamız, maya türlerinin ağır metalleri giderek artan konsantrasyonlarda içeren SC agar plaklarına ekilmesi yoluyla gerçekleştirilen ön plak testleri ile başlatılmıştır. K. marxianus ve K. fragilis için çeşitli metallere minimum inhibe edici konsantrasyonlarının (MIC) S. cerevisiae'nin CUP 1^R bir suşu ile elde edilen değerlerden oldukça yüksek olduğu bulunmuştur, bu da bu türlerin ağır metallerle uyumluluklarının S. cerevisiae'den daha iyi olduğunu göstermiştir. Gözlenen dirençlilikte MT'nin rolü olabileceği gözönünde tutularak MT geninin bir indüktörü olan bakır, CuSO₄ formunda (10 µM) diğer metallere yanısıra besi ortamlarına katıldığında MIC değerleri her iki organizma için de hiçbir değişme göstermemiştir. Bu da, besi ortamı komponentlerinin bakırı hali hazırda eser miktarlarda içerdiğini, bu miktarların ise MT indüksiyonu için yeterli olabileceğini düşündürmüştür.

Metallerin giderek artan konsantrasyonlarını içeren sıvı kültürlerde üreme hızı ve miktarı değerleri, ön plak testleri ile uyum içinde olup K. marxianus'un metallere yüksek konsantrasyonlarında rahatlıkla üreyebildiğini göstermiştir. Diğer yandan MIC değerlerinin plak testlerinde daha yüksek olarak bulunması, metal içeren plakların 3 gün gibi uzun bir süre inkübe edilmesi, bu sürede de dirençli klonların ortaya çıkması şeklinde açıklanabilir. Inkübasyon periyodunun 3 gün olarak seçilmesinin nedeni, daha önce yapılmış

benzer çalışmalarda bu sürenin kullanılmış olmasıdır (Hamer ve ark., 1985, Butt ve ark., 1988). 16 saat süreyle üretilen sıvı kültürlerden elde edilen bulgular, bu anlamda organizmaların direnç kalıplarını daha doğrudan yansıtmaktadır.

Bakır konsantrasyonundaki kademeli artışlara dirençli klonların seleksiyonunu içeren deneylerde K. marxianus'un 15 mM CuSO₄'a, S. cerevisiae'nin ise 10 mM CuSO₄'a dirençli suşları elde edilmiş, bu suşlar AgNO₃ ve Cd(NO₃)₂'ün çok yüksek konsantrasyonlarında da üreyebilmişlerdir. Fogel ve Welch (1982) tarafından işaret edildiği üzere, tip klonların ortaya çıkışı CUP 1 lokusunun muhtemelen amplifiye olduğunu düşündürmektedir. Çok dirençli olmalarına karşın, elde ettiğimiz klonların metal biyosorpsiyonu deneylerinde kullanılmaları tercih edilmemiş, standard suşların metallerle etkileşiminin anlaşılması ve fizyolojik olarak tanımlanmasının temel bilimler açısından daha önemli olduğu düşünülmüştür.

K. marxianus'da MT'in varlığı protein profili analizleri ile gösterilmiş, ancak bu proteinin S. cerevisiae'dan farklı olarak konstitütif olduğu; bakır ve gümüş ile indüklenmediği bulunmuştur. Bu organizmada gümüş ve kadmiyum ile indüklenen ve MT'den küçük bir diğer proteinin varlığı da ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. MT'den farklı, fitokelatin (kadistin) grubuna giren ve kadmiyum bağlayan peptidlerin varlığı Schizosaccharomyces pombe (Murasugi ve ark., 1981; Murasugi ve ark., 1985), Phaeodactylum tricornutum (Maita ve Kawaguchi, 1989), Chlorella ellipsoides (Maita ve Kawaguchi, 1982), Euglena gracilis (Weber ve ark., 1987) ve Pseudomonas putida (Higham ve ark., 1984) gibi organizmalarda gösterilmişti. K. marxianus'da bulduğumuz Ag ve Cd ile indüklenen peptidin ise yapısı ve bu metallerle olası etkileşimi daha ileri çalışmalarla gösterilmelidir.

MT molekülünün O₂'e duyarlılığı ve alışılmadık amino asit dizisi, bu proteinin teşhisini zorlaştırmakta, bu nedenle teşhisi ve miktarının belirlenmesinde dolaylı yöntemler kullanılmaktadır. Okside olması nedeniyle bu proteinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılamamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda SDS içermeyen jeller kullanılmıştır. MT'in teşhisi için başvurulmuş yöntemlerde genellikle ²⁵S-sistein ile işaretlenmiş protein otoradyografi ile belirlenmiş (örneğin Hamer ve ark., 1985; Burka ve ark., 1988), miktarının belirlenmesi ise bağlı Cu iyonlarının atomik absorpsiyon spektroskopisi ile ölçülmesi yoluyla dolaylı olarak yapılmıştır. (Winge ve ark., 1985; Weser ve Hartmann, 1991). Protein aromatik amino asit içermediğinden, protein bantlarının gözlenebilmesinde jeller Coomassie Blue ile boyanamamakta olup gümüş boyama tek alternatiftir. Ancak, birçok gümüş boyama protokolü (örneğin Blum ve ark., 1987) çeşitli steplerde (fiksasyon gümüşle muamele ve renk oluşumu) kullanılan solusyonlara formaldehitin de katılmasını öngörmektedir. Birçok araştırmacı, gümüş boyama sonrası MT'e karşılık gelen protein bandı için tekrarlanabilir sonuçlar alamadıklarından otoradyografi yöntemini tercih etmişlerdir. Laboratuvarımızda SDS içermeyen jellerin boyanmasında kullanılan yöntem Khan (1989) tarafından adapte edilmiş olup renk oluşumu dışındaki steplerde formaldehit kullanılmamaktadır. Kanımızca bu sayede proteinin oksidasyonu minimize edilerek çalışmamızda MT'e karşılık gelen bantın gözlenmesinde sorun olmamıştır. Hem bu sebeple, hem de laboratuvarımızda radyoaktivite kullanmayı tercih etmememiz nedeniyle proteinin radyoaktif işaretlenmesi ve X-ray filmleriyle teşhis edilmesi yoluna gidilmemiştir.

