



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**DİSİPLİNLERARASI DOĞAL KAYNAKLAR YÖNETİMİ
ANABİLİM DALI**

**ÇANAKKALE BOĞAZI' INDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ
İZOLATLARININ AĞIR METAL BİYOREMİDİASYONUNDA
KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BELGİN KILIÇ ÇETİNKAYA

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MİNE ÇARDAK**

ÇANAKKALE – 2025



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DİSİPLİNLERARASI DOĞAL KAYNAKLAR YÖNETİMİ ANABİLİM DALI

**ÇANAKKALE BOĞAZI' INDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ
İZOLATLARININ AĞIR METAL BİYOREMİDİASYONUNDA
KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BELGİN KILIÇ ÇETİNKAYA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MİNE ÇARDAK

Bu çalışma Çanakkale 18 Mart Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 4336

ÇANAKKALE – 2025



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Belgin KILIÇ ÇETİNKAYA tarafından Prof. Dr. Mine ÇARDAK yönetiminde hazırlanan ve **25/06/2025** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Çanakkale Boğazı’ndan İzole Edilen Bakteri İzolatlarının Ağır Metal Biyoremediasyonunda Kullanım Potansiyellerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Disiplinlerarası Doğal Kaynaklar Yönetimi Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Mine ÇARDAK
(Danışman)

.....

Doç. Dr. Pelin Saliha ÇİFTÇİ

.....

Prof. Dr. Tamer AKKAN

.....

Tez No : 10609404

Tez Savunma Tarihi : 25/06/2025

.....
Prof. Dr. Melis ULU DOĞRU
Enstitü Müdürü
../../2025

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Belgin KILIÇ ÇETİNKAYA

25./06/2025

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi hazırlarken desteklerini esirgemeyen pek çok değerli kişilere teşekkür borçluyum. Öncelikle, bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden, akademik gelişimime katkıda bulunan, sabırlı ve yol gösterici yaklaşımıyla çalışmama büyük katkı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Mine ÇARDAK’a teşekkür ederim.

Bu zorlu sürecin her anında yanımda olan, desteği ve sevgisiyle bana güç veren eşim Mesut ÇETİNKAYA’ya, hayatıma neşe ve ilham katan, varlığıyla bu süreci daha özel kılan, akıllı, yüreği büyük, kendi küçük sevgili kızım Zeyneb Beril ÇETİNKAYA’ya ve ayrıca destekleriyle yanımda olan aileme ve dostlarıma da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.”

Belgin KILIÇ ÇETİNKAYA
Çanakkale, Haziran 2025

ÖZET

ÇANAKKALE BOĞAZI' INDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİ İZOLATLARININ AĞIR METAL BİYOREMİDİASYONUNDA KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Belgin KILIÇ ÇETİNKAYA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Disiplinlerarası Doğal Kaynaklar Yönetimi Anabilim Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mine ÇARDAK

25/06/2025, 76

Bu araştırma, Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bakteri izolatlarının ağır metal biyoremediasyon potansiyellerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çanakkale Boğazı, yoğun deniz trafiği ve çevresel baskılar nedeniyle yüksek miktarda ağır metal kirliliğine maruz kalan önemli bir su yolu olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, bölgeden elde edilen yüzey suyu örneklerinden izole edilen bakterilerin ağır metal dirençlilik düzeyleri belirlenmiş ve biyoremediasyon kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Araştırmanın ilk aşamasında, Çanakkale Boğazı'nın Marmara Denizi girişi ve çıkışı ile boğazın orta noktasından 0-30 cm derinlikte 156 yüzey suyu örneği toplanmıştır. Bu örneklerden izole edilen bakteriler, toplam heterotrofik aerobik bakteri (HAB) düzeylerinin belirlenmesi amacıyla VITEK 2 Compact 30 cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. İndikatör bakteri tayini ve ağır metal dirençlilik testleri yapılarak, izolatların gümüş (Ag), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), çinko (Zn), demir (Fe), krom (Cr) ve kurşun (Pb) gibi ağır metallere karşı dirençlilik profilleri ortaya konmuştur.

Bulgular, ağır metal dirençliliği açısından en yüksek oranların *Bacillus cereus* (%25,96) ve *B. thuringiensis* (%10,62) türlerinde gözlemlendiğini göstermiştir. Bu bakteriler, özellikle ağır metal kirliliği bulunan çevresel ortamlarda önemli biyoremediasyon potansiyeline sahip mikroorganizma grupları olarak değerlendirilmektedir. Verilerin

istatistiksel analizi SPSS programı ile yapılmış ve bakterilerin ağır metal tolerans düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Araştırmanın sonuçları, Bacillus türlerinin ağır metallerin biyoremediasyonunda önemli rol oynayabileceğini ve bu mikroorganizmaların çevresel kirlilik kontrolü amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Çanakkale Boğazı'nın çevresel sürdürülebilirliği açısından bu tür mikroorganizmaların kullanımı potansiyel bir çözüm olarak değerlendirilmektedir. Araştırma sonuçları, II. Uluslararası Küresel İklim Değişikliği Kongresi'nde sunulmuş ve literatürdeki mevcut çalışmalarla kıyaslandığında özgün katkılar sağlamıştır.

Bu çalışmanın bulguları, ağır metal kirliliği ile mücadelede biyoremediasyon potansiyeline sahip yerel mikroorganizmaların daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır. Özellikle Bacillus türlerinin ağır metal biyoremediasyonu konusundaki uygulamaları genişletilmeli ve bu mikroorganizmaların çevresel uygulamalarda kullanımına yönelik protokoller geliştirilmelidir. Gökçeada çevresindeki ağır metal kirliliği göz önüne alındığında, elde edilen sonuçların yerel çevre yönetim politikalarına katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ağır Metal Biyoremediasyonu, Çanakkale Boğazı, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, VITEK 2 Compact 30

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL FOR USE OF BACTERIAL ISOLATES ISOLATED FROM THE ÇANAKKALE STRAIT IN HEAVY METAL BIOREMEDIATION

Belgin KILIÇ ÇETİNKAYA

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Natural Resources Management

Supervisor: Prof. Dr. Mine ÇARDAK

25/06/2025, 76

This research was carried out to investigate the heavy metal bioremediation potential of bacterial isolates isolated from the Çanakkale Strait. The Çanakkale Strait attracts attention as an important waterway exposed to high amounts of heavy metal pollution due to intense maritime traffic and environmental pressures. In this study, the heavy metal resistance levels of bacteria isolated from surface water samples obtained from the region were determined and their bioremediation capacities were evaluated.

In the first phase of the study, 156 surface water samples were collected from the entrance and exit of the Dardanelles Strait to the Marmara Sea and from the midpoint of the strait at a depth of 0-30 cm. Bacteria isolated from these samples were analyzed using the VITEK 2 Compact 30 device to determine total heterotrophic aerobic bacteria (HAB) levels. By performing indicator bacteria determination and heavy metal resistance tests, the resistance profiles of the isolates to heavy metals such as silver (Ag), cadmium (Cd), cobalt (Co), copper (Cu), nickel (Ni), zinc (Zn), iron (Fe), chromium (Cr) and lead (Pb) were revealed. The findings showed that the highest rates of heavy metal resistance were observed in *Bacillus cereus* (25.96%) and *B. thuringiensis* (10.62%) species. These bacteria are considered as microorganism groups with significant bioremediation potential, especially in environmental environments with heavy metal pollution. Statistical analysis of the data was performed with the SPSS program and the heavy metal tolerance levels of the bacteria were found to be statistically significant.

The results of the study revealed that *Bacillus* species can play an important role in the bioremediation of heavy metals and that these microorganisms can be used for environmental pollution control. In addition, the use of such microorganisms is considered a potential solution for the environmental sustainability of the Dardanelles. The results of the study were presented at the 2nd International Congress on Global Climate Change and made original contributions when compared to existing studies in the literature.

The findings of this study emphasize that local microorganisms with bioremediation potential in combating heavy metal pollution should be investigated more comprehensively. In particular, the applications of *Bacillus* species in heavy metal bioremediation should be expanded and protocols should be developed for the use of these microorganisms in environmental applications. Considering the heavy metal pollution around Gökçeada, it is anticipated that the obtained results will contribute to local environmental management policies.

Keywords: Heavy Metal Bioremediation, Dardanelles, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, VITEK 2 Compact 30

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Problem Durumu.....	2
1.2. Problem Cümlesi.....	2
1.3. Araştırmanın Alt Problemleri.....	3
1.4. Araştırmanın Amacı.....	3
1.5. Araştırmanın Önemi.....	4
1.6. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	4
1.7. Araştırmanın Varsayımları.....	5
1.8. Tanımlar.....	5

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Bakterilerin Ağır Metallerin Dirençleri ve Direnç Mekanizmaları.....	7
2.2. Ağır Metal Biyoremediasyonu ve Bakterilerde Kirlilik Gideriminde Kullanılması.....	10
2.3. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazında Ağır Metal.....	13
2.4. Çok Yönlü Mikrobiyal Yöntemle Metal Giderimi.....	14

2.5.	Deniz Kirliliğine Bakteri Uygulamalarının Geleceği ve Yaygınlaştırma Potansiyeli.....	17
------	---	----

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL YÖNTEMİ

3.1.	Çalışma İstasyonları ve Örneklerin Alınması.....	21
3.2.	Veri Toplama Teknikleri.....	22
3.2.1.	Bakteriyolojik Analizler.....	22
	İndikatör Bakteri Tayini.....	22
	Toplam Heterotrofik Aerobik Bakteri (HAB) Düzeyleri	24
3.2.2.	Bakteri Tür Teşhisi.....	25
3.2.3.	Bakteri İzolasyonu.....	28
3.2.4.	Ağır Metal Analizleri.....	28
	İzolatlardan Ağır Metal Giderimi Analizi	29
3.3.	İstatistiksel Analiz.....	31
3.4.	Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler.....	32
3.4.1.	Bakteriyolojik Tanı Yöntemlerinde Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasal Maddeler.....	35
	Marine Agar Besiyeri.....	35
	Marine Broth Besiyeri.....	35
3.5.	Ağır Metal Dirençlilik Testleri	35
3.5.1.	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK)	35

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM BULGULAR

4.1.	İndikatör Bakteri Düzeyleri.....	39
4.2.	Toplam Heterotrofik Aerobik Bakteri (HAB) Düzeyleri.....	41
4.3.	İzole Edilen Bakteri Türleri.....	43
4.4.	Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri.....	48
4.5.	Ağır Metal Analiz Sonuçları.....	51

4.5.1. İzolatlardan Ağır Metal Giderimi Analiz Sonuçları	51
--	----

BEŞİNCİ BÖLÜM	53
SONUÇ VE ÖNERİLER	

5.1. Tartışma.....	53
5.2. Sonuç.....	60
5.3. Öneriler.....	61
KAYNAKÇA	69
EKLER	I
EK 1.	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg/l	Mikrogram/litre
%	Yüzde oranı
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
dH20	Distile su
FK	Fekal Koliform
g	Gram
g	Gram
HAB	Heterotrofik aerobik bakteri
Kg	Kilogram
Kg	Kilogram
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
Ni	Nikel
Zn	Çinko
µg/l	Mikrogram/litre
µl	Mikrolitre
µl	Mikrolitre

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Çalışma alanındaki örnekleme istasyon adları	22
Tablo 2	VITEK 2 Compact 30 sisteminde Gram-Negatif izolatlar için Metabolik Tanı Testlerinde kullanılan Substratlar	32
Tablo 3	VITEK 2 Compact 30 sisteminde Gram-Pozitif izolatlar için Metabolik Tanı Testlerinde kullanılan Substratlar	33
Tablo 4	VITEK 2 Compact 30 Sisteminde Bacilli izolatlar için Metabolik Tanı Testlerinde kullanılan Substratlar	34
Tablo 5	Bakterilere uygulanan ağır metal miktarları	36
Tablo 6	Çanakkale Boğazı'nda alınan deniz suyu örneklerinde ortalama Toplam Koliform (TK), Fekal Koliform (FK) ve Enterokok (FS) düzeyleri KOB/100 mL	39
Tablo 7	Kasım 2022 – Ekim 2023 tarihleri arasında istasyonlarda tespit edilen HAP düzeyleri.	41
Tablo 8	Çanakkale Boğazı'ndan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen bakterilerin % dağılımı	43
Tablo 9	Çanakkale Boğazı kıyı örneklerinden izole edilen izolatların sınıf ve familya dağılımları	46
Tablo 10	İzole edilen suşların ağır metal solüsyonlarına karşı (1000 mM) Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri (mM)	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Çalışma alanı	21
Şekil 2	Membran filtrasyon yöntemi (NKS pedleri)	24
Şekil 3	Endo ve Marine Agar besiyerlerinde üreme sonrası bakteri izolatları	25
Şekil 4	Ağır metal MİK deneylerinde kullanılan 96 adet mikro tutucu bulunan plate görünümü	37
Şekil 5	Thermo marka Mikroplate Okuyucu (absorbans 600nm)	38
Şekil 6	Çanakkale Boğazı kıyı örneklemesinden izole edilen bakterilerin familyalara göre dağılımı (%)	48
Şekil 7	Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen ağır metal dirençlilik prevelansı	49
Şekil 8	İzole edilen bakterin farklı ağır metalleri uzaklaştırma kapasitelerinin yüzde dağılımı (%)	51
Şekil 9	Bakteri izolatlarından sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitelerinin dağılımı (%)	52

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Kıyı ekosistemleri gerek kara kökenli gerekse deniz kaynaklı etkilere doğrudan maruz kalan, dinamik yapıya sahip alanlardır (Algan vd., 1999). Özellikle Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi, yoğun gemi trafiği ve turizm faaliyetlerinin yanı sıra kentsel, tarımsal ve endüstriyel kaynaklı kirlilik yüküne maruz kalan bölgelerde, su kalitesinin korunması ve iyileştirilmesi büyük önem arz etmektedir (Altuğ vd., 2020). Hem insan sağlığı hem de sucul organizmaların devamlılığı açısından, bu kıyılarda oluşan kirleticilerin incelenmesi ve ortadan kaldırılması yönünde yürütülen çalışmalara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Ameen vd., 2020).

Ağır metaller, suda çözünmemeleri ve biyolojik olarak parçalanamamaları nedeniyle kirliliğin kalıcı bileşenlerinden biridir (Çardak ve Altuğ, 2014). Doğrudan veya dolaylı yollarla su ortamına ulaşan kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), cıva (Hg) gibi toksik metaller; sudaki canlılar ve genel olarak ekosistem açısından önemli riskler barındırmaktadır. Suda yaşanan ağır metal kirliliği sonucu, pek çok organizmanın metabolik faaliyetleri etkilenmekte, hatta toplu ölümler dahi gözlenebilmektedir (Beveridge ve Murray, 1976). Bu nedenle, çevre dostu ve sürdürülebilir bir arıtma yöntemi olarak değerlendirilen biyoremediasyon, ağır metal kirliliğinin giderilmesinde giderek daha fazla ön plana çıkmaktadır (Christodoulatos ve Koutsospyros, 1998).

Biyoremediasyon; bakteriler, mantarlar veya diğer mikroorganizmaların toksik maddeleri dönüştürme, adsorplama ya da metabolize etme kabiliyetlerinden yararlanarak kirliliği kontrol altına alma yaklaşımıdır. Özellikle bakteriler, hızlı üreme kapasiteleri ve genetik adaptasyon yetenekleri sayesinde ağır metallerle baş edebilmek için çeşitli direnç mekanizmaları geliştirebilmektedir (Ji ve Silver, 1995; McEntee vd., 1986). Dolayısıyla, kıyısal alanlardan izole edilecek metal toleranslı suşların incelenmesi, hem bu ortamların ekolojik risk analizine katkı sağlamak hem de ileriye dönük arıtma uygulamalarında potansiyel çözüm ortağı olmaktadır (Ackerley vd., 2004).