1988'e dek, *S. cerevisiae*'da MT geni transkripsiyonunun sadece Cu ile indüklendiği kabul edilmiştir. Daha sonraları Thiele (1988) ve Welch ve ark.

(1989) ACE 1 transkripsiyon faktörünün Cu ve Ag (grup 1b geçiş elementleri) ile aktive edildiğini göstermişlerdir. S. cerevisiae MT sentezinin bu iki metalle indüksiyonu çalışmamızda da doğrulanmıştır.

S. cerevisiae hücrelerinin Cd ile muamelesi MT'e karşılık gelen bandın kalınlığında bir artışa neden olmuştur. Cd'in MT'i indüklediği bilinmektedir. Diğer yandan S. cerevisiae'nın Cd'a dirençli bir izolatından kimyasal özellikleri Cu-MT'e çok benzeyen, kromozom IV üzerinde yer alan, cad 1 geni ile kodlanan ve "Cd-MT" adı verilen bir proteinin izole edilmiş olduğu (Tohayama ve ark., 1990) gözönüne alındığında, çalışmamızda kullanılan S. cerevisiae UCD 552 suşunun da Cd-MT üretebildiği sonucuna varılmıştır.

S. cerevisiae CUP 1 geninin Kluyveromyces lactis'de ifade edildiği, ancak ifadenin bu organizmada konstitütif olduğu rapor edilmişti (Macreadie ve ark., 1991). Kluyveromyces MT'in konstitütif sentezlendiği ise ilk kez laboratuvarımızca bildirilmişti (Özcengiz ve ark., 1991). Aynı yıl rapor edilen bu iki olgu birbirini desteklemektedir. Macreadie ve ark (1991), S. cerevisiae CUP 1 geninin K. lactis'deki konstitütif ifadesini tartışırken K. lactis'in kendi CUP1 geni ile S. cerevisiae CUP 1 geni promotorlarının nükleik asit dizileri arasındaki ve/veya K. lactis'in ve S. cerevisiae'nın ACE 1 proteinleri arasındaki olası farklılıkları esas almışlardır. Çalışmamızda K. marxianus'un kendi CUP 1 geninin konstitütif ifadesini göstermiş olduğumuzdan ilk olasılık daha geçerli olmaktadır. Şimdilik Kluyveromyces promotorlarına ilişkin çok az literatür bilgisi mevcuttur. K. marxianus CUP 1 geni ve promotorunun izolasyonu ve analizini bu açıdan da çok yararlı olacaktır.

Hücrelerde metal biriktirilmesi deneyleri sonuçları, K. marxianus'un ağır metallere yalnızca tolerans göstermediğini, fakat Cu, Ag, Cd gibi önemli

ağır metalleri etkin bir biçimde bağlayabildiğini göstermiştir. Bu maya aktif üreme fazının sonuna dek AgNO_3 (0.5 mM) 'in % 90'ını, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (0.25 mM)'in % 60'ını besiyerinden toplamıştır. CuSO_4 biriktirilmesinde ise sadece % 5'lik bir farkla *S. cerevisiae* daha etkindir. Her iki organizmada da Co, Zn ve Mn akümüülasyonu % 10'un altında kalmış, bu da bu metallerle karşı gözlenen yüksek toleransın metallerin hücrelerden uzak tutulması yoluyla sağlandığına işaret etmiştir.

24 saatlik kültürlerde hücrelere bağlı metal miktarlarının hafifçe düşmesi, yaşlı kültürlerde metal ve makromoleküller arasındaki etkileşimin azalması ve/veya hücrelerin lizize uğraması ile açıklanabilir.