Bu araştırmada, Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı kıyılarından elde edilen su örneklerinden izole edilecek bakterilerin ağır metale dirençlilik düzeyleri ve biyoremediasyon potansiyelleri ortaya konulmak istenmektedir. Böylece, hem deniz ekosisteminde rastlanan bakteri türlerinin tanımlanması hem de ağır metal kirliliğİ sorununun çözümüne yönelik biyolojik yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlanacaktır (Benesty vd., 2009).

1.1. Problem Durumu

Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı, stratejik konumu nedeniyle ulusal ve uluslararası gemi trafiğinin yoğun olarak kullanıldığı su yollarından biridir. Buna ek olarak, kentsel atık sular, sanayi faaliyetleri ve tarımsal uygulamalardan kaynaklanan besin tuzu yükü, pestisitler ve ağır metaller, bu bölgelere doğrudan veya dolaylı yollardan ulaşabilmektedir (Altug vd., 2020). Ağır metal kirliliğİ, özellikle deniz canlılarının dokularında birikerek besin zincirine dahil olmakta ve tüketici konumdaki insan sağlığını da tehlikeye atmaktadır (Kut vd., 2000; Topcuoğlu vd., 2002).

Geleneksel fizikokimyasal arıtma yöntemleri (örneğin kimyasal çöktürme, filtrasyon, iyon değişimi vb.), ağır metallerin sudan uzaklaştırılmasında kısmi başarı sağlasa bile yüksek maliyetli olması ve suların ekolojik parametrelerini olumsuz etkileme riski gibi dezavantajlara sahiptir (Gillard vd., 2019). Bu noktada, canlı mikroorganizmaları kullanarak daha az maliyetli ve çevre dostu bir teknik olan biyoremediasyon, çözüm olarak öne çıkmaktadır (Dash vd., 2013). Ancak başarılı bir biyoremediasyon süreci için, metal dirençliliğİ yüksek suşların tür düzeyinde tanımlanması ve metabolik kapasitelerinin net olarak ortaya konması gerekmektedir (Beveridge vd., 1976).

1.2. Problem Cümlesi

anakkale Boğazı gibi denizel alanlarda ağır metal kirliliğİ, ekosistem sağlığını ve insan güvenliğini tehdit edecek düzeyde artmakta; bu durum, geleneksel yöntemlerle yeterince giderilemeyen kirlleticilerin sürdürülebilir biyolojik yollarla uzaklaştırılmasını zorunlu kılmaktadır.

1.3. Araştırmanın Alt Problemleri

- Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bakteriler hangi ağır metallere karşı direnç göstermektedir?
- Bu bakterilerin biyoremediasyon kapasiteleri hangi düzeydedir?
- Metal dirençlilik düzeyleri ile antibiyotik direnç profilleri arasında bir korelasyon var mıdır?
- İlgili bakterilerin metal bağlanma mekanizmaları nelerdir?
- Yerli bakteri türleri ileri biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir mi?

1.4. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı, Çanakkale Boğazı ve yakın kıyı bölgelerinden alınacak su örneklerinden izole edilen bakterilerin:

- Ağır metal (örnek: Pb, Cd, Cr vb.) dirençlilik düzeylerini belirlemek,
- Biyoremediasyon potansiyellerini (örneğin metal adsorpsiyonu, metal indirgeme veya dönüştürme yetenekleri) laboratuvar koşullarında araştırmak,
- İlgili suşların metal bağlanma karakterizasyon analizlerini yürüterek hangi mekanizmalarla metali tutabildiklerini veya zararsız hâle getirebildiklerini ortaya koymak,
- İstatistiksel analizlerle farklı metaller arasındaki dirençlilik ilişkilerini, olası çoklu direnç (MHMR) ve antibiyotik direnç profilleriyle korelasyonlarını incelemek,

- Bu verilere dayalı olarak deniz ekosisteminden izole edilen potansiyel yerli bakterilerin sürdürülebilir bir çevre yönetimi ve ileri biyoteknolojik uygulamalarda (örneğin endüstriyel atık suların arıtımı) kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmektir.

1.5. Araştırmanın Önemi

Denizel ortamlarda oluşan kirlilik, sadece ekolojik dengeyi tehdit etmekle kalmaz, aynı zamanda balıkçılık faaliyetleri, turizm ve halk sağlığı gibi sosyoekonomik boyutlarda da zarar doğurur (Çiftçi Türetken vd., 2019). Özellikle ağır metallerin biyolojik birikim potansiyeli oldukça yüksektir. Canlı dokularında biriken bu metaller, besin zincirinin üst basamaklarına doğru ilerledikçe toksik etkileri artmakta ve insan sağlığını ciddi şekilde riske atabilmektedir (Bhakta vd., 2012).

Biyoremediasyon, daha düşük maliyetli, daha az çevresel etki yaratan ve doğal sistemi destekleyen bir çözüm olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir (Pandey vd., 2015). Bu kapsamda, Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi stratejik bölgelerden izole edilecek bakteri türlerinin ağır metale dirençlilik profilleri ve kirliliği azaltma becerilerinin belirlenmesi hem yerel ekosistemin korunmasında hem de ileride geliştirilecek biyoreaktör veya biyofiltre gibi teknolojilerin adaptasyonunda önemli girdiler sağlamaktadır (Ameen vd., 2020; Medfu Tarekegn vd., 2020).

1.6. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Çalışma, Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı'nın belirli kıyısal kesimlerinde yürütülecek olup, bu bölgeler dışında kalan alanlara genellenemez.
- Örneklemeler, Kasım 2022–Ekim 2023 tarih aralığında aylık periyotlarla yapılacaktır. Bu döneme ait mevsimsel veya çevresel koşulların farklılığı, sonuçlarda yanılgıya neden olmaktadır.

- Bakterilerin dirençlilik ve biyoremediasyon performansları laboratuvar ölçeğinde değerlendirilecektir. Doğal ortamda ortam koşulları farklılaşabileceğinden, sonuçların gerçek ekosisteme birebir yansıtılması sınırlı kalmaktadır.
- Ağır metal analizlerinde Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) tercih edilmektedir. Farklı bir analitik yöntem (örn. ICP-MS) kullanımı, ölçüm hassasiyeti veya algılama limitlerinde değişiklik yaratmaktadır (Gerbino vd., 2011).

1.7. Araştırmanın Varsayımları

- Çanakkale Boğazı ve Marmara Denizi kıyısız alanlarından izole edilecek bakterilerin, ortamdaki ağır metal kirliliğine bağılı olarak çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiş olması beklenmektedir (Matyar, 2012).
- Bakterilerden elde edilen sonuçlar, bölgedeki gerçek kirlilik durumunu yansıtabilir düzeydedir ve ekosistemde önemli bir yere sahip olması muhtemeldir (Dell'Anno vd., 2020).
- Kullanılan deneysel yöntemlerin (mikrodilüsyon, AAS vb.) standart protokollere uygun şekilde yürütüleceğı ve teknik hataların minimum düzeyde tutulabileceğı öngörülmektedir (Rahman vd., 2002).

1.8. Tanımlar

Agar: Mikroorganizmaların gelişimini destekleyen katı besiyeri ortamıdır (Madigan vd., 2009).

Ağır metal: Yoğunluğu 5 g/cm³'ün üzerinde olan, doğada biyolojik olarak parçalanmayan ve canlı organizmalar için toksik olabilen metalik elementlerdir (Pandey vd., 2015).

Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS): Serbest metal iyonlarının ışığı soğurma özelliğine dayalı olarak metal konsantrasyonlarını ölçen analitik bir cihazdır (Gerbino vd., 2011).

Biyoremediasyon: Mikroorganizmaların veya diğer biyolojik unsurların çevresel kirleticileri (örneğin ağır metaller) zararsız hâle getirmesi sürecidir (Dash vd., 2013).

Buyyon (broth): Mikroorganizmaların gelişimini destekleyen sıvı besiyeri ortamıdır (Madigan vd., 2009).

Degredasyon: Canlı organizmaların ya da enzimlerin karmaşık molekülleri daha basit bileşenlere parçalaması sürecidir (Madigan vd., 2009).

İzolât: Belirli bir çevresel kaynaktan saf olarak elde edilen mikroorganizmadır (Matyar, 2012).

Konsantrasyon: Bir çözeltideki çözünmüş maddenin, toplam çözelti hacmine oranla ifadesidir (Rahman vd., 2002).

MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu): Mikroorganizmaların gözle görülür şekilde üremesini engelleyen en düşük madde (örneğin metal, antibiyotik) konsantrasyonudur (Dell'Anno vd., 2020).

Ötrofikasyon: Suda çözünmüş azot ve fosfor gibi besin maddelerinin artmasıyla alg çoğalması sonucu oluşan ekosistem bozulmasıdır (Çiftçi Türetken vd., 2019).

Steril: Herhangi bir ortamda veya materyalde canlı mikroorganizma bulunmaması durumudur (Brock Biology of Microorganisms, Madigan vd., 2009).

Toksik: Canlı organizmalara zarar veren, biyolojik sistemlerin işleyişini bozan zehirli maddelerdir (Bhakta vd., 2012).

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE

Araştırmanın bu bölümünde çalışmanın problem durumu ve içerdiği kavramlar ele alınarak kuramsal çerçeve oluşturulmuştur. Literatürde yer alan araştırmalara değinilmiştir.

2.1. Bakterilerin Ağır Metallerin Dirençleri ve Direnç Mekanizmalar

Bakterilerin ağır metallere tolerans göstermesi ve bu metalleri çeşitli mekanizmalar ile ortamdan uzaklaştırmaya yönelik geliştirdikleri stratejiler, mikrobiyal ekoloji ile çevre biyoteknolojisi araştırmalarının kesişim noktasında önemli bir yer tutmaktadır. Ağır metaller, doğada bulunan elementler olmalarına rağmen, insan faaliyetlerinin artmasıyla birlikte (sanayi, madencilik, kentsel atıklar vb.) sucul ortamlarda daha yüksek yoğunluklarda birikmekte ve ekolojik dengenin bozulmasına yol açmaktadır. Mikroorganizmalar, özellikle de bakteriler, sahip oldukları çok yönlü adaptasyon mekanizmaları sayesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan toksik metallerle başa çıkabilmekte, bu metallerin kimyasal biçimini dönüştürerek (redüksiyon, kompleks oluşturma vb.) ya da hücre duvarı veya hücre dışı eklemeler yoluyla bağlayarak canlı çevre için görece daha az zararlı hâle getirebilmektedir. Dolayısıyla, ağır metal kirliliğinin giderilmesinde bakterilerin kullanılması, sadece maliyet etkin bir çözüm sunmakla kalmamakta, aynı zamanda çevre dostu bir yaklaşım olarak da öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, Velasquez ve Dussan (2009) tarafından Kolombiya'dan elde edilen *Bacillus sphaericus* suşlarının cıva, bakır, demir ve krom gibi metallere karşı geliştirdiği tolerans mekanizmalarına dair kapsamlı veriler sunulmuştur. Söz konusu çalışmada, bazı *B. sphaericus* izolasyonlarının canlı ve ölü formlarının karşılaştırılması yapılmış ve krom elementinin biyolojik giderim kapasitesi her iki formda da oldukça etkili sonuçlar vermiştir. Canlı hücreler kromun gideriminde yaklaşık %25 oranında bir etki gösterirken, ölü hücrelerin %44,5 düzeyinde bir başarıya ulaşması, bu türün çok yönlü kullanım potansiyeline işaret etmektedir. Aynı çalışmada, bu bakterilerin ağır metalleri bağlama ve biriktirme özelliklerinin, ağır metal kirliliğiyle mücadelede alternatif bir yol açabileceği ileri sürülmektedir.

Bakteriler, ağır metal iyonlarını çeşitli mekanizmalarla tolere edebilmektedir. Hücre duvarının yüzeyinde bulunan teikoik asit ve lipopolisakkaritler aracılığıyla metal iyonlarının yüzeye tutunması veya hücre içi enzimler tarafından metal iyonlarının indirgeyici tepkimelerle daha az toksik hâle dönüştürülmesi, bu tür mekanizmaların başında gelir. Özellikle Gram pozitif bakterilerde, kalın peptidoglikan tabakası metal iyonlarının pasif adsorpsiyonunda önemli bir rol oynayabilmektedir. Buna ek olarak, bakterilerin plazmitleri veya kromozomlarında taşıdıkları metal direnç genleri, metal iyonlarının hücre dışına aktif pompalanmasını sağlayan protein kanalların kodlanmasını içerir. Böylece, hücrenin içine sızan toksik anyon ya da katyonlar pompalanarak dış ortama geri atılmakta ve hücre içinde birikim sonucu oluşabilecek metabolik zararlardan kaçınılmaktadır. Yapılan birçok çalışma, bakterilerin toksik metallere direnç sağlarken aynı zamanda farklı metaller için ortak direnç mekanizmaları da geliştirebildiğini ve bu nedenle çoklu direnç (multiple heavy metal resistance) özelliğinin sıkça gözlemlendiğini göstermektedir.

Okeke (2008) tarafından yürütülen çalışmada *Exiguobacterium sp.* GSI suşunun krom (VI) giderimi konusunda yüksek başarı elde etmesi de bu çerçevede değerlendirilmektedir. Araştırmada, bu bakterinin yüksek tuz, geniş sıcaklık aralığı ve değişken pH koşullarında stabil kaldığı ve Cr(VI)'yı yüksek verimle indirgeyebildiği bildirilmiştir. Bu bulgular, söz konusu suşun çok yönlü bir metabolik adaptasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermekte ve tuzluluk gibi stres faktörlerinin de yer aldığı endüstriyel atıklarda dahi başarılı sonuçlar sağlayabileceğini düşündürmektedir. *Exiguobacterium sp.* GSI suşu örneğinde olduğu gibi, bazı bakteriler sadece metallere değil, aynı zamanda diğer organik veya inorganik kirleticilere karşı da direnç sistemleri geliştirilmektedir. Bu durum, bakterilerin doğal ekosistemlerdeki oynadığı kritik rollerden birini vurgular. Yüksek seviyede tolerans mekanizmaları ve geniş bir ekolojik dağılıma sahip olması, bakterilerin ekosistem restorasyonunda kullanılabilirliğini artırmaktadır. Ağır metallere maruz kalma durumlarında gözlemlenen bakteri adaptasyonları arasında metal iyonlarının inaktif biçimlere dönüştürülmesi de bulunur. Örneğin, Cr(VI) yüksek oranda toksik ve kanserojen bir biçim iken Cr(III) çok daha düşük toksik etkiye sahiptir. Bu dönüşümün gerçekleşmesi için bakteri hücresinde çeşitli redüktaz enzimlerinin etkin olması gerekir.

Morales vd., (2007) kroma dayanıklı mikroorganizmalar üzerine yaptıkları deneyler, *Streptomyces sp.* CG252 suşunun Cr (VI) giderimi esnasında önemli bir direnç mekanizması sergilediğini göstermiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre, *Streptomyces sp.* CG252, yüksek oranda krom içeren ortamlarda dahi büyümesini kısmen sürdürmekte ve metalin indirgenmesi hususunda çarpıcı bir potansiyele işaret etmektedir. Bu noktada, bakterinin metabolik sistemi içindeki enzim veya proteinlerin Cr(VI)'yı Cr(III)'e dönüştürdüğü ve böylelikle toksisiteyi azalttığı ileri sürülmektedir. Söz konusu çalışma, bakteri türlerinin ekosistemlerde sadece kirleticie direnmekle kalmayıp, aynı zamanda kirliliğin azaltılmasına da doğrudan katkı sağlayabildiklerini öne çıkarır. Bu da bakterilerin endüstriyel veya doğal ortamlarda yapılmaktadır kirlilik temizleme programlarına entegrasyonunu değerli kılar. Singh ve Malaviya (2015), benzer biçimde, bir *Bacillus* suşunun deri sanayisi kaynaklı atık sularda bulunan yüksek krom konsantrasyonunu giderebildiğini gözlemlemiştir. Deneylerde APBS5-3 izolatu, 800 ppm düzeyindeki Cr(VI)'ye direnç sergileyebilmiş, 72 saatlik bir süreç sonunda % 41,8 oranında krom giderimi sağlamıştır. Ayrıca, ortamın pH değerinin 8,54'e kadar yükselmesi, bakterinin kromla etkileşimde bulunduğu mekanizmaya ışık tutmaktadır. Ortam pH'sındaki bu artış, muhtemelen metali bağlayan veya metali indirgerken açığa çıkan hidroksil iyonlarından kaynaklanmaktadır.

Deri endüstrisi atıklarında bulunan kimyasalların çeşitliliği düşünüldüğünde, bir bakterinin bu denli direnç gösterebilmesi önemli bir adaptasyon başarısıdır. Yine benzer bir araştırmada Pandey vd., (2015), deri endüstrisinden kaynaklanan atık arazilerde 600-750 mg/L düzeyinde krom içeren ortamlarda yüksek direnç sergileyen bakteri izolatları tespit etmiş ve bu izolatların endüstriyel tesislerde uygulamaya konulabilecek potansiyel aday olduğunu vurgulamıştır. Kroma dirençliliğin yanı sıra, diğer ağır metallere (örneğin cıva, nikel, kadmiyum vb.) karşı da ortak direnç mekanizmaları sergileyen bakteriler bulunduğu bilinmektedir. Bu mikroorganizmaların endüstriyel kirlilikle mücadelede çok yönlü kullanılabilmesi, biyoremediasyon teknolojilerinin geleceği açısından umut vericidir. Mikroorganizmalardaki ağır metal direnç mekanizmaları; metal iyonlarının hücre duvarında pasif bağlanması (adsorpsiyon), hücre içinde enzimatik indirgeme veya kompleks hâline getirilmesi, metal iyonlarının dış ortama aktif pompalanması veya metalin hücre dış yüzeyinde oluşturulan ek zarf yapılarıyla tutunması biçiminde özetlenmektedir. Mevcut literatür, bu mekanizmaların çoğu zaman bir arada çalıştığına ve bakterilerde çeşitli plasmid

ya da kromozom kökenli genler aracılığıyla bu özelliklerin aktarıldığına işaret etmektedir. Dolayısıyla, çevre koşullarının gerekliliklerine göre bu mekanizmalar devreye girmekte veya baskılanmaktadır. Kimi zaman metale duyarlı suşlardan başlayarak, ortama bağlı mutasyon ve gen transferi süreçleri ile hızlı bir şekilde metal dirençli popülasyonların evrildiği de gözlenmiştir. Tüm bu örnekler, bakterilerin dinamik ekosistemlerde ne kadar kritik bir rol üstlendiğinin ve kirlilikle mücadelede onların biyolojik gücünden yararlanmanın ne kadar etkili olabileceğinin altını çizmektedir. Özellikle Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi uluslararası deniz taşımacılığına açık, turizm ve balıkçılık faaliyetlerinin yoğun olduğu bölgelerde bu tip doğal adaptasyonların keşfedilip karakterize edilmesi, ilerleyen süreçte gerçekleştirilmesi düşünülen biyoremediasyon çalışmalarına önemli bir temel oluşturmaktadır.

2.2. Ağır Metal Biyoremediasyonu ve Bakterilerde Kirlilik Gideriminde Kullanılması

Ağır metallerin konvansiyonel arıtma yöntemleri ile sudan veya tortulardan tamamen uzaklaştırılması çoğu zaman yüksek maliyetli ve ekolojik açıdan sorunlu olabilmektedir. Kimyasal çöktürme, koagülasyon-flokülasyon, ters ozmoz, iyon değişimi veya membran filtrasyonu gibi geleneksel yöntemler belirli düzeyde başarı sağlasa da, yüksek işletme giderleri, çamur bertarafı ve enerji tüketimi gibi konularda sorunlar yaratabilmektedir. Biyoremediasyon, bu çerçevede düşük maliyet, ekolojik uyumluluk ve uygulanabilirlik yönleriyle avantajlı bir alternatif sunmaktadır. Bu yaklaşım, bakteriler, mantarlar veya algler gibi mikroorganizmaların, ortamda bulunan metallerle kimyasal ve fiziksel etkileşime girerek ya metali çökeltebildikleri, ya aktif olarak hücre içine alıp dönüştürebildikleri ya da hücre duvarlarında bağlayabildikleri bir sürece dayanır. Velasquez ve Dussan (2009) tarafından yürütülen çalışmalar, bu alandaki araştırmaların yüksek potansiyeline örnek teşkil etmektedir.

Araştırmacılar, canlı ve ölü hücre kullanımının her ikisinin de metal adsorpsiyonu ve biriktirmesi açısından olumlu sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Canlı hücrelerin metabolik aktivitesi sayesinde, metal indirgeme veya kompleks oluşturma gibi ek süreçler devreye girebilirken, ölü hücrelerin ise hücre duvarındaki bileşenler yoluyla yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Aynı zamanda ölü hücrelerde metabolik enerji

gereksinimi ortadan kalktığı için işlem maliyeti daha az olmaktadır ve hücre ölüm riskine dair kaygılar söz konusu olmadığından saha uygulamalarında pratik bir tercih olarak değerlendirilmektedir. Benzer biçimde Okeke (2008), *Exiguobacterium sp. GSI* suşunun biyoremediasyon olanaklarını araştırmış, bu suşun tuzluluk, pH ve sıcaklık bakımından son derece geniş bir yelpazede aktif kaldığını göstermiştir. Bu durum, endüstriyel atıklarda sıkça görülen değişken koşullara uyum sağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Herhangi bir kirleticiyi parçalamak veya dönüştürmek için kullanılan bakterinin, endüstriyel atıkların içerdiği ekstrem şartlarda yaşamını sürdürebilmesi gerekir. *Exiguobacterium sp. GSI*, yüksek tuzluluk ve sıcaklık dalgalanmalarına rağmen Cr (VI)'yı Cr (III)'e indirgeyebilmekte, dolayısıyla hem çevre sağlığına hem de nihai bertaraf süreçlerine katkı sunmaktadır. Bu suş, metali sadece bünyesinde toplamakla kalmayıp onu kimyasal olarak daha az toksik hâle getirdiği için de özel bir öneme sahiptir. Morales vd., (2007) çalışması, *Streptomyces sp. CG252* suşunun kroma dirençlilik bakımından dikkate değer bir örnek teşkil ettiğini göstermektedir. *Streptomyces* cinsi, genellikle antibiyotik üretimi ile tanınmaktadır ancak aynı zamanda metal direnci ve biyoremediasyon potansiyeli bakımından da araştırmaların ilgisini çekmektedir. Araştırmada, yüksek Cr (VI) konsantrasyonlu ortamlarda dahi büyümeyi bir ölçüde koruyabildiği, hatta metal indirgeme mekanizmalarıyla ortamdaki kromun toksisitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu, sadece endüstriyel atıkların temizlenmesi için değil, aynı zamanda tarımsal alanlarda, maden bölgelerinde veya kentsel atık sistemlerinde birikmiş kroma yönelik müdahalelerde de yararlı olabilecek bir özelliktir.

Singh ve Malaviya (2015) ise deri sanayi atıklarından yola çıkarak *Bacillus* cinsi bir bakterinin bu tür kompleks atıklardaki kromu giderebilme kapasitesini göstermişlerdir. Araştırmalarında *Bacillus APBS5-3* izolatu, 72 saatlik süre zarfında %41,8 giderim düzeyine ulaşmış ve ortamın pH'sını 8,54 düzeyine çıkararak metali çöktürebilecek koşulları oluşturmuştur. Deri sanayisi, kullanılan kimyasal maddeler, tuzlar ve ağartıcılar dolayısıyla son derece karmaşık yapıda bir atık profili sergilemektedir. Bu nedenle, *Bacillus* suşunun böylesi koşullarda metal giderimi yapabilmesi, bakterinin çok yönlü metabolik adaptasyon becerisini ve biyoremediasyon çalışmalarındaki önemini göstermektedir. Pandey vd., (2015) da yine benzer şekilde deri endüstrisi atıklarıyla kontamine olmuş arazilerde, 600-750 mg/L gibi oldukça yüksek krom yüküyle baş edebilen bakteri izolasyonları elde etmişlerdir. Bu yüksek direnç düzeyi, bakterilerin metal iyonlarını ya yüzeyde tutarak ya da hücre içinde enzimatik tepkimelerle daha az toksik biçimlere dönüştürerek sağladıklarını ortaya koyar.

Dolayısıyla, bakterilerle yapılmaktadır ağır metal temizleme süreçleri, konvansiyonel yöntemlere göre saha uygulamalarında esneklik, düşük maliyet ve çevresel sürdürülebilirlik gibi avantajlar sunabilmektedir. Aynı çerçevede, deniz ortamında gerçekleşen bakteriyel biyoremediasyon çalışmaları da giderek artan bir ilgiyle takip edilmektedir. Özellikle tuzluluk, basınç ve sıcaklık dalgalanmaları gibi deniz şartlarında yaşayabilen bakteri türlerinin, kıyı ekosistemlerinde ortaya çıkan metal kirliliğini gidermede önemli rol oynaması muhtemeldir. Velasquez ve Dussan (2009) çalışmasında da belirtildiği üzere, denizel kökenli *Bacillus sphaericus* ya da *Pseudomonas putida* gibi türlerin bazı suşları, belirli metaller için oldukça iyi bir arıtım profili sergileyebilmektedir. Bununla birlikte, bakterinin türüne göre metale olan tolerans düzeyleri önemli farklılıklar gösterir. Bazı türler bir metale dirençli iken, diğer metalde etkisiz kalabilmektedir. Bu nedenle, sahadan alınacak örneklerde mümkün olduğunca çok sayıda farklı bakteri suşunun izolasyonu ve her birinin farklı metallerdeki performanslarının test edilmesi, en verimli biyoremediasyon yaklaşımının belirlenmesi bakımından temel bir adımdır.

Ayrıca, araştırmacılar bu suşları genetik modifikasyon yöntemleriyle daha da yüksek düzeyde metal giderimi yapabilecek hâle getirebilmekte, enzim veya protein mühendisliği vasıtasıyla metalin indirgenmesi aşamasında görev alan enzimlerin ekspresyon seviyelerini artırabilmektedir. Ackerley vd., (2004) çalışması bu duruma ışık tutar. *Pseudomonas putida* ve *Escherichia coli* 'de var olan flavoproteinlerin kromat redüktaz aktivitesi incelenmiş ve bu genlerin devreye alınması veya manipüle edilmesi sayesinde daha verimli Cr (VI) indirgeme tepkimeleri gözlemlenmiştir. Böylece, biyoteknolojik uygulamalarda bakterilerin doğal kapasitelerinin artırılması hedeflenmektedir. Toparlamak gerekirse, önceki araştırmalar, ağır metallere dirençli bakteri suşlarının doğadan izole edilebileceğini, bu suşların hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekli ortamlarda metal kirliliğini azaltmak amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bakterilerin canlı veya inaktif formlarının farklı yararları olabildiğinden, uygulama stratejileri duruma göre optimize edilebilmektedir. Bu araştırmalar, okyanus ve deniz gibi tuzlu ekosistemlerde de varlık gösteren suşların bulunduğunu kanıtlayarak biyoremediasyon çalışmalarının kıyı bölgelerinde veya açık denizlerde dahi başarıyla gerçekleştirilebileceğine işaret etmektedir.

2.3. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazında Ağır Metal

Marmara Denizi, Karadeniz ile Ege Denizi arasında stratejik bir konumda bulunmakta ve İstanbul Boğazı ile Çanakkale Boğazı aracılığıyla küresel deniz trafiğinin odak noktalarından biri hâline gelmektedir. Bu coğrafi yapı, bölgeye ulusal ve uluslararası taşımacılık faaliyetlerinin yanı sıra kentsel, endüstriyel ve tarımsal kaynaklı kirlilik yükü getirmektedir. Çiftçi (2008) ve Gürün (2008) tarafından yapılan araştırmalar, Marmara Denizi kıyısal alanında (özellikle Yenikapı-Yeşilköy hattında) deniz suyu örneklerindeki fekal ve toplam koliform düzeylerinin ulusal ve uluslararası standartların üzerinde seyrettiğini göstermiştir. Bu durum, bölgede yerleşik nüfus yoğunluğunun ve kentsel atık suların arıtılmadan denize verilmesi sonucunda bakteri yükünün yükseldiğine işaret eder. Aynı şekilde, Altuğ ve çalışma arkadaşlarının 2005-2007 yılları arasındaki çalışmasında, aerobik heterotrofik bakteri düzeyinin Marmara Denizi'nde Kuzey Ege Denizi'ne kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Çardak vd., 2016; Çiftçi vd., 2019). Bu bulgular, bakteriyel bolluğun sadece kentsel atık yükü ile ilgili olmayıp, aynı zamanda bölgenin jeostratejik konumundan dolayı gemi balast sularının ve diğer denizcilik faaliyetlerinin de etkili olabileceğini ortaya koyar. Ağır metal kirliliğine ilişkin veriler ise, İstanbul Boğazı'nda yapılan çalışmalarla büyük ölçüde örtüşmekte ve kirlilik kaynaklarının benzerliğini doğrulamaktadır.

Midye, karides, istiridye gibi indikatör türlerde ve deniz sedimentlerinde yüksek düzeyde metal birikiminin tespit edildiği raporlar, Kut vd., (1990), Topcuoğlu vd., (1990, 1992), Güven vd., (1993), Saygı vd., (1994), Topcuoğlu (1994) ve Topcuoğlu vd., (2003) tarafından sunulmuştur. Bu çalışmalar, Marmara Denizi ve İstanbul Boğazı çevresinde kurulan çeşitli endüstriyel tesislerin deşarjlarının, yoğun nüfuslu yerleşim yerlerinden kaynaklanan evsel atıkların ve gemi kaynaklı atıkların metal yükünü artırdığına dair kapsamlı bir resim çizmektedir. Bu metaller arasında genellikle kurşun (Pb), cıva (Hg), kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve çinko (Zn) öne çıkarken, kentsel atık sulardan dolayı nikel (Ni) ve krom (Cr) gibi diğer metallere de rastlandığı kayda geçmiştir. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı özelinde, yüksek metal konsantrasyonlarının ekosistem üzerinde ciddi etkileri söz konusudur. Metal kirliliği, bentik organizmaların dokularında birikerek trofik seviyeler arasında biyo-çöğalma (bioaccumulation) ve biyobirikim (biomagnification) yoluyla insan dâhil üst tüketici konumundaki canlıların bünyesine kadar ilerleyebilmektedir.