Bölüm I'de değinildiği gibi, mikroorganizmalar tarafından metallerin konsantre edilmesinde yer alan iki esas mekanizmadan biri metallerin hücre yüzeyine bağlanması (oldukça hızlıdır ve bağlanan miktar fazladır), diğeri ise hücre içine alınmasıdır (yavaştır ve enerji gerektirir). Bu mekanizmaların göreceli rollerine ilişkin kantitatif bilgileri içeren çalışmalar maalesef oldukça azdır. Huang ve ark. (1990), canlı maya hücrelerinin absorbe ettiği toplam 30 $\mu\text{mol/g}$ Cu'in 7 $\mu\text{mol/g}$ 'inin hücre içinde bulunduğunu rapor etmişti. Ancak bu araştırmacılar maya hücrelerini asit veya alkol muamelesi ile öldürüp ölü hücrelerin metal içeriği ile canlı hücrelerinkini karşılaştırmışlar, aradaki farkı hücre içi metal içeriği olarak değerlendirmişlerdir. Kendilerinin de belirttiği gibi asit veya alkol uygulamasının hücre yüzeyinde mevcut çeşitli kanyonları veya organik bileşikleri uzaklaştırıp metaller için yeni bağlanma bölgeleri açmaları, bu nedenle de yüzey bağlanmanın gerçekte olabileceğinden daha yüksek bir seviyede bulunması olasılığı güçlüdür. Çalışmamızda EDTA ile desorbe edilen metallerin konsantrasyonunun hücrelerde kalan miktarla karşılaştırılması, metallerin hücrelere bağlı miktarlarının sadece % 2-7'sinin

hücre yüzeyinde olduğu sonucunu vermiştir. Huang ve ark. (1990) tarafından bildirilen % 75'lik bir yüzey bağlanmanın çok altında olan bu değerler daha ziyade EDTA uygulamasının metallerin desorbe edilmesinde yetersiz kaldığını düşündürmüştür. Sitozol ve hücre debrisinin metal içeriğinin karşılaştırıldığı deney sonuçları bu düşünceyi desteklemiştir; hücreye bağlı metallerin çok önemli bir bölümü çözünür olmayan fraksiyonda bulunmuştur. Sitozo'deki metal içerikleri bakımından karşılaştırdıklarında, K. marxianus'a kıyasla daha az metal biriktiren S. cerevisiae'da MT'e bağlı metal miktarının daha fazla oluşu ilginç bir bulgudur. Örneğin; K. marxianus besiyerinde mevcut $AgNO_3$ 'ün % 92.3'ünü akümüle edebilmiş, ancak bu miktarın sadece % 5'i çözünür sitoplazmada bulunmuştur. S. cerevisiae'da ise akümüle edilen metal miktarı sadece % 39 iken, bunun % 20'si (yarısı) çözünür sitoplazmadadır. Tüm bunlar, S. cerevisiae'da MT sisteminin çok daha aktif olduğunu göstermektedir.

Metallerin sitozolden ziyade debriste bulunduğu durumlarda araştırmacılar bunu doğrudan "hücre duvarına bağlanma" şeklinde nitelendirmektedirler. Örneğin, Pleurotus ostratus'a bağlanan toplam Cd'in % 20'si sitozolde görülmüş, yazarlar bu organizmanın metal toleransında ana mekanizmanın hücre duvarına bağlanma olduğuna karar vermişlerdir (Favero ve ark., 1991). Pb, Al, Th ve U gibi metallerin biriktirilmesinde ana mekanizma yüzeye bağlanma olup bu metaller hücre içine alınmazlar. Diğer ağır metallerin S. cerevisiae 'da hücre içi lokalizasyonu Kunst ve Roomans (1985) tarafından X-ray mikroanalizi ile araştırılmış ve metal iyonlarının vakuoller içerisinde yer alan polifosfat granüllerine bağlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle, debris fraksiyonunun metal içeriğinin sadece duvar bağlanması ile açıklanmasının pek doğru olmayacağı düşüncesindeyiz. Araştırma sonuçlarımız şimdilik MT'e bağlı metal miktarı ile duvara ve vakuollere bağlı (çözünür olmayan materyale bağlı) metal miktarı arasında bir karşılaştırma yapmamıza olanak vermektedir.

Altın platin, gümüş gibi değerli metallerin solusyonlardan biyosorpsiyon yoluyla geri kazanımı son yıllarda büyük ilgi çekmiş çalışmalar özellikle altın üzerine yoğunlaştırılmıştır (Hosca ve ark., 1981; Greene ve ark., 1986; Costa ve Leite, 1991). Ancak bu çalışmaların tümünde Chlorella türleri (algler) kullanılmış olup diğer mikroorganizmaların altın biyosorpsiyonu potansiyelleri hakkında bir bilgi yoktur. K. marxianus'un Cu, Ag ve Cd gibi ağır metalleri biriktirmede yüksek potansiyeli olduğu gözönüne alınarak altın geri kazanımındaki etkinliği araştırılmıştır. İmmobilize hücrelerle yapılan çalışmalarda, sonuçların daha önce rapor edilenlerle karşılaştırılabilmesi için aynı matriksin, sodyum aljinat jelinin kullanılması tercih edilmiştir K. marxianus hem serbest, hem de tutuklanmış durumda, C. homosphaera ile aynı oranda altın biriktirmiştir (Costa ve Leite, 1991). % 90 seviyesinde toplanan altının % 40'ünün aljinik matriks tarafından absorbe edildiği, kalan % 50'nin ise maya hücreleri tarafından bağlandığı bulunmuştur. Metalin polimer tarafından absorbe edilmesi uygulama açısından sorun oluşturmamaktadır, çünkü sonraki aşama uygun bir elusyon solusyonu kullanmak suretiyle bağlı altının hem hücrelerden, hem de polimerden ayrılmasını içerecektir. Dilue mineral veya organik asitler, karbonatlar, EDTA, tiyoüre gibi kimyasallar metallerin selektif desorpsiyonunda biyokütleye zarar vermeksizin kullanılacak eluantlar olarak tavsiye edilmişlerdir (Darnall ve ark., 1986; Macaskie ve Dean, 1989; Gadd, 1990). Metal biriktirilmesinde hücre içine alımın önemli bir rol oynadığında, metallerin geri kazanımı için hücrelerin parçalanması (örneğin kuvvetli asit veya alkali uygulaması ile) gerekmektedir (Hosea ve ark. 1986). Altın biriktirilmesi sadece hücre yüzeylerinde gerçekleştiğinden hücreleri parçalamaksızın bu metali kolaylıkla geri kazanmak mümkündür.