Bu süreç, besin zincirini ve deniz ürünleri ile geçimini sağlayan toplumları yakından ilgilendirir.

Ağır metallerin toksisitesi ve potansiyel kanserojen etkileri düşünüldüğünde, kirliliğin kontrol altına alınması ve uzun vadeli çözümler üretilmesi, bölge sağlığı açısından önemli bir gündem maddesi hâline gelmektedir. Bakterilerin doğrudan su kolonunda veya tortularda bulunarak ağır metal birikimini ve toksisitesini azaltma potansiyeli, bu ekosistemlerin sürdürülebilirliğinin korunması için bir fırsat yaratmaktadır. Çanakkale Boğazı'nda benzer kirlilik bulguları rapor edilmekle birlikte, bölgeye özgü kapsamlı ve çoklu metal direnç testlerine tabi tutulan bakteri isolatlarını derinlemesine inceleyen çalışma sayısı henüz sınırlıdır. Oysaki Çanakkale Boğazı, Ege Denizi'ne çıkış noktası olması bakımından hem ekosistem çeşitliliği hem de balıkçılık potansiyeli açısından büyük öneme sahiptir. Bu bağlamda, bölgedeki bakterilerin metal direnç profillerinin anlaşılması, kirlilik kaynaklarının takibi ve biyoremediasyon yaklaşımı oluşturulması noktasında hayati veriler sunmaktadır. Dolayısıyla, Marmara Denizi'nin genel kirlilik sorunu ile birlikte Çanakkale Boğazı'nın durumu, ağır metaller dahil pek çok kirletici etmen göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde, bölgede yapılacak ayrıntılı mikrobiyolojik ve ekotoksikolojik araştırmaların önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Araştırmalar, bu kıyı ekosistemlerinde bulunan bakteriler arasında ağır metallere dirençli ve hatta çoklu metale direnç gösteren tür veya suşların mevcut olabileceğini, bu suşların da biyoremediasyon projelerinde faydalanılabilecek doğal birer arıtma ajanı hâline gelebileceğini savunmaktadır. Bu bağlamda, Çanakkale Boğazı'ndan izole edilecek bakteri suşlarının çok yönlü değerlendirilmesi, metal kirliliğini azaltma, ekosistem kalitesini iyileştirme ve benzeri alanlarda yeni ufuklar açacaktır.

2.4. Çok Yönlü Mikrobiyal Yöntemle Metal Giderimi

Bakterilerin ağır metalleri gidermeye yönelik stratejileri, pasif adsorpsiyondan aktif mekanizmalara, hücre dışı polimerik maddeler üretiminden hücre içi metal depo proteinleri sentezine kadar uzanan geniş bir yelpazede incelenmektedir. Pasif adsorpsiyon, genellikle metabolik enerji gerektirmeden, hücre yüzeyinde bulunan negatif yüklü grupların metal iyonlarıyla etkileşimi sonucu gerçekleşir. Öte yandan aktif mekanizmalar, hücre içinde yer alan enzimlerin kullanımı veya membran proteinlerinin çalışmasıyla metal iyonunun

dönüştürülmesi ya da dışarı pompalanması biçiminde görülmektedir. Okeke (2008) tarafından vurgulanan *Exiguobacterium* sp. GSI örneği, tuzluluk ve geniş pH aralıklarında da faaliyet göstermesiyle bu mekanizmaların zorlu ortamlarda dahi etkin olabileceğini ortaya koymuştur. Ortamın tuzluluk oranı veya pH değeri yükseldikçe, metal iyonlarının kimyasal özelliği değişebilmekte ve bazı durumlarda iyon formu daha kararlı veya daha uçucu bir hâle dönüşmektedir. Bakterinin direnç mekanizmaları, bu değişimlere rağmen çalışabiliyorsa, dolayısıyla bakterinin çeşitli ekstrem koşullarda da metal giderimi yapabilmesi mümkün olmaktadır. Bu, biyoremediasyon uygulamalarının çeşitliliğini artırmaktadır. Yapılan birçok araştırma, ağır metal içeren endüstriyel atıkların, madencilik atık sularının veya kentsel atıksu arıtma çamurlarının arıtılması sırasında bakteriyel toplulukların doğal olarak seçildiğini ve bu topluluklar içinde yüksek dirençli suşların baskın hale geldiğini göstermiştir. Böyle durumlarda, bakterilerin oluşturduğu mikrobiyal konsorsiyumların bir arada çalışarak farklı metallerin gideriminde daha etkin sonuçlar elde ettiği bildirilmiştir. Örneğin, bazı suşlar krom indirgeme potansiyeline sahipken, diğer suşlar kadmiyum veya kurşuna odaklanan bir adsorpsiyon mekanizmasına sahip olmaktadır ve bu şekilde bir konsorsiyumla birden fazla kirleticinin aynı anda giderilmesi sağlanmaktadır. Kimi durumlarda, bakteri hücresinin dış zarı ve hücre duvarı, metal iyonlarını tutan primer bariyer olarak işlev görür. Bu aşamada, hücre yüzeyinde yer alan karboksil, fosfat ve amino grubu gibi fonksiyonel gruplar, metal iyonları ile kimyasal bağlar oluşturabilmektedir. Metal iyonu, yüzeye bağlandıktan sonra hücre içi enzimler devreye girip metali daha az toksik bir oksidasyon durumuna çevirmektedir. Morales ve vd. (2007) kroma dayanıklı *Streptomyces* sp. CG252 örneğinde metal iyonunun hücre yüzeyinde tutulduğu ve akabinde aktif redüksiyon ile Cr (VI)'dan Cr (III)'e geçiş sağlandığına işaret etmiştir. Bu mekanizma hem adsorpsiyonu hem de kimyasal indirgemeyi içermesi bakımından kapsamlıdır. Sadece kromla sınırlı kalmayan bu tip çoklu süreçler, diğer pek çok metal için de benzer biçimde görülebilmektedir. Singh ve Malaviya (2015) tarafından ifade edilen *Bacillus* suşu APBS5-3, aslen deri endüstrisi atıklarındaki yüksek Cr (VI) konsantrasyonunu gidermek üzere test edilmiş olsada, böyle suşların aynı zamanda nikel veya kadmiyum için de kısmen etkili olabileceği bilinmektedir. Dolayısıyla, mikroorganizma temelli arıtma teknolojilerinin gerçeğe dönüştürülmesi safhasında, tek bir tür yerine çoklu türlerden oluşan bir mikrobiyal konsorsiyumdan yararlanmak sıklıkla tercih edilmektedir. Saha uygulamalarında, birden fazla metali aynı anda gidermek, endüstriyel atıkların doğasında bulunan karmaşık kirlilik

profiline daha uygun çözümler sağlamaktadır. Ayrıca, biyofilm oluşumu da önemli bir etmendir.

Bazı bakteriler, yoğun polisakkarit matriksleri üreterek yüzeylere tutunur ve metal iyonlarını bir tür doğal filtre gibi tutmaktadır. Bu nedenle, biyofilm bazlı reaktör sistemleri kentsel ve endüstriyel arıtma tesislerinde kullanılmakta ve arıtma veriminin yükseltilmesinde etkili sonuçlar vermektedir. Biyofilmdeki bakteri hücreleri, yoğun bir matris içinde korunur, hücreler arası etkileşimlerle metabolik iş birliği yapar. Neticede, metal iyonlarını tutan ve onları daha az toksik biçime dönüştüren karmaşık mekanizmalar devreye girer. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı'nda hem açık deniz hem de kıyı ekosistemlerinde bu tip toplulukların oluşma potansiyeli oldukça yüksektir. Su kolonundaki planktonik bakterilerin yanı sıra, sedimente tutunan veya suyun yüzey katmanlarında biyofilm oluşturma eğiliminde olan bakteriler de ağır metal kirliliğinin gideriminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, gemi kaynaklı balast sularının boşaltılmasıyla dışarıdan gelen bakteri türlerinin de yerel ekosistemde kalıcı hâle gelme ihtimali bulunmaktadır. Bu göçmen bakterilerin, uyum sağlayabilmeleri hâlinde, çeşitli metallerde zaten önceden kazandıkları direnç özelliğini yerel popülasyonlara aktarabilecekleri düşünülmektedir. Tüm bu dinamikler, bölge ekosistemini bir mikrobiyal çeşitlilik ve adaptasyon alanı hâline getirmektedir. Okeke (2008) tarafından dile getirilen *Exiguobacterium* sp. GSI gibi ekstremofilik veya ekstremotolerant türlerin, bu tip karmaşık ortamlarda metal direnç sistemlerini koruyabilmeleri oldukça dikkat çekicidir. Bu suş, sadece yüksek tuzluluk değil, aynı zamanda yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığı gibi stres unsurlarına da uyum sağlayabilmektedir. Bu, bakterinin genetik düzeyde çoklu stres yanıtı verdiğini ve muhtemelen metal direnç genlerini de bu global stres yanıtı çerçevesinde düzenlediğini düşündürür. Benzer şekilde, endüstriyel alanlarda aşırı sıcaklık, pH veya toksik kimyasallarla karşılaşan bakterilerin, ağır metal gibi farklı kirleticilere de direnç geliştirmesi şaşırtıcı değildir. Mikroorganizmalar arasındaki yatay gen transferi mekanizmaları da direnç genlerinin suşlar arasında hızlıca yayılmasına olanak tanır ve evrimi hızlandırır.

Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi çeşitli kirlilik kaynaklarını bünyesinde barındıran ekosistemlerde gerek tuzluluk düzeyinin farklılığı gerek atık yükünün mevsimsel değişkenliği gerekse gemi trafiğiyle gelen farklı mikrobiyal türlerin varlığı, çok yönlü bir mikrobiyal çeşitliliğe ortam hazırlamaktadır. Bu çeşitlilik içerisinde, genellikle metal

dirençli suşların da önemli oranlarda bulunması beklenmektedir. Dolayısıyla, bu bölgelerden izole edilen bakteri suşları, endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere seçilmiş suş havuzuna değerli katkılar sunmaktadır. İlerleyen dönemlerde, genetik müdahalelerle metal redüksiyon veya adsorpsiyon aktivitesi daha da güçlendirilmiş suşların oluşturulması gündeme gelmektedir. Söz konusu çalışmalar, metalin yanı sıra organik toksik bileşiklerin (örneğin petrol türevleri, pestisitler) aynı anda giderilmesi için mikrobiyal konsorsiyumların tasarlanmasına kadar uzanan bir bilimsel çerçeve oluşturur. Ackerley ve vd. (2004) tarafından gerçekleştirilen flavoprotein odaklı çalışma, bu tür yaklaşımlara örnek oluşturmaktadır. Bakterilerde doğal olarak bulunan flavoproteinlerin kromat redüksiyonuna katkı sağladığı, bu genlerin aktifleştirilmesi veya aşırı ekspresyonunun, Cr(VI)'nın giderilmesinde bariz bir artışla sonuçlanabileceği gösterilmiştir. Böyle bir genetik düzenleme, gelecek vadeden biyoreaktör tasarımlarında “güçlendirilmiş” mikrobiyal suşların kullanılmasının önünü açar. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı ekosistemi söz konusu olduğunda, bu ekosistemden elde edilen yerli izolatlar üzerinde benzer çalışmalar yürütülmesi hem yerli endüstrilerde hem de uluslararası ölçekte sorun teşkil eden metal kirliliği problemine özgün çözümler geliştirmeyi mümkün kılmaktadır.

2.5. Deniz Kirliliğine Bakteri Uygulamalarının Geleceği ve Yaygınlaştırma Potansiyeli

Ağır metal kirliliğinin yönetimi, günümüzde pek çok ülkenin çevre politikalarında kritik bir mesele olarak ele alınmaktadır. Kimyasal veya fiziksel yöntemlerle kirliliği giderme girişimleri, sıklıkla yüksek maliyet, ikincil atık oluşumu ve ekolojik dengeye müdahale gibi sorunlarla karşı karşıya kalmaktadır. Buna mukabil, biyolojik arıtma teknikleri, daha sürdürülebilir ve çevreyle uyumlu çözümler sunmayı hedeflemektedir. Bakteri temelli teknolojilerin son yıllarda ivme kazanması da bu nedenle şaşırtıcı değildir. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı, Türkiye'nin ve hatta dünyanın önemli su yollarından biridir. Bölgedeki gemi trafiği, sanayi faaliyetleri, kentsel nüfus yoğunluğu ve tarımsal deşarjlar, su ekosisteminde pek çok kirlilik parametresini gözle görülür hâle getirmiştir. Kirlletici yükünün fazlalığı ise, uzun vadede ekonomik ve ekolojik kayıplara sebebiyet vermektedir. Bu nedenle, yapılan her yeni çalışma, ağır metallerin ve diğer kirleticilerin giderilmesi için hem koruyucu önlemler hem de hasar giderici uygulamalar geliştirmeye odaklanmaktadır. Çanakkale Boğazı'nda veya Marmara Denizi genelinde yürütülecek

kapsamlı mikrobiyal izolasyon ve tarama çalışmaları, dirençli bakteri suşlarının tanımlanması ve bunların hangi metallerde daha başarılı olduğu gibi sorulara yanıt vermektedir. Elde edilen suşların endüstriyel ölçekte kullanılabilirliği test edildiğinde, arıtma tesislerine veya biyoreaktörlere entegre edilmeleri gündeme gelmektedir. Özellikle deri, tekstil, metal kaplama, kimyasal üretim gibi sektörlerin yoğun olduğu bölgelerde ağır metaller, atık sularda temel kirlilik unsurları arasındadır. Bunların giderimi, konvansiyonel sistemler ile başarılmaya çalışılırken, genellikle arıtma tesislerinin arıtma çamurunda biriken metallerin bertarafı da ayrı bir mesele hâline gelir. Bakteri bazlı biyoremediasyon sistemleri, uygun bir tasarım ile atık su içinde çözünmüş veya askıda hâlde bulunan metal iyonlarını, hücre duvarına bağlamak veya enzimatik reaksiyonlarla çöktürerek ortamdan uzaklaştırmak için olanak tanır. Bu sırada oluşan bakteri-metal çamuru, daha az tehlikeli sınıfa girmektedir veya geri dönüştürme stratejileriyle metalin geri kazanımı bile mümkündür. Böylelikle döngüsel ekonomi anlayışına da katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, tarımsal sulak alanlarda da ağır metal kirliliği sıkça rastlanan bir durumdur. Özellikle gübre veya pestisit kullanımı gibi uygulamalardan kaynaklanan metaller toprağa, oradan da yer altı ve yüzey sularına karışmaktadır. Bu noktada, metal dirençli bakterilerin toprak veya sulak alan filtrasyon sistemlerine entegre edilmesi, kirliliğin yayılmasını engellemektedir. Tüm bu potansiyeller, gelecekte daha büyük ölçekli pilot uygulamalarla test edilmeli ve değerlendirilmelidir. Gemicilik faaliyetlerinden kaynaklanan kirleticiler de ayrı bir sorun teşkil etmektedir. Balast sularının boşaltılması, deniz ortamına yabancı bakteri türlerinin girmesine yol açarken, aynı zamanda ağır metal içeriğinin de artmasına sebebiyet verebilmektedir. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı, bu tür girişlerin sıkça yaşandığı güzergâhlardan biridir. Yerel yönetimler ve uluslararası denizcilik otoriteleri, balast sularının arıtılması veya değiştirilmesi gibi prosedürler uyguladılar da, kirliliğin tamamen önüne geçmek zordur.