Araştırma sonuçları genel olarak ele alındığında, K. marxianus'un ağır metal toleransı ve biriktirilmesi hususlarında şimdiye dek çalışılmış pek çok mikroorganizmadan üstün olduğu ve Au, Ag, Cd ve Cu gibi metallerin endüstriyel atık veya solusyonlardan biyosorpsiyonunda etkin bir şekilde kullanılabilceği ortaya çıkmaktadır.

III. 2. Öneriler

- K. marxianus'da Ag ve Cd ile indüklenen peptidin yapısal olarak tanımlanması ve bu metallerle etkileşiminin gösterilmesi yönünde daha ileri moleküler çalışmalara gereksinim vardır.
- Ardışık transferlerle seçilen ve metallerin çok yüksek miktarlarına dirençli klonların metal biyosorpsiyonu kapasiteleri belirlenmeli ve standard suşlarla karşılaştırılmalıdır.
- Çeşitli eluvantlar denenmek suretiyle metallerin K. marxianus'dan desorpsiyonu araştırılmalı, optimum koşullar belirlenmelidir. Bu çalışmalar, K. marxianus ile özellikle metallerin geri kazanılması yönünde yapılabilecek uygulamalar hakkında daha detaylı bilgi verecektir.
- Tutuklanmış hücre sistemlerinin ticari uygulamalardaki çeşitli üstünlükleri gözönüne alındığında, Ag, Cd ve Cu biyosorpsiyonu deneylerinin tutuklanmış K. marxianus hücreleri ile tekrarlanması oldukça yararlı olacaktır.
- Elde edilen bulgular ışığında uygun reaktör dizaynına gidilerek çalışmaların bu yöne kaydırılması da öneriler arasındadır.

KAYNAKLAR

- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Kagakusha Ltd., Tokyo, (1977).
- Berka, T., Shatzman, A., Zimmerman, J., Strickler, J. and Rosenberg, M. Efficient Expression of the Yeast Metallothionein Gene in Escherichia coli. J. Bacteriol. 170, 21-26, (1988).
- Beveridge, T. J. and Fyfe, W. S. Metal Fixation by Bacterial Cell Walls. Con. J. Earth Sci. 22, 1993-1989, (1985).
- Bhatnager, N. B. Molasses Induced Changes in Saccharomyces cerevisiae : Alterations in Plasma Membrane Structure and Function and Metallothionein Levels, Biochem. Int., 22, 781-790.
- Bianchi, M. E., Carbone, M. L. and Lucchini, G. Mn²⁺ and Mg²⁺ Uptake in Mn-sensitive and Mn-resistant Yeast Strains. Plant Sci. Lett. 22, 345-352, (1981).
- Blum, H., Bier, H. and Gress, H. J. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8, 93-99, (1987).
- Boulanger, Y., Goodman, C. M., Forte, C. P., Fesik, S. W. and Armitage, I. M. Model for Mammalian Metallothionein Structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1501-1505, (1983).

- Brierley, J. A., Biological Accumulation of Some Heavy Metals-Biotechnological Applications. In: "Biominalization and Biological Metal Accumulation". Eds. Westbroek, P. and Jong., (1983), pp:499-509.
- Brierley, C. L., Kelly, D. P., Seal, K. J. and Best, D. J. Materials and Biotechnology. In: Biotechnology, Blackwell Scientific Publ., Oxford, (1985), pp: 163-212.
- Brierly, J. A., Goyak, G. M. and Brierley, C. L. Considerations for Commercial Use of Natural Products for Metals Recovery. In: Immobilization of Ions by Biosorption, Ellis Horwood, Chichester, (1986). pp: 105-117.
- Butler, G., Thiele, D. J. Ace2 and Activator of Yeast Metallothionein Expression which is Homologous to SW15, Mol. Cell. Biol., 11, 476-485, (1991).
- Butt, T. R., Strenberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D. Copper Metallothionein of Yeast, Structure of the Gene, and Regulation of Expression, Proc. Natl. Sci. USA, 81, 3332-3336, (1984).
- Butt, T. R., Ecker, D. J. Yeast Metallothionein and Applications in Biotechnology, Microbiol. Reviews, 51, 351-364, (1987).
- Cismowski, M. J., Huang, P. C. Effect of Cysteine Replacements at Positions 13 and 50 on Metallothionein Structure, Biochemistry, 30, 6626-6632, (1991).
- Costa, A. C. A., Leite, S. G. F.. Metal Biosorption by Sodium Alginate Immobilized Chlorella homosphaera, Biotechnol. Lett., 13, 559-562, (1991).

- Dameron, C. T., Winge, D.R., George, G. N., Sansone, M., Hu, S., Hamer, D. A. Copper-Thiolate Cluster in the ACE1 Transcription Factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6127-6131, (1991).
- Darnal, D. W., Greene, B., Henzl, M. T., Hosea, J. M., McPherson, R. A., Sneddon, J., Alexander, M. D., Selective Recovery of Gold and Other Metal Ions From an Algal Biomass, Environ. Sci. Technol., 20, 206-208, (1986).
- Ecker, D. J., Butt, T. R., Sternberg, E. J., Neepser, M. P., Debouck, C., Gorman, J. A. and Crooke, S. T. Yeast Metallothionein Function in Metal Detoxification. J. Bio. Chem. 261, 16895-16900, (1986).
- Ecker, D. J., Butt, T. R., Crooke, S. T. Yeast Metallothionein: Gene Function and Regulation by Metal Ions, In: Biological Systems. Interrelations Among Metal Ions, Enzymes and Gene Expression, Ed. Sigel, H. and Siger, A. Marcel Delikan Inc. Vol. 25, pp: 147-169, (1987).
- Favero, N., Costa, P., Massimino, M. L. In vitro Uptake of Cadmium by Basidiomycetes Pleurotus ostreatus, Biotechnol. Lett., 13, 701-704, (1991).
- Fogel S., Welch, J. W. Tandem Gene Amplification Mediates Copper Resistance in Yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5342-5346, (1982).
- Furey, W. F., Robbins, A. H., Clancy, L. L., Winge, D. R., Wang, B. C. and Stout, C. D. Crystal Structure of Cd, Zn Metallothionein. Science. 231, 704-710, (1986).
- Gadd, G. M. The uptake of Heavy Metals by Fungi and Yeasts: the Chemistry and Physiology of the Process and Applications for Biotechnology. In:

- Immobilization of Ions by Biosorption, Ellis Horwood, Chichester, (1986).
pp: 135-147.
- Gadd, G. M. Accumulation of Metals by Microorganisms and Algae. In:
Biotechnology-A Comprehensive Treatise. VCH Verlagsgesellschaft,
Weinheim, Vol. 6b (1988), pp: 401-433.
- Gadd, G. M. and White, C. Heavy Metal and Radionuclide Accumulation and
Toxicity in Fungi and Yeasts. In: Metal-Microbe Interactions. IRL press,
Oxford, (1989), pp: 19-38.
- Gadd, G. M. Heavy Metal Accumulation by Bacteria and Other Microorganisms,
Experientia, 46, 285-286, (1990).
- Galu, M., Keller, P., Malki, D. Removal of Uranium (VI) from Solution by Fungal
Biomass and Fungal Wall-Related Biopolymers, Science, 219, 285-286,
(1983).
- Gralla, B. E., Thiele, D. J., Silar, P., Valentine, J. S. ACE1, a Copper-Dependent
Transcription Factor, Activates Expression of the Yeast Copper, Zinc
Superoxide Dismutase Gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8558-8562,
(1991).
- Greene, B., Hosea, M., McPherson, R., Henzi, M., Alexander, M. D., Darnall, D. W.
Interaction of Gold(I) and Gold(III) Complexes with Algal Biomass, Environ
Sci. Technol., 20, 627-632, (1986).
- Hamer, D. H. Metallothionein Ann Rev Biochem. 55, 913-951, (1986).

- Han, N. S., Seo, J. H., Chung, Y. C. Growth and Copper Resistance of Recombinant Saccharomyces cerevisiae Containing a Metallothionein Gene, Biotechnol. Lett., 14, 7-11, (1992).
- Hartmann, H. J., Weser, U. Cobalt-(Cysteiny1)4-Tetrahedra in Yeast Cobalt(II)-Thionein, Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 277-282, (1985).
- Henderson, R. C. A., Cox, B. S. and Tubb, R. The Transformation of Brewing Yeasts with a Plasmid Containing the Gene for Copper Resistance, Curr. Genet. 9, 133-138, (1985).
- Higham, D. P., Sadler, P. J. Cadmium-Resistant Pseudomonas putida Synthesizes Novel Cadmium Proteins, Science, 225, 1043-1046, (1984).
- Hosea, M., Greene, B., McPherson, R., Henzi, M., Alexander, M. D., Darnall, D. W. Accumulation of Elemental Gold on the Algae Chlorella vulgaris, Inorg. Chim. Acta., 123, 161-165, (1986).
- Huang, C. P., Westman, D., Quirk, K. Huang, J. P. The Removal of Cadmium(II) from Dilute Aqueous Solutions by Fungal Adsorbent, Wat. Sci. Tech., 20, 369-376, (1988).
- Huang, C. P., Huang, C. P., Morehart, A. L. the Removal of Cu(II) from Dilute Aqueous Solutions by Saccharomyces cerevisiae, Wat. Res., 24, 433-439, (1989).