Metal dirençli bakterilerin balast suyu arıtma sistemlerinde kullanılması, bilhassa güncel araştırma konularındandır. Gemi içinde kurulacak küçük ölçekli biyoreaktörlerde ya da liman tesislerinde oluşturulacak havuz sistemlerinde bu bakteri suşlarının yardımıyla balast suyu metal yükü minimize edilerek denize deşarj edilmektedir. Özellikle Okeke (2008), Velasquez ve Duşsan (2009), Singh ve Malaviya (2015) gibi araştırmacıların ortaya koyduğu suşların benzeri, denizel koşullara daha iyi uyum sağlamak adına modifiye edilmektedir. Bu şekilde global deniz taşımacılığı kaynaklı kirliliğin azalmasına katkı

sunulması, çevresel sürdürülebilirlik açısından büyük önem taşır. Ackerley vd., (2004) gerçekleştirdiği genetik müdahaleler, bakterilerin spesifik enzim aktivitelerini artırarak metal redüksiyon kapasitesini maksimize edebileceğimizi göstermektedir. Günümüzde CRISPR/Cas9 gibi ileri genetik düzenleme teknolojileri, bakterilerin genomunda hedeflenen düzenlemelerin kolayca yapılmasına imkân tanımaktadır. Böylelikle, örneğin Cr(VI)'yı Cr(III)'e dönüştüren enzimlerin ekspresyonu artırılabilir ya da metal bağlayıcı yüzey proteinleri çoğaltılmaktadır. Gelecekte, tüm bu uygulamalarla entegre edilen bakteri temelli atıksu arıtma tesislerinin yaygınlaşması ve metal kirliliğini mevcut düzeye kıyasla büyük oranda azaltması öngörülmektedir. Ancak, saha uygulamalarında bazı zorluklar da bulunmaktadır. Bakterilerin ortamda tutunması, metabolik aktivitenin sürekliliği, diğer mikrobiyal veya kimyasal faktörlerle rekabet, su sıcaklığının ve tuzluluğunun sürekli dalgalanması gibi parametreler, arıtma performansını etkilemektedir. Ayrıca, bakterilerin kullanıldığı sistemlerde biyokütle yönetimi de önemlidir. Metal ile doymuş hâle gelen bakteriler, belli bir süre sonra arıtma kapasitesini yitirir ve sistem dışına alınması gerekir. Bu aşamada, bakterilerin taşıdığı metalin geri kazanımı veya güvenli bertarafı planlanmalıdır.

Tüm bu aşamalar, aslında biyoremediasyon uygulamasının teknik fizibilitesini ve maliyetini belirlemektedir. Dolayısıyla, her ne kadar düşük maliyetli ve çevreci bir yaklaşım olsada, biyoremediasyon teknolojilerinin tasarımı ve işletilmesi, ciddi mühendislik ve bilimsel bilgi birikimini gerektirir. Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı ekosistemlerinde yapılacak ileri çalışmalar, bu zorluklara bölgesel çözümler getirebilme potansiyeli taşımaktadır. Örneğin, yerel ısı, tuzluluk, pH ve diğer kimyasal parametreleri dikkate alan pilot ölçekte biyoreaktör denemeleri, sahada optimum koşulların nasıl sağlanacağını ortaya koymaktadır. Bunun sonucu olarak geliştirilecek arıtma modelleri, ülke genelinde ve hatta uluslararası ölçekte deniz kirliliğinin giderilmesinde referans teşkil etmektedir. Yerel izolatların, adapte oldukları ekosistemde daha başarılı olma ihtimali yüksektir ve doğaya salındıklarında istilacı bir tür olmamaları veya beklenmedik ekolojik sonuçlar doğurmamaları avantaj sağlar. Öte yandan, ithal veya laboratuvar kökenli genetik olarak modifiye edilmiş suşların ekosisteme salınmasının da yasal ve etik boyutları vardır. Bu bağlamda, yerli izolatların araştırılması ve geliştirilmesi, hem düzenleyici kurumların onay süreçlerini kolaylaştırabilir hem de ekolojik uyumluluğu artırmaktadır. Sonuç itibarıyla gerek ulusal gerekse uluslararası platformlarda deniz kirliliğiyle mücadele kapsamında bakteri temelli uygulamaların gelecekte daha çok benimsenmesi beklenmektedir. Aşırı

kirlilik yükü bulunan alanlarda, geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda, bakterilerin adaptasyon gücünden ve biyokimyasal mekanizmalarından yararlanılması, kirliliğin azaltılmasında kilit rol oynayacaktır. Bu anlamda, Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi sosyoekonomik açıdan değerli sucul ortamların korunması ve sürdürülebilir yönetimi için bakteriyel biyoremediasyon stratejilerinin uygulanması, ileri araştırmalar ve uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

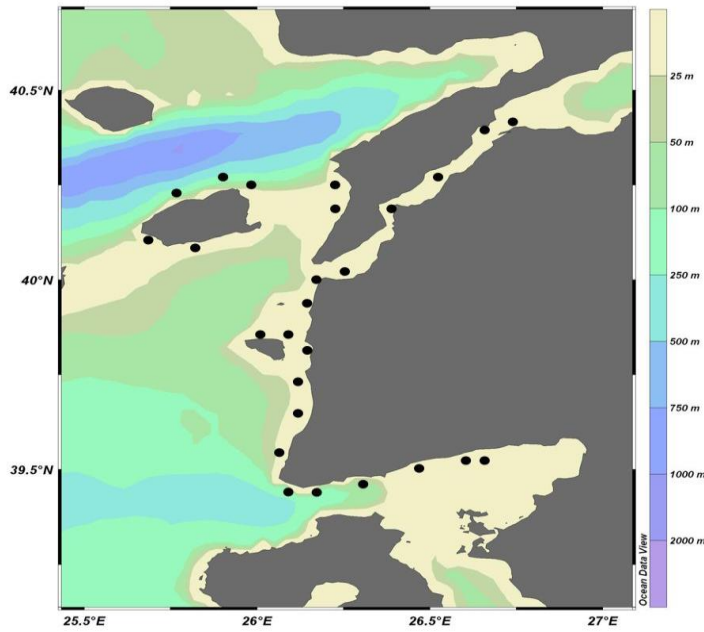
MATERYAL YÖNTEMİ

3.1. Çalışma İstasyonları ve Örneklerin Alınması

Çanakkale Boğazı'nda izole edilen örnekleme noktaları Çanakkale Marmara Denizi girişi, Çanakkale Boğazı Marmara Deniz çıkışı ve boğazın orta noktasını kapsayan alanda seçilmiştir. Örnekleme alanı Çanakkale İli güneyinde Küçükkuyu mevki ile Çanakkale Boğazı girişi Gelibolu-Lapseki dahil olmak mevkiinde seçilen noktaları kapsamayacaktır.

Bakteri izolasyonu için toplam 156 adet yüzey suyu (0-30 cm) örneği aseptik şartlarda (Anon.1996) alınarak örneklerinin aynı gün soğuk zinciri ile aynı gün analize alınmıştır (EPA 2006, APHA 1998). Örneklemeler Çanakkale İli güneyinde Küçükkuyu ile başlayarak sırasıyla Çanakkale Boğazı girişi Gelibolu – Lapseki ve Gökçeada –Bozcada dahil olmak üzere 13 istasyondan alınmıştır (Şekil 1 ve Tablo 1).

Aylık olarak Kasım 2022- Ekim 2023 tarihleri arasında 0-30 cm yüzeyden alınan deniz suyu örnekleri yapılmıştır.



Şekil 1. Çalışma alanı

Tablo 1

Çalışma alanındaki örnekleme istasyon adları

İstasyonlar	Bölge	İst
Küçükkuyu Liman önü	Küçük kuyu	KÜ
Ayvacak Assos Antik Liman Önü	Ayvacak	AY
Geyikli Odunluk İskelesi	Ezine	EZ
İntepe Merkez Gençlik kampı	Çanakkale Merkez	ÇG
Dardanos Merkez Plajı		Çİ
Kepez Belediye Halk Plajı		ÇK
Çanakkale Belediye Halk Plajı		ÇH
Gelibolu-Hamzakoy Plajı	Gelibolu	GH
Ecebat- Kabatepe Orman Kampı		GE
Biga -Kemer Halk Plajı	Biga	Bİ
Lapseki Halk Plajı	Lapseki	LP
Bozcaada	Bozcaada	BO
Gökçeada- kaleköy	Gökçeada	GÖ

3.2. Veri Toplama Teknikleri

3.2.1. Bakteriyolojik Analizler

İndikatör Bakteri Tayini

100 ml deniz suyu örneği steril olarak hazırlanmış fosfat tamponlu distile su ile maksimum 10-4 seyreltme yapıldıktan sonra, vakum pompasına bağlı filtre cihazına (Sartorius) aseptik olarak yerleştirilmiş, 0.45 µm por çaplı selüloz membran filtrelerden süzülerek, 3 ml steril distile su ile ıslatılmış hazır dehidre besiyerlerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Her örnek üç tekrarlı olarak süzülmüştür.

Besiyeri olarak fekal koliform bakteri analizi için, m-FC-NKS (Sartorius), total koliform grubu bakteri analizi için Endo-NKS (Sartorius), enterokok bakteri grubu analizi için m-Azide-NKS (Sartorius) nutrient ped sistemleri kullanılmıştır.

Filtre yerleştirilen petri kutuları fekal koliform için $44,5 \pm 0,1$ °C’de 24 saat, total koliform ve enterokok grubu bakteriler için $37 \pm 0,1$ °C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

m-FC-NKS besiyerinde üreyen mavi koloniler fekal koliform bakteri şüpheli, m-Endo-NKS besiyerinde üreyen sarı yeşil metalik parlaklıkta ve pembe kırmızı renkte üreyen bakteri kolonileri koliform şüpheli, Azide-NKS besiyerinde üreyen pembe, kırmızıdan kırmızımsı kahverengine değişen renklerde üreyen bakteri kolonileri enterokok şüpheli olarak değerlendirilmişlerdir.

Gram boyama yöntemiyle incelenen ve Gram negatif olduğu tespit edilen koloniler saf kültüre alınmıştır. Koliform şüpheli kolonilere sitokrom oksidaz testi (BioMereux) yapılmış, oksidaz negatif koloniler sayısal değerlendirmeye alınmıştır. Fekal koliform şüpheli kolonilere sitokrom oksidaz (BioMereux) ve indol (HIMEDIA) testi yapılmıştır.

Oksidaz ve indol negatif sonuç veren koloniler koliform bakteriler olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz negatif, indol pozitif sonuç veren koloniler fekal koliform olarak değerlendirilmiş ve sayısal tanımlamaları KOB/100 ml (100 ml deniz suyunda koloni oluşturan birim) olarak üç tekrarın ortalaması alınarak yapılmış, sonuçlar üç örneğin ortalama değerleri hesaplanarak özetlenmiştir (APHA, 1998).

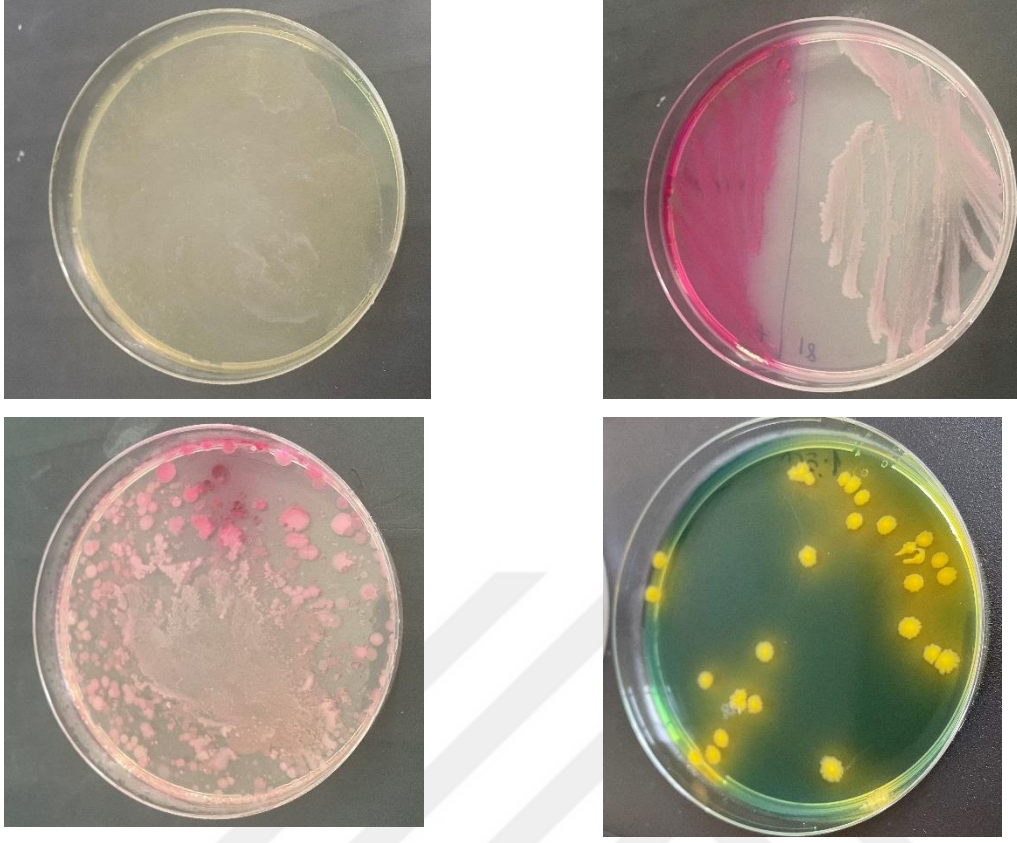


Şekil 2. Membran filtrasyon yöntemi (NKS pedleri)

Toplam Heterotrofik Aerobik Bakteri (HAB) Düzeyleri

Deniz suyu örneklerinin steril olarak hazırlanmış fosfat tamponlu distile su ile 10^{-6} 'ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmış, yüzeyi kurutulmuş Marine Agar (Difco 2216) besiyerinin yüzeyine mikropipet ile 0,1 ml dökülerek steril drigalski çubuğu yardımı ile yayılmıştır (Şekil 3).

Petri kapları 22 °C'de inkübe edilmiştir. 24 saat aralıklarla kontrol edilen plaklarda 72 saat sonrasında gelişen koloniler sayılmış ve üç paralel ekimin sonucunun ortalamaları standart sapmaları ile birlikte 100 ml deniz suyunda kültür edilebilen heterotrofik mezofilik aerobik bakteri düzeyi olarak kaydedilmiştir (Austin, 1988).



Şekil 3. Endo ve Marine Agar besiyerlerinde üreme sonrası bakteri izolatları

3.2.2. Bakteri Tür Teşhisi

Deniz suyu örneklerinden Marine Agar besiyerine yapılan ekimler sonucunda gelişen bakteriyel koloniler, mikroskopik morfolojileri dikkate alınarak tek tek seçilmiş, saflaştırılarak izole edilmiştir. Bu izolatlardan, tanımlama işlemlerinde kullanılmak üzere 18 saatlik taze saf kültürler hazırlanmıştır. Tür tayini ve metabolik özelliklerin belirlenmesinde VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, Fransa) adlı tam otomatik mikroorganizma tanımlama cihazı kullanılmıştır.

VITEK 2 sistemi, klinik ve çevresel mikrobiyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan, güvenilirliği yüksek bir cihazdır. Sistem; bakterilerin biyokimyasal profilleri, enzimatik aktiviteleri ve karbon kaynaklarını kullanma kapasiteleri gibi çeşitli metabolik özelliklerine dayalı olarak tanımlama yapar. Bu işlemi, içerisinde 64 kuyucuk bulunan kolorimetrik reaktif kartlar aracılığıyla gerçekleştirir. Her kuyucuk, spesifik bir substrat

içerir ve bakterilerin bu substratlarla girdiği reaksiyonlara göre renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimleri, cihaz tarafından optik olarak algılanarak değerlendirilir.

Sistem, bakterilerin asit üretimi (asidifikasyon), baz üretimi (alkalinizasyon), enzim hidrolizi, karbonhidrat fermentasyonu ve bazı inhibitör maddelere karşı direnç gibi biyokimyasal özelliklerini değerlendirir. Cihaz tarafından sağlanan standart oksijen transferi ve sabit inkübasyon koşulları, testlerin güvenilirliğini artırır. Kartların barkodları; kart tipi, üretim tarihi ve son kullanma tarihi gibi bilgileri içerir ve cihaz tarafından otomatik olarak tanınır.

Gram boyama ile elde edilen Gram karakterine ve bakterinin morfolojik özelliklerine göre aşağıdaki kart türleri seçilir:

GN kartlar: Gram-negatif fermentatif ve non-fermentatif basiller,

GP kartlar: Gram-pozitif koklar ve spor oluşturmayan basiller,

BCL kartlar: Gram-pozitif sporlu basiller,

YST kartlar: Maya ve benzeri ökaryotik mikroorganizmalar.

Kartların içeriği ve substrat sayısı kart türüne göre farklılık göstermektedir:

GN kartlar: 48 test substratı

GP kartlar: 43 test substratı

BCL kartlar: 46 test substratı

İnokülasyon işlemi öncesinde bakterilerin uygun besiyerlerinde yeterli yoğunlukta çoğaltılması gerekir. Elde edilen kültürlerin yaşı (18 saat), inkübasyon koşulları ve türbidite (bulanıklık) düzeyi cihazın çalışması açısından kritik öneme sahiptir. Türbidite ayarlamaları şu şekilde yapılır:

GN ve GP kartlar için: 0.50–0.63 McFarland

BCL kartlar için: 1.80–2.20 McFarland

Bu amaçla, 0.45–0.50% NaCl içeren (pH 4.5–7.0) steril çözeltiliden 3.0 mL alınarak 12×75 mm ebatlarında şeffaf plastik (polistiren) tüplere aktarılmıştır. Bakteri süspansiyonları, bu tüplerde uygun bulanıklık seviyesine getirilmiş ve ardından kartlara inoküle edilmiştir.

Kartların inkübasyon süresi yaklaşık 18–24 saat olup, kart tipine göre tanımlama süresi farklılık göstermektedir:

GP kartlar: Ortalama 8 saat

GN kartlar: Ortalama 10 saat

BCL kartlar: Ortalama 14 saat

İnkübasyon süresi sonunda, her test substratında meydana gelen renk değişimi optik sistemle ölçülür ve her bir kuyucuk için sonuçlar (+), (–), (+/–) şeklinde belirlenir. Parantez içindeki sonuçlar, zayıf reaksiyonları ifade eder ve sistem tarafından ek doğrulama gerekebileceği şeklinde yorumlanır.

Cihazın içinde yer alan güncellenebilir referans veritabanı, reaksiyon profillerini analiz ederek mikroorganizmanın cins ve tür düzeyinde tanımlanmasını sağlar. Bu tanımlama, genellikle belirli bir güven yüzdesi (%ID) ile birlikte raporlanır. Güven yüzdesi, tanımlamanın doğruluğu hakkında bilgi verir ve kullanıcıya gerekirse alternatif veya ek testler yapma imkanı sunar.

Bu çalışma kapsamında, deniz suyundan izole edilen çevresel bakterilerin tanımlanmasında VITEK 2 Compact 30 cihazının kullanılması; hızlı, güvenilir ve standardize bir yöntem olarak çevresel mikrobiyoloji çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır. Elde edilen veriler hem bakteri çeşitliliğinin belirlenmesi hem de olası

patojen türlerin tespiti açısından değerlidir. Çalışma da kullanılan test substratlarının detayları ve reaksiyon profilleri Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'te sunulmuştur (Pincus, 2005; Çardak vd., 2014).

3.2.3. Bakteri İzolasyonu

Öncelikle, Marine Agar, m-FC ve m-Endo gibi besiyerlerinde inkübasyon sonrasında gelişen kolonilerin morfolojik özellikleri kaydedilerek Gram boyama yapılmıştır (Harley ve Prescott, 1999). Gram negatif çomaklar tespit edildiğinde, kolonilerin sitokrom oksidaz aktivitesi test edilmiştir. Bu amaçla, filtre kâğıdına damlatılan %1'lik dimetil-p-fenilendiamin hidroklorid solüsyonuna (filtre kâğıdının maviye boyanmamış olduğundan emin olunarak) steril öze yardımıyla koloniden alınan numune yayılmış; 10 saniye içinde mavi renk oluşumu gözlemlendiğinde sonuç oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gram negatif tanısı alan suşlar, 18 saatlik Lauryl Sülfat Broth (LSB) zenginleştirme aşamasının ardından Nutrient agar ve Endo agar ortamlarına pasaj edilmiştir (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2007; Bekar, 1997; Hitchins, 1992).

Deniz suyu örneklerinden Marine Agar'da üreyen koloniler, saf kültür elde etmek amacıyla Müller Hilton Agar'a ekilmiş ve bu ortamda 18 saat inkübe edilerek sonrasında VITEK 2 Compact 30 otomatik sistem (bioMérieux) ile tür düzeyinde tanımlanmaya hazırlanmıştır.

3.2.4. Ağır Metal Analizleri

Bu aşamada, izole edilen bakterilerin ağır metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırma kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, bakteri izolatları öncelikle MRS broth veya Müller Hinton broth içinde 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek çoğaltılmış ve kültürler McFarland 1 türbidite standardına ayarlanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonlarına, 10 ppm düzeyinde farklı ağır metaller (As, Cu, Hg, Zn, Fe, Cd, Co, Cr, Pb, Ni) ayrı ayrı ilave edilmiştir.

Hazırlanan süspansiyonlar 37 °C’de 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra 300 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant faz elde edilmiştir. Süpernatantlarda kalan ağır metal konsantrasyonları Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) kullanılarak analiz edilmiştir. Bakterilerin ağır metalleri uzaklaştırma etkinliği aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{Uzaklaştırma} = (\text{İlk Konsantrasyon} - \text{Son Konsantrasyon} / \text{İlk Konsantrasyon}) \times 100$$

Ağır metal biyoutaklaştırma sürecinde bakteriler; hücre yüzeyinde bulunan karboksil, hidroksil, amin ve fosfat gibi fonksiyonel gruplar aracılığıyla metallerle kompleks oluşturabilir veya hücre içine alarak detoksifiye edebilirler (Volesky, 2001; Gadd, 2010). Bu süreçler, biosorpsiyon, biyopresipitasyon, biyokümülyasyon ve enzimatik redüksiyon gibi çeşitli mekanizmaları içermektedir.

Literatürde yapılan çalışmalar, özellikle *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* ve *Enterobacter* gibi türlerin kadmiyum, kurşun, cıva ve arsenik gibi ağır metallerin uzaklaştırılmasında yüksek biyosorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir (Gupta ve Rastogi, 2008; Wang, Chen, 2009; Park vd., 2010). Bu kapasitenin; metal iyonunun türüne, başlangıç konsantrasyonuna, çözeltinin pH'ına, sıcaklığa ve mikrobiyal türün özelliklerine göre değişiklik gösterebildiği bildirilmiştir (Wang, Chen, 2009).

Bu çalışmada elde edilen veriler, söz konusu bakteri izolatlarının çevresel ortamlardaki ağır metal kirliliğinin biyolojik yöntemlerle giderilmesinde potansiyel biyoremediasyon ajanları olarak değerlendirilebileceğini göstermeyi amaçlamaktadır.

İzolatlardan Ağır Metal Giderimi Analizi

Bu aşamada, probiyotik potansiyeli taşıyan suşlar arasından sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitesi en yüksek olanların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Pazirandeh vd., (1998) tarafından tanımlanan yöntem esas alınacaktır. Taze olarak kültüre edilen bakterilerden 2 mL’lik örnekler Eppendorf tüplere alınarak yüksek devirde santrifüj edilecektir. Elde edilen hücre pelletleri steril saf su ile iki kez yıkandıktan

sonra, her biri 1000–6000 µg/L konsantrasyona sahip steril ağır metal çözeltileri ile 37 °C’de 2 saat süreyle inkübe edilecektir.

İnkübasyon sonrasında, örnekler 8000 g kuvvetinde 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant faz elde edilecektir. Bu süpernatantlar, metal içeriklerinin analizinde Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi AAS (AA-6800, Shimadzu, Kyoto, Japan) ile cihazında analiz edilecektir.

Ağır metal uzaklaştırma etkinliği (% giderim) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanacaktır:

$$\%Giderim = \frac{(A_{\text{ağır metal konsantrasyonundaki azalma}})}{(Başlangıçtaki ağır metal konsantrasyonu)} \times 100$$

Ayrıca, metal uzaklaştırma etkinliği (MUE) değeri aşağıdaki şekilde hesaplanacaktır:

$$MUE = \frac{(C_i - C_f)}{(t_f - t_i)}$$

Burada:

C: Suda ağır metal konsantrasyonu için belirlenmiştir.

C_i: Başlangıçtaki ağır metal konsantrasyonu (µg/L)

C_f: Sonundaki ağır metal konsantrasyonu (µg/L)

t: Zaman (saat)

t_i: Başlangıç zamanı

t_f: Sonuç zamanı

M: Bakteri hücre kütlesi (mg)

MUE: Metal Uzaklaştırma Etkinliği

Bu ölçümler sonucunda, sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitesi en yüksek olan suşlar belirlenerek ileri analizlere alınacaktır.

Belirlenen bu suşlar, (Bhakta vd., 2012) yöntemine uygun olarak MRS besiyerinde 10 mg/L konsantrasyonunda ağır metal içeren ortamlarda, anaerobik koşullarda ve 37 °C sıcaklıkta 0., 6., 12. ve 24. saatlerde inkübe edilecektir. Her zaman noktasında örnekler santrifüj edilerek süpernatant faz AAS ile analiz edilecektir. Ayrıca, ağır metal konsantrasyonundaki değişimi kontrol edebilmek için bakteri içermeyen kontroller de çalışmaya dahil edilecektir. Her örnekteki ağır metal giderimi, yüzde giderim oranı şeklinde hesaplanarak değerlendirilecektir.

Bu yöntemle hem zaman içerisindeki giderim kinetiği hem de maksimum uzaklaştırma kapasitesi belirlenerek, çevresel biyoremediasyon açısından en etkili suşlar ortaya konacaktır (Pazirandeh vd., 1998; Bhakta vd., 2012).

3.3. İstatistiksel Analiz

Ağır metal dirençlilik verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS (12.0 sürümü, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yazılımı kullanılacaktır (Benesty vd., 2009). Pearson korelasyon analizi ile çoklu antibiyotik direnci (MAR) ve çoklu ağır metal direnci (MHMR) arasında 0.05 anlamlılık düzeyinde ilişki olup olmadığı incelenecektir (Maipa vd., 2001; Matyar vd., 2008; Erdem vd., 2017). Böylece, ağır metal direncinin antibiyotik direnciyle bağlantısı da ortaya konabilecektir (Kartly ve Ranjitha, 2011; Silva vd., 2012; Matyar, 2012; Erdem vd., 2015; Gillard vd., 2019).

3.4. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Tablo 2

VITEK 2 Compact 30 sisteminde Gram-Negatif izolatlar için metabolik tanı testlerinde kullanılan substratlar

Kısaltma	Test İsmi	Kısaltma	Test İsmi
APPA	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	SAC	SACCHAROSE/SUCROSE
ADO	ADONITOL	dTAG	D-TAGATOSE
	L-Pyrrolydonyl-		
PyrA	ARYLAMIDASE	dTRE	D-TRHALOSE
IARL	L-ARABITOL	CIT	CITRATE (SODIUM)
dCEL	D-CELLOBIOSE	MNT	MALONATE
BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	5KG	5-KETO-D-GLUCONATE
H2S	H2S PRODUCTION	ILATk	L-LACTATE alkalinisation
	BETA-ACETYL-		
BNAG	GLUCOSAMINIDASE	AGLU	ALPHA-GLUCOSIDASE
AGLTp	Glutamyl Arylamidase pNA	SUCT	SUCCINATE alkalinisation
			Beta-N-NCETYL-
dGLU	D-GLUCOSE	NAGA	GALACTOSAMINIDASE
	GAMMA-GLUTAMYL-		
GGT	TRANSFERASE	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE
OFF	FERMENTATION/GLUCOSE	PHOS	PHOSPHATASE
BGLU	BETA-GLUCOSIDASE	GlyA	Glycine ARYLAMIDASE
dMAL	D-MALTOSE	ODC	ORNITHINE DECARBOXYLASE
dMAN	D-MANNITOL	LDC	LYSINE DECARBOXYLASE
dMNE	D-MANNOSE	IHISa	L-HISTIDINE assimilation
BXYL	BETA-XYLOSIDASE	CMT	COUMARATE
BAlap	BETA-Alanine arylamidase pNA	BGUR	BETA-GLUCORONIDASE
ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	O129R	O/ 129 RESISTANCE (comp.vibrio)
LIP	LIPASE	GGAA	Glu-Gyl-Arg-ARYLAMIDASE
PLE	PALATINOSE	IMLTa	L-MALATE assimilation
TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	ELLM	ELLMAN
URE	UREASE	ILATa	L-LACTATE assimilation
dSOR	D-SORBITOL		

Tablo 3

VITEK 2 Compact 30 Sisteminde Gram-Pozitif izolatlar için Metabolik Tanı Testlerinde kullanılan Substratlar

Kısaltma	Test İsmi	Kısaltma	Test İsmi
AMY	D-AMYGDALIN PHOSPHATIDYLINOSITOL	POLYB	POLYMIXIN B RESISTANCE
PIPLC	PHOSPHOLIPASE C	dGAL	D-GALACTOSE
dXYL	D-XYLOSE	dRIB	D-RIBOSE
ADH1	ARGININE DIHYDROLASE 1	ILATk	L-LACTATE alkalinization
BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	LAC	LACTOSE N-ACETYL-D-
AGLU	ALPHA-GLUCOSIDASE	NAG	GLUCOSAMINE
APPA	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	dMAL	D-MALTOSE
CDEX	CYCLODEXTRIN	BACI	BACITRACIN RESISTANCE
AspA	L-Aspartate ARYLAMIDASE BETA	NOVO	NOVOBIOCIN RESISTANCE
BGAR	GALACTOPYRANOSIDASE	NC6.5	GROWTH IN 6.5% NaCl
AMAN	ALPHA-MANNOSIDASE	dMAN	D-MANNITOL
PHOS	PHOSPHATASE	dMNE	D-MANNOSE METHYL-B-D-
LeuA	Leucine ARYLAMIDASE	MBdG	GLUCOPYRANOSIDE
ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	PUL	PULLULAN
BGURr	BETA-GLUCURONIDASE	dRAF	D-RAFFINOSE
AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	O129R	O/129 RESISTANCE
PyrA	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	SAL	SALICIN
BGUR	BETA-GLUCURONIDASE	SAC	SACCHAROSE/SUCROSE
AlaA	Alanine ARYLAMIDASE	dTRE	D-TREHALOSE
TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	ADH2s	ARGININE DIHYDROLASE 2
dSOR	D-SORBITOL	OPTO	OPTOCHIN RESISTANCE
URE	UREASE		