- Huibregtse, J. M., Engelke, D. R., Thiele, D. J. Copper-Induced Binding of Cellular Factors to Yeast Metallothionein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 65-69, (1989).
- Hunziker, P. E. and Kagi, J. H. R. Metallothionein. In: Metallothionein. (Part 2.) Harrison, P. M. (ed) Verlag Chemie, Weinheim, (1985).
- Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A. and Brierley, C. L. Microorganisms in Reclamation of Metals; Annu. Rev. Microbiol., 40, 311-336, (1986).
- Inouhe, M., Hiyama, M., Tohyama, H., Joho, M., Murayama, T. Cadmium-binding Protein in a Cadmium-Resistant Strain of Saccharomyces cerevisiae, Biochem. Biophys. Acta, 993, 51-55, (1989).
- Karin, M. Metallothioneins: Proteins in Search of Function, Cell, 41, 9-10, (1985).
- Kagi, J. H. R. and Schaffer, A. Biochemistry of Metallothionein, Biochemistry 27, 8509-8515, (1988).
- Kaya, M. Almet Metal End. Tic. A., S. Kalite Kontrol Talimat El Kitabı, p: 130-131, Ankara, Adopted from Schlotter Analysis Handbook, 4th Ed., (1985) and Hard Bright Gold Bath Orima B Data Sheet.
- Kelly, D. P., Norris, P. R. and Brierly, C. L. Microbiological Methods for the Extraction and Recovery of Metals. In: Microbial Technology: Current State. Future Prospects, Cambridge University Press, Cambridge, (1979), pp: 263-308.

- Khan, M. I. Personal Communication (Centre for Advanced Molecular Biology, Punjab University, Lahore), (1989).
- Kunst, L. and Roomans, G. M. Intracellular Localization of Heavy Metals in Yeast by X-ray Microanalysis, Scan. Electron Mic., 1, 191-199, (1985).
- Lerch, K. Copper Metallothionein, a Copper Binding Protein from Neurospora crassa, Nature, 184, 368-370, (1980).
- Macaskie, L. E., Dean, A. C. R. Cheetham, A. K., Jakeman, R. J. B. and Skarnulis, J. Cadmium Accumulation by a Citrobacter sp: The Chemical Nature of the Accumulate Metal Precipitate and Its Location on the Bacterial Cells, J. Gen. Microbiol., 133, 539-544, (1987.a.).
- Macaskie, L. E., Wates, J. M. and Dean, A. C. R. Cadmium Accumulation by a Citrobacter sp Immobilized on Gel and Solid Supports: Applicability to the Treatment of Liquid Wastes Containing Heavy Metal Cations, Biotechnol. Bioeng., 30, 66-73, (1987. b.).
- Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R. Use of Immobilized Biofilm of Citrobacter sp. for the Removal of Uranium and Lead from Aqueous Flows, Enzyme Microb. Technol., 9, 2-4, (1987 b).
- Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R., Microbial Metabolism, Desolubilization, and Deposition of Heavy Metals: Metal Uptake by Immobilized Cells and Application to the Detoxification of Liquid Wastes. In: Biological Waste Treatment, Mizrahi, A(ed.), Alan R. Liss Inc., New York, (1989).

- Macreadie, I. G., Horaitis, O., Vaughan P. R. and Desclark-Walker, G. Constitutive Expression of the Saccharomyces cerevisiae CUP1 Gene in Kluyveromyces lactis. Yeast. 7, 127-135, (1991).
- Maita, Y. and Kawaguchi, S. Amino acid Composition of Cadmium-binding Protein Induced in a Marine Diatom, Phaeodactylum tricornutum. Bull. Environ Contam Toxicol., 43, 394-401, (1989).
- Minagawa, T., Yanagishima, N.; Arakatsu, Y., Nagasaki, S. and Ashida, J. The Adaptation of Yeast to Copper(II). The Yeast Nucleic Acid Fraction Counteracting the Inhibition of Yeast Growth by Copper. Botan. Mag., 64, 65-73, (1951).
- Mowll, J. L., Gadd, G. M. Zinc Uptake and Toxicity in the Yeast Sporobolomyces roseus and Saccharomyces cerevisiae J. Gen. Microbiol. 129, 3421-3425, (1983).
- Mowll, J. L., Gadd, G. M. Cadmium Uptake by Aureobasidium pullulans. J. Gen. Microbiol., 130, 279-284, (1984).
- Murasugi, A., Wada, C., Hayashi, Y. Cadmium-binding Peptide Induced in Fission Yeast, Schizosaccharomyces pombe. J. Biochem. 90, 1561-1564, (1985).
- Munger, K., Lerch K. Copper Metallothionein from the Fungus Agaricus bisporus Chemical and Spectroscopic Properties, Biochemistry. 24, 6751-6756, (1985).