Tablo 4

VITEK 2 Compact 30 Sisteminde Bacilli izolatlar için Metabolik Tanı Testlerinde kullanılan Substratlar

Kısaltma	Test İsmi	Kısaltma	Test İsmi
BXYL	BETA-XYLOSIDASE	dMAN	D-MANNITOL
LysA	L-Lysin-ARYLAMIDASE	dMNE	D-MANNOSE
AspA	L-Aspartate ARYLAMIDASE	dMLZ	D-MELEZITONE
			N-AECETYL-D-
LeuA	Leucine-ARYLAMIDASE	NAG	GLUCOSAMINE
PheA	Phenylalanine ARYLAMIDASE	PLE	PALATINOSE
ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	IRHA	L-RHAMNOSE
BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	BGLU	BETA-GLUCOSIDASE
PyrA	L-Pyrrolydonly-ARYLAMIDASE	BMAN	BETA-MANNOSIDASE
AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	PHC	PHOSPHORYL CHOLINE
AlaA	Alanine ARYLAMIDASE	PVATE	PYRUVATE
TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	AGLU	ALPHA-GLUCOSIDASE
	BETA-N-ACETYL-		
BNAG	GLUCOSAMINIDASE	dTAG	D-TAGATOSE
APPA	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	dTRE	D-TREHALOSE
CDEX	CYCLODEXTRIN	INU	INULIN
dGAL	D-GALACTOSE	dGLU	D-GLUCOSE
GLYG	GLYCOGEN	dRIB	D-RIBOSE
INO	myo-INOSITOL	PSCNa	PUTRESCINE 6,5 % NaCl
	METHYL-A-D-		KANAMYCIN
MdG	GLUCOPYRANOSIDDE acidification	KAN	RESISTANCE
			OLEANDOMYCIN
ELLM	ELLMAN	OLD	RESISTANCE
McX	METHYL-D-XYLOSIDE	ESC	ESCULIN hydrolsis
AMAN	ALPHA-MANNOSIDASE	TTZ	TETRAZOLIUM RED
			POLYMIXIN_B
MTE	MALTOTRIOSE	POLYB_R	RESISTANCE
GlyA	Glycine ARYLAMIDASE		

3.4.1. Bakteriyolojik Tanı Yöntemlerinde Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasal Maddeler

Marine Agar Besiyeri

Marine Agar..... 55.25 g

Distile Su.....1000 ml

55.25 g dehidre toz Marine Agar 1000 ml distile su içerisinde tamamen çözündürülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve steril petri kaplarına dökülerek aerobik heterotrofik bakterilerin sayımında kullanılmıştır (Kayser, 2005).

Marine Broth Besiyeri

Marine Broth..... 34.7 g

Distile Su.....1000 ml

34.7 g dehidre toz Marine Agar 1000 ml distile su içerisinde tamamen çözündürülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır (Kayser, 2005).

3.5. Ağır Metal Dirençlilik Testleri

3.5.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Bu çalışmada, izolatların ağır metallere karşı dirençlilik düzeylerini belirlemek amacıyla Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) testleri kullanılmıştır. MİK, bir mikroorganizmanın büyümesini engelleyen en düşük madde konsantrasyonunu belirlemeye yönelik standart bir yöntemdir ve bu çalışmada broth mikrodilüsyon yöntemi esas alınmıştır (Maipa vd., 2001; Matyar vd., 2008; Erdem vd., 2017).

Seçilen ağır metal tuzlarının tanısı yapılan izolatlar için minimum inhibe edici dozunu tespit etmek amacı ile farklı ağır metal solüsyonları kullanarak Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) testleri yapılmıştır.

Öncelikle MRS broth içinde üretilen izolatların optik yoğunluğu (OD₆₀₀) 0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Araştırma kapsamında, bölgede önceden saptanan kirlilik etkenleri ve literatürde sık rastlanan ağır metallerin (örneğin Cd, Pb, Cr vb.) suşları kullanılmıştır. Her metalin stok çözeltisi 1000 mM şeklinde hazırlanıp, 0,22 µm por açıklığı bulunan filtre yardımıyla sterilize edilmiştir.

Deneylerde, farklı ağır metal tuzları kullanılarak hazırlan ağır metal solüsyonları 0,45 µm por çaplı filtreden (Millipore) süzülerek steril edildikten sonra kullanılmıştır. MİK deneylerinde 96 kuyucuklu “U” tabanlı kuyucuk bulunan steril mikro tutucular kullanılmıştır (Şekil 4).

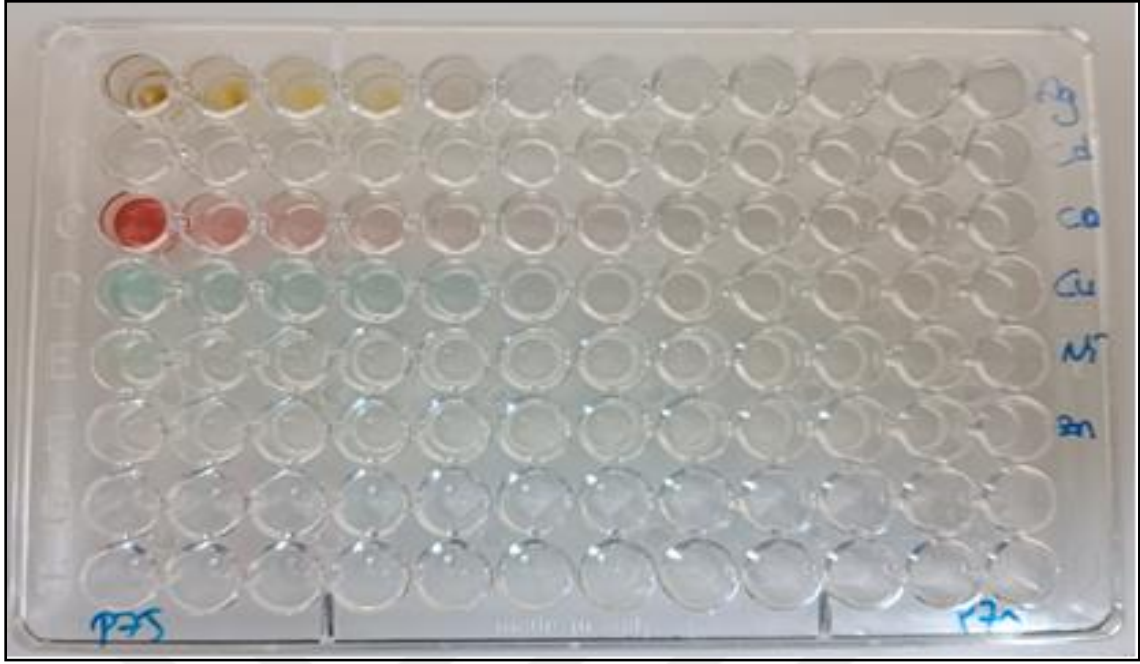
Hazırlanan ağır metal solüsyonu, ilk kuyucukta 50 µl son kuyucukta 0.004 µl olacak şekilde steril distile su ile seyreltilerek mikro pipet yardımı ile sırasıyla kuyucuklara koyulmuştur. Daha sonra ilk kuyucuktan başlayarak son kuyucuğa kadar, laktoz buyyon kültürlerinden alınarak Mc Farland 0,5 bulanıklığa göre ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) ayarlanarak önceden hazırlanan 50 µl bakteri solüsyonu eklenmiştir (Tablo 4). 12 numaralı son kuyucuğa sadece steril distile su ve bakteri solüsyonu eklenerek MİK testinin pozitif kontrolü oluşturulmuştur. Kuyucukların ortasında beyaz ve/veya krem rengi oluşumların görülmesi bakteri üremesinin gerçekleştiğini göstermiş, sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Geiselbrecht vd., 1996, Rahman vd., 2004).

Tablo 5

Bakterilere uygulanan ağır metal miktarları

Kuyucuk Numarası	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µl ağır metal	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.004	-
µl steril distile su	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
µl Bakteri	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Ağır metal dirençlilik testlerinde referans olarak standart *E.coli* ATCC 35218, *S. epidermidis* ATCC 12228 ve *Salmonella enterica* ATCC 2577 suşları kullanılmıştır.



Şekil 4. Ağır metal MİK deneylerinde kullanılan 96 adet mikro tutucu bulunan plate görünümü

İnkübasyon sonrasında kuyucuklarda bulanıklık oluşumu gözlenerek üreme pozitif ve negatif değerlendirmeler yapılmış ve bu değerlendirmeye gözle üremenin sonlandığı ilk konsantrasyonlar ağır metallerin minimum inhibe edici konsantrasyonları olarak kaydedilmiştir (Geiselbrecht vd.,1996).

Ayrıca, mikrolateler bir mikrolaka okuyucu (600 nm) ile tüm plakalar okunmuştur. Mikrolaklar kantitatif absorbans değerleri değerlendirilmiş (Şekil 5) ve görünür büyüme verileriyle karşılaştırılmıştır. Ağır metal solüsyonlarına karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları mM cinsinden hesaplanmıştır. En son kuyucukta negatif kontrol olarak *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) referans suşu kullanılmıştır (Hassen vd., 1998; Matyar vd., 2008; Erdem vd., 2017; Bhardwaj vd., 2018).



Şekil 5. Thermo marka Mikroplate okuyucu (absorbans 600nm)

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

4.1. İndikatör Bakteri Düzeyleri

Çanakkale İli kıyı sularında belirlenen 13 istasyondan alınan deniz suyu örneklerinde bakteriyolojik kirlilik indikatörü olarak toplam koliform, fekal koliform ve enterokok düzeyleri ortalamaları şekil 2’de özetlenmiştir. Toplam koliform düzeyi en yüksek Çanakkale-İntepe istasyonun da tespit edilirken, fekal koliform düzeyi ise Gökçeada istasyonunda daha düşüktür. Çanakkale-Merkez ve Lapseki istasyonlarında enterokok düzeylerinin Karabiga ve Kadırğa Koyu istasyonlarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 6).

Tablo 6

Çanakkale Boğazın’da alınan deniz suyu örneklerinde ortalama Toplam Koliform (TK), Fekal Koliform (FK) ve enterokok (FS) düzeyleri KOB/100 mL

İstasyonlar	Bölge	İst	TK	FK	FS
Küçükkuşu Liman önü	Küçük kuyu	KÜ	10x10 ²	<10	19
Ayvacık Assos Antik Liman Önü	Ayvacık	AY	12x10 ²	10	<10
Geyikli Odunluk İskelesi	Ezine	EZ	13x10 ²	25	50
İntepe Merkez Gençlik kampı		ÇG	67x10³	24	47
Dardanos Merkez Plajı		Çİ	40x10³	31	31
Kepez Belediye Halk Plajı		ÇK	47x10³	24x10	36x10
Çanakkale Belediye Halk Plajı	Çanakkale Merkez	ÇH	49x10²	69x10	35x10
Gelibolu-Hamzakoy Plajı		GH	11x10 ²	<10	42
Ecebat- Kabatepe Orman Kampı	Gelibolu	GE	6x10 ²	<10	<10
Biga -Kemer Halk Plajı	Biga	Bİ	18x10 ²	<10	<10
Lapseki Halk Plajı	Lapseki	LP	93x10²	11 x10 ¹	65x10
Bozcaada	Bozcaada	BO	20x10 ²	20	94x10
Gökçeada- kaleköy	Gökçeada	GÖ	81x10 ²	68	27

Bu bölgede total koliform ile fekal koliform ve enterokokarasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0,001$), ancak enterokok ile fekal koliform arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Fekal koliform/enterokok oranı incelendiğinde, FK/FS oranının 0,341-2,409 arasında dağılım gösterdiği, en yüksek oranın Temmuz ayında olduğu saptanmıştır. Çanakkale İli kıyı sularında yer alan 13 istasyondan alınan deniz suyu örneklerinde bakteriyolojik kirlilik indikatörü olarak toplam koliform (TK), fekal koliform (FK) ve enterokok (FS) düzeyleri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerde, toplam koliform düzeyinin en yüksek olduğu istasyonun İtepe Merkez Gençlik Kampı (ÇG) olduğu, fekal koliform düzeyinin ise en düşük Gökçeada-Kaleköy (GÖ) istasyonunda gözlemlendiği belirlenmiştir.

Küçükkuyu Liman Önü (KÜ) istasyonunda TK düzeyi 10×10^2 KOB/100 mL, FK düzeyi <10 KOB/100 mL ve FS düzeyi 19 KOB/100 mL olarak ölçülmüştür. Ayvacık Assos Antik Liman Önü (AY) istasyonunda TK düzeyi 12×10^2 KOB/100 mL, FK 10 KOB/100 mL, FS ise <10 KOB/100 mL düzeyinde kaydedilmiştir. Geyikli Odunluk İskelesi (EZ) istasyonunda TK 13×10^2 , FK 25 ve FS 50 KOB/100 mL olarak ölçülmüştür.

İtepe Merkez Gençlik Kampı (ÇG) istasyonunda TK değeri 67×10^3 KOB/100 mL, FK 24 ve FS 47 KOB/100 mL düzeyindedir. Dardanos Merkez Plajı (Çİ) istasyonunda TK 40×10^3 , FK 31, FS ise 31 KOB/100 mL olarak ölçülmüştür. Kepez Belediye Halk Plajı (ÇK) istasyonunda ise TK 47×10^3 , FK 24×10 ve FS 36×10 KOB/100 mL olarak tespit edilmiştir.

Çanakkale Belediye Halk Plajı (ÇH) istasyonunda TK düzeyi 49×10^2 , FK 69×10 ve FS 35×10 KOB/100 mL olarak belirlenmiştir. Gelibolu-Hamzakoy Plajı (GH) istasyonunda TK 11×10^2 , FK <10 ve FS 42 KOB/100 mL düzeyindedir. Ecebat-Kabatepe Orman Kampı (GE) istasyonunda TK 6×10^2 , FK <10 ve FS <10 KOB/100 mL olarak ölçülmüştür.

Biga-Kemer Halk Plajı (Bİ) istasyonunda TK düzeyi 18×10^2 , FK <10 ve FS <10 KOB/100 mL olarak belirlenmiştir. Lapseki Halk Plajı (LP) istasyonunda TK 93×10^2 , FK 11×10^1 ve FS 65×10 KOB/100 mL olarak kaydedilmiştir. Bozcaada (BO) istasyonunda TK 20×10^2 , FK 20 ve FS 94×10 KOB/100 mL değerleri tespit edilmiştir.

Gökçeada-Kaleköy (GÖ) istasyonunda ise TK değeri 81×10^2 , FK 68 ve FS 27 KOB/100 mL düzeyindedir. Toplam koliform ile fekal koliform ve enterokok düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Ancak enterokok ile fekal koliform düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0,05$). FK/FS oranı 0,341 ile 2,409 arasında değişmekte olup, bu oranın en yüksek değeri Temmuz ayında kaydedilmiştir.

4.2. Toplam Heterotrofik Aerobik Bakteri (HAB) Düzeyleri

Kasım 2022 – Ekim 2023 tarihleri arasında Çanakkale Boğazı kıyı örneklemesinde belirlenen 13 istasyondan alınan yüzey suyu örneklerinde toplam kültür edilebilir heterotrofik aerobik bakteri (HAB) düzeylerinin örnekleme dönemlerine göre dağılımı Tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7

Kasım 2022 – Ekim 2023 tarihleri arasında istasyonlarda tespit edilen HAB düzeyleri

	Kış 2022	İlkbahar 2023	Yaz 2023	Sonbahar 2023
Küçükkuşu Liman önü	18×10^3	18×10^5	24×10^5	95×10^2
Ayvacak Assos Antik Liman Önü	15×10^3	15×10^5	92×10^4	50×10^3
Geyikli Odunluk İskelesi	17×10^3	17×10^5	27×10^5	25×10^3
İntepe Merkez Gençlik kampı	20×10^3	20×10^5	27×10^5	52×10^3
Dardanos Merkez Plajı	29×10^3	29×10^5	31×10^5	66×10^4
Kepez Belediye Halk Plajı	71×10^3	72×10^5	24×10^6	14×10^5
Çanakkale Belediye Halk Plajı	38×10^5	40×10^6	34×10^7	47×10^3
Gelibolu-Hamzakoy Plajı	53×10^2	83×10^4	31×10^5	12×10^5
Ecebat- Kabatepe Orman Kampı	64×10^2	14×10^5	29×10^5	58×10^3
Biga -Kemer Halk Plajı	15×10^3	15×10^5	30×10^5	52×10^3
Lapseki Halk Plajı	11×10^3	11×10^5	19×10^5	49×10^4
Bozcaada	62×10^3	13×10^5	27×10^5	95×10^4
Gökçeada- Kaleköy	38×10^5	38×10^7	34×10^6	47×10^3

Çalışma dönemi boyunca elde edilen en yüksek heterotrofik aerobik bakteri sayısı 34×10^7 KOB/100 ml olarak 2023 yaz mevsimi örnekleme döneminde Çanakkale Belediye Halk Plajı istasyonunda kaydedilirken, en düşük heterotrofik aerobik bakteri sayısı 53×10^2 KOB/100 ml olarak 2022 kış mevsimi örnekleme Gelibolu-Hamzakoy Plajı döneminde istasyonunda kaydedilmiştir. Kasım 2022 – Ekim 2023 tarihleri arasında Çanakkale Boğazı kıyı örneklemeleri kapsamında belirlenen 13 istasyondan alınan yüzey suyu örneklerinde toplam kültür edilebilir heterotrofik aerobik bakteri (HAB) düzeylerinin dönemsel dağılımı değerlendirilmiştir. Küçükkuyu Liman Önü istasyonunda kış 2022 döneminde 18×10^3 , ilkbahar 2023'te 18×10^5 , yaz 2023'te 24×10^5 ve sonbahar 2023'te 95×10^2 KOB/100 mL düzeyinde ölçüm yapılmıştır. Ayvacık Assos Antik Liman Önü istasyonunda sırasıyla 15×10^3 , 15×10^5 , 92×10^4 ve 50×10^3 KOB/100 mL değerleri kaydedilmiştir. Geyikli Odunluk İskelesi istasyonunda ise HAB düzeyleri sırasıyla 17×10^3 , 17×10^5 , 27×10^5 ve 25×10^3 KOB/100 mL olarak belirlenmiştir.

İntepe Merkez Gençlik Kampı istasyonunda kış döneminde 20×10^3 , ilkbaharda 20×10^5 , yaz mevsiminde 27×10^5 ve sonbaharda 52×10^3 KOB/100 mL HAB düzeyine ulaşılmıştır. Dardanos Merkez Plajı'nda 29×10^3 , 29×10^5 , 31×10^5 ve 66×10^4 KOB/100 mL düzeyinde HAB tespit edilmiştir. Kepez Belediye Halk Plajı'nda 71×10^3 , 72×10^5 , 24×10^6 ve 14×10^5 KOB/100 mL HAB yoğunluğu gözlemlenmiştir.

Çanakkale Belediye Halk Plajı'nda ise kış döneminde 38×10^5 , ilkbaharda 40×10^6 , yaz mevsiminde 34×10^7 ve sonbaharda 47×10^3 KOB/100 mL HAB ölçümü yapılmıştır.

Gelibolu-Hamzakoy Plajı'nda kış 2022 döneminde 53×10^2 , ilkbaharda 83×10^4 , yaz döneminde 31×10^5 ve sonbaharda 12×10^5 KOB/100 mL HAB değerlerine ulaşılmıştır. Ecebat-Kabatepe Orman Kampı'nda bu değerler sırasıyla 64×10^2 , 14×10^5 , 29×10^5 ve 58×10^3 KOB/100 mL olarak tespit edilmiştir.

Biga-Kemer Halk Plajı'nda kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar dönemlerinde sırasıyla 15×10^3 , 15×10^5 , 30×10^5 ve 52×10^3 KOB/100 mL düzeyinde HAB saptanmıştır. Lapseki Halk Plajı'nda aynı dönemlerde 11×10^3 , 11×10^5 , 19×10^5 ve 49×10^4 KOB/100 mL HAB düzeyleri gözlemlenmiştir. Bozcaada istasyonunda 62×10^3 , 13×10^5 , 27×10^5 ve 95×10^4 KOB/100 mL HAB değerleri ölçülmüştür. Gökçeada-Kaleköy istasyonunda ise kış 2022'de 38×10^5 ,

ilkbahar 2023'te 38×10^7 , yaz 2023'te 34×10^6 ve sonbahar 2023'te 47×10^3 KOB/100 mL HAB yoğunlukları kaydedilmiştir.

Tüm çalışma dönemi boyunca elde edilen en yüksek heterotrofik aerobik bakteri düzeyi 34×10^7 KOB/100 mL ile 2023 yazında Çanakkale Belediye Halk Plajı istasyonunda, en düşük düzey ise 53×10^2 KOB/100 mL ile 2022 kış döneminde Gelibolu-Hamzakoy Plajı istasyonunda tespit edilmiştir.

4.3. İzole Edilen Bakteri Türleri

Tüm örnekleme dönemleri boyunca istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinde bakteri tür dağılımının belirlenmesi için yapılan analizlerde farklı morfolojik özellikleri, örnekleme mevsimi ve istasyonlara göre seçilen 118 koloni izole edilmiş ve bu koloniler saflaştırılarak tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

VITEK mikro identifikasyon sisteminde 159 izolattan 118 tanesi tanımlanmış (good identificatin), 15 tanesi düşük tanımlama (low discrimination) ve 26 tanesi ise tanımlanamamış (unidentified) olarak kaydedilmiştir. Tanımlamaları yapılan izolatların tür isimleri, sayıları ve izolasyon sıklığı (%) verileri aşağıda özetlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 8

Çanakkale Boğazı'ndan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen bakterilerin % dağılımı

İzolat Adı	İzolasyon Sıklığı %
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (Bouvet and Grimont 1986)	1,18
<i>B. mycoides</i> Flügge 1886	8,26
<i>B. pumilus</i> Meyer and Gottheil 1901	2,36
<i>B. thuringiensis</i> Berliner 1915	10,62
<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland 1887	25,96
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary 1884	7,08
<i>Burkholderia mallei</i> (Zopf 1885) Yabuuchi vd., 1993	8,26

Tablo 8'in devamı

<i>Citrobacter braakii</i> Brenner vd., 1993	1,18
<i>Citrobacter freundii</i> (Braak 1928) Werkman and Gillen 1932[	1,18
<i>E. faecalis</i> (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984	3,54
<i>Enterobacter aerogenes</i> Hormaeche and Edwards 1960	1,18
<i>Enterobacter cloaceae</i> (Jordan 1890) Hormaeche and Edwards 1960	1,18
<i>Enterobacter sakazakii</i> (Farmer vd., 1980)	2,36
<i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes and Horder, 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984	3,54
<i>Escherichia coli</i> Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919	10,62
<i>Klebsiella ornithiolytica</i>	2,36
<i>Klebsiella oxytoca</i> (Flügge 1886) Lautrop 1956	1,18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter 1886) Trevisan 1887	3,54
<i>Pantoea agglomerans</i> (Ewing and Fife 1972) Gavini vd., 1989	1,18
<i>Proteus mirabilis</i> Hauser, 1885	1,18
<i>Proteus vulgaris</i> Hauser, 1885	1,18
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula 1895	5,9
<i>Raoultella planticola</i> (Bagley vd., 1982) Drancourt vd., 2001	1,18
<i>S. intermedius</i> Hajek 1976	1,18
<i>Salmonella enterica</i> Le Minor & Popoff 1987	3,54
<i>Serratia marcescens</i> Bizio 1823	1,18
<i>Serratia plymuthica</i> (Lehmann and Neumann 1896) Breed vd., 1948 1 0,8	2,36
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (Holmes vd., 1977) Yabuuchi vd., 1990 26	20,6
	8,26
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Devriese vd., 2005	9,44
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993	3,54
<i>Streptococcus uberis</i> Diernhofer 1932 (Approved Lists 1980)	2,36
<i>Vibrio alginolyticus</i> (Miyamoto vd., 1961) Sakazaki 1968 3 2,4	1,18

Rastlanma sıklığı % 25,96 ile en yüksek olan bakteri türü *Bacillus cereus*, %10,62 rastlanma sıklığı ile *B. thuringiensis* takip ettiği tespit edilmiştir. *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloaceae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Raoultella*

planticola, *Salmonella intermedius*, *Serratia marcescens*, *Vibrio alginolyticus* suşlarının rastlanma sıklığı ise %1,18 şeklinde tespit edilmiştir (Tablo 8). Tüm örnekleme dönemleri boyunca Çanakkale Boğazı'ndaki çeşitli istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinde yapılan analizler sonucunda farklı morfolojik özelliklere sahip 118 koloni izole edilmiş ve saflaştırılarak tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. VITEK mikro identifikasyon sistemi kullanılarak yapılan tanımlamalarda toplam 159 izolattan 118'i doğru şekilde tanımlanmış, 15'i düşük tanımlama düzeyinde kalmış ve 26'sı tanımlanamamıştır. Tanımlanan izolatlar arasında en yüksek izolasyon sıklığına sahip bakteri türü %25,96 oranıyla *Bacillus cereus* olmuştur. Bu türü %10,62 oranlarıyla *Bacillus thuringiensis* ve *Escherichia coli* takip etmiştir. *Staphylococcus pseudintermedius* türü %9,44, *Bacillus mycoides* ve *Burkholderia mallei* türleri %8,26 oranlarında tespit edilmiştir. Aynı sıklıkta (%8,26) *Sphingomonas paucimobilis* türü de izole edilmiştir. *Bacillus megaterium* %7,08, *Pseudomonas fluorescens* %5,9, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Klebsiella pneumoniae* türleri ise %3,54 oranlarında tespit edilmiştir.

Bacillus pumilus, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Streptococcus uberis* ve *Serratia plymuthica* türlerinin her biri %2,36 oranında izole edilmiştir. *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Raoultella planticola*, *Staphylococcus intermedius*, *Serratia marcescens* ve *Vibrio alginolyticus* türlerinin her biri ise %1,18 oranında rastlanmıştır. Bu bulgular, izole edilen suşların tür dağılımlarını ve sıklıklarını göstermektedir

Tanımlanan izolatların sınıf ve familya dağılımları aşağıdaki tablo ve şekil ile özetlenmiştir (Tablo 9). İzolatların ait olduğu sınıflar içerisinde baskın sınıf *Gamma Proteobacteria* olurken, en fazla tür sayısı ile temsil edilen familyanın ise *Enterobacteriaceae* familyası olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 9

Çanakkale Boğazı kıyı örneklerinden izole edilen izolatların sınıf ve familya dağılımları

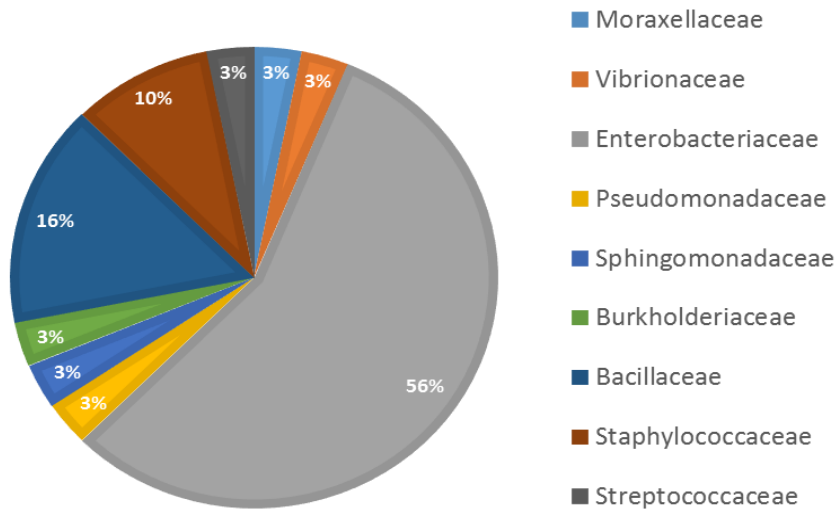
Sınıf	Familya	Tür
Gamma Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	Vibrionaceae	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		<i>Escherichia coli</i>
		<i>Pantoea agglomerans</i>
		<i>Serratia plymuthica</i>
		<i>Serratia marcescens</i>
	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i>
		<i>Citrobacter braakii</i> Brenner
		<i>Cronobacter sakazakii</i>
		<i>E. faecalis</i>
		<i>Enterobacter aerogenes</i>
		<i>Enterobacter sakazakii</i>
		<i>Enterobacter cloacea</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>
		<i>Proteus vulgaris</i>
		<i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		<i>Klebsiella ornitholytica</i>
		<i>S. intermedius</i>
		<i>Salmonella enterica</i>
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Alpha Proteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Betaproteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia mallei</i>
Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>B. megaterium</i>
		<i>B. mycoides</i>
		<i>B. pumilus</i>
		<i>B. thuringiensis</i>
Bacilli	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		<i>Vibrio alginolyticus</i>
Bacilli	Streptococcaceae	<i>Streptococcus uberis</i>

Çanakkale Boğazı kıyı örneklemelerinde elde edilen izolatların sınıf ve familya düzeyindeki dağılımları incelendiğinde, tanımlanan türlerin büyük bir kısmının *Gamma Proteobacteria* sınıfına ait olduğu belirlenmiştir. Bu sınıfa bağlı olarak, Moraxellaceae familyasından *Acinetobacter baumannii*, Vibrionaceae familyasından *Vibrio alginolyticus*, Enterobacteriaceae familyasından *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia plymuthica*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Salmonella enterica* ve *S. intermedius* gibi türler tespit edilmiştir. *Gamma Proteobacteria* sınıfında ayrıca *Pseudomonadaceae* familyasından *Pseudomonas fluorescens* izole edilmiştir.

Alpha Proteobacteria sınıfında *Sphingomonadaceae* familyasına ait *Sphingomonas paucimobilis* türü tespit edilmiştir. *Betaproteobacteria* sınıfında ise *Burkholderiaceae* familyasından *Burkholderia mallei* izolatı kaydedilmiştir.

Bacilli sınıfında *Bacillaceae* familyasına ait olarak *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus thuringiensis* türleri; Staphylococcaceae familyasından *Staphylococcus pseudintermedius* ve *Stenotrophomonas maltophilia* türleri; Streptococcaceae familyasından ise *Streptococcus uberis* türü belirlenmiştir.

Elde edilen 118 izolatın familyalara göre dağılımı değerlendirildiğinde, %56'sının *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğu belirlenmiş