- Nakajima, A. and Sakaguchi, T. Selective Accumulation of Heavy Metals by Microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 59-64, (1986).
- Narula, S. S., Mehra, R. K., Winge, D. R., Armitage, I. M. Establishment of the Metal-to-Cysteine Connectivities in Silver-Substituted Yeast Metallothionein, J. Am. Chem. Soc., 113, 9354-9358, (1991).
- Nemer, M. Wilkinson, D. G. Travaglini, E. C., Sternberg, E. J. and Butt, T. R. Sea Urchin Metallothionein Sequence: Key to an Evolutionary Diversity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4992-4994, (1985).
- Nielson, R. B. Atkin, C. L. and Winge, D. R. Distinct Metal-binding Configurations in Metallothionein, J. Biol. Chem., 260, 5342-5350, (1985).
- Olafson, R. W., Loya, S. Sim, R. G. Physiological Parameters of Prokaryotic Metallothionein Induction, Biochem. Biophys. Res. Communication, 95, 1495-1503, (1980).
- Paton, W. H. N., Budd, K. Zinc Uptake in Neocosmospora vasinfecta. J. Gen. Microbiol., 72, 173-184, (1972).
- Premakumar, R., Winge, D. R., Wiley, R. D. and Rajogpalan, K. V. Copper Chelatin Isolation from Various Eucryotic Sources, Arch Biochem. Biophys., 170, 178-288, (1975).
- Prinz, R. and Weser, U. Naturally-Occurring Cu-Thionenin, J. Physiol. Chem., 356, 767-776, (1975).

- Shatzman, A. R., Kosman, D. J. Characterization of Two Copper-Binding Components of the Fungus Dactylium dendroides, Ach. Biochem. Biophys. 194, 226-235, (1979).
- Sherman, F., Fink, G. R., Lawrence, C. W. and Hicks, W. Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1982).
- Silar, P., Butler, G., Thiele, D. J. Heat-shock Transcription Factor Activates Transcription of the Yeast Metallothionein Gene, Mol. Cell. Biol., 11, 1232-1238, (1990).
- Shumate, S. E. and Strandberg, G. W. Accumulation of Metals Microbial Cells, In: Comprehensive Biotechnology, Vol. 4, Pergamon Press, New York, (1985), pp: 235-247.
- Strandberg, G. W., Shumate, S. E. and Parrott, J. R. Microbial Cells as Biosorbents for Heavy metals: Accumulation of Uranium by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa, Appl. Environ. Microbiol., 41, 237-245, (1981).
- Sugimoto, M., Oikawa, T., Esaki, N., Tanaka, H. and Soda, K. Chemical Synthesis and Expression of Copper Metallothionein Gene of Neurospora crassa. J. Biochem., 104, 924-926, (1988).
- Thiele, D. J. ACE1 Regulates Expression of the Saccharomyces cerevisiae Metallothionein Gene, Mol. Cell. Biol. 8, 2745-2952, (1988).

- Tohoyama, H., Inouhe, M., Joho, M. and Murayama, T. Resistance to Cadmium is under the Control of the CAD2 Gene in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr. Gen., 18, 181-185, (1990).
- Tomney, A. M., Shi, J., Lindsay, W. P., Urwin, P. E. and Robinson, N. J. Expression of the Pea Gene P₂MT_A in E. coli: Metal-Binding Properties of the Expressed Protein, FEBS Lett. 292, 48-52, (1991).
- Weber, D. N., Show, C. F., Postering, D. H. Euglena gracilis Cadmium-Binding Protein-II Contains Sulfide ion, J. Biol. Chem., 262, 6962-6964, (1987).
- Welch, J. W., Fogel, S., Cathala, G. and Karin, M. Industrial Yeasts Display Tandem Generation at the CUP1 Region, Mol. Cell. Bio., 8, 1353-1361, (1983).
- Welch, J. W., Fogel, S., Buchman, C., Karin, M. The CUP2 Gene Product Regulates the Expression of the CUP2 Gene Coding for Yeast Metallothionein, EMBO J., 8, 255-260, (1989).
- Weser, U., Hartman, H. J., Fretzdorf, A., Strobel, G. J. Homologous Copper (I)-(Thiolate)₂-Chromophores in Yeast Copper Thionein, Biochim. Biophys. Acta. 493, 465-477, (1987).
- Whitaker, J. R. and Granum, P. E. An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280 nm, Anal. Biochem., 109, 156-159, (1980).
- White, C., Gadd, G. M. The Uptake and Cellular Distribution of Zinc in Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol., 133, 727-737, (1986).

- Wright, C. F., Hamer, D. H., McKenney, K. Autoregulation of the Yeast Copper Metallothionein Gene Depends on Metal Binding, J. Biol. Chem., 1570-1574, (1987).
- Xue, B. H., Stumm, W., Sigg, L. The Binding of Heavy Metals to Algal Surfaces, Wat. Res., 22, 917-926, (1988).
- Yang, W., Gahl, W., Hamer, D. Role of Heat Shock Transcription Factor in Yeast Metallothionein Gene Expression, Mol. Cell. Biol., 11, 3676-3681, (1991).
- Yasmin, R. Studies on Metallothionein and Ubiquitin-metallothionein Interactions in Saccharomyces cerevisiae. M. Phil. Thesis, Centre for Advanced Molecular Biology, University of Punjab, Lahore, Pakistan, (1989).
- Zhou, P. and Thiele, D. J. Isolation of a Metal-activated Transcription Factor Gene from Candida glabrata by Complementation in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6112-6116, (1991).
- Zsebo, K. M., Lu, H. S., Fieschko, J. C., Goldstein, I., Davis J., Duker, K., Suggs, S. V., Lai, P. H. and Bitter, G. A. Protein Secretion from Saccharomyces cerevisiae Directed by the Prepro- α -factor Lead Region, J. Biol. Chem., 261 5858-5865, (1986).

EK-1
BESİ ORTAMLARININ
KOMPOSIZYONU

1. Laktoz Agar (Rutin ortam)=-

	g/L
Pepton*	20
Maya Özüü*	10
Laktoz	20
Agar(Oxoid)	20

* 800 mL dist. su içinde çözülüp pH 4.5'a ayarlanır ve otoklav edilir. 70oC'ye soğutulduktan sonra laktoz ve agarı içeren ve ayrı otoklav edilmiş 200 mL'lik solusyonla birleştirilir.

2. Sentetik Besi ortamı (SC ortamı):

	g/L
Yeast Nitrogen Base*	67
Glukoz	20
Agar** (Oxoid)	20
Adenin***	0.02
Urasil	0.02
Triptofan	0.02
Histidin	0.02
Arjinin	0.02
Metinoyin	0.02

Tirozin	0.03
Lösin	0.03
İzolösin	0.03
Lizin	0.03
Fenilalanin	0.05
Glutamik asit	0.10
Aspartik asit	0.10
Valin	0.15
Treonin	0.20
Serin	0.375

*filtrasyonla steril edilir.

** katı besiyeri hazırlanacaksa glukoz ile birlikte ayrı otoklav edilir

***adenin, urasil ve aminoasitlerin stok solusyonları ayrı ayrı steril edilirler ve besi ortamına gerekli miktarlarda katılırlar.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TBAG-1010	2- Rapor Tarihi: Ekim 1993
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Eylül 1991 - Eylül 1993	
4- Projenin Adı: <u>Kluyveromyces</u> türü Mayalarda Metal Dirençliliği, Metal Biyosorpsiyonu ve Metal-Bağlanma Proteinlerinin Tanımlanmasına İlişkin Çalışmalar.	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü: Doç. Dr. Gülay ÖZCENGİZ Yard. Araştırmacılar: Prof. Dr. Celal F. GÖKÇAY, Filiz B. Dilek	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Biyoloji Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Ankara - 06531	
8- Öz (Abstract): <u>Saccharomyces cerevisiae</u> 'nin Cupl ^R bir suşu ile karşılaştırıldığında, <u>Kluyveromyces</u> türlerinin toksik ağır metallere çok daha fazla dirençli oldukları bulunmuştur. Metalloprotein sentezinin <u>S. cerevisiae</u> 'da bakır ve gümüş ile indüklenmesine karşın <u>K. marxianus</u> 'da konstitütif olduğu görülmüştür. Ayrıca, gümüş ve kadmiyum ile muamele edildiğinde, <u>K. marxianus</u> 'da metalloproteininden daha küçük molekül ağırlıkta bir diğer proteinin sentezlendiği bulunmuştur. <u>K. marxianus</u> tarafından en hızlı ve en fazla biriktirilen metal gümüştür; bu metalin % 90'ı ilk 6 saat içinde hücreler tarafından bağlanmıştır. Bu organizmada bakır ve kadmiyum biyosorpsiyonu da oldukça yüksek olup 14 saatlik bir süre içerisinde sırasıyla % 60 ve % 65'lik etkinliklerle gerçekleşmiştir. Kobalt, çinko ve mangan akümülyasyonu her iki organizmada da oldukça düşük seviyelerdedir. Metallerin sadece çok küçük miktarlarının çözünür sitoplazma içinde olduğu, hücreler tarafından yüksek seviyede biriktirilen metallerin hücre duvarına ve vakuollere bağlandığı gösterilmiştir. <u>K. marxianus</u> 'un altın iyonlarının solusyonlardan geri kazanımında etkin bir şekilde kullanılabileceği de yine bu çalışmada gösterilmiştir.	
Anahtar Kelimeler: Metal dirençliliği, metalloprotein, metal biyosorpsiyonu, <u>S. cerevisiae</u> , <u>K. marxianus</u> .	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Ek'de verilmiştir.	
10- Bilim Dalı: 401 01 04 Doçentlik B. Dalı Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	ISIC Kodu:
11- Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı	<input checked="" type="checkbox"/> Sınırsız
12- Raporun Gizlilik Durumu :	<input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz

Proje ile İlgili Yayın/Tebliğlerle İlgili Bilgiler:

1) Yurtdışı Yayın:

Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, N. G. 1993. "Studies on metal resistance system in *Kluyveromyces marxianus*." *Biological Trace Element Research* 38, 117-127.

2) Proceeding:

Özcengiz, G., Zarrinabadi, O. and Alaeddinoğlu, N. G. 1992. *Kluyveromyces* spp." In "*Recent Advances in Biotechnology*", NATO-ASI Series E, Vol. 210, p.491-493.

3) Yurtdışı Tebliğ:

Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, N. G. 1989 *Kluyveromyces marxianus* exposed to in increasing heavy metal levels." (Presented at" 16th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology". August 1992, Vienna-Austria.) *Yeast*, Vol.8 p.602.

4) Yurtiçi Tebliğ:

Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, N. G. 1992 "Heavy metal accumulation by yeast cells: Surface binding and internalization", (Biyokimya Kongresi, Ekim 1992, Kemer, Antalya) *Biyokimya Dergisi*, Vol. 17. p. 58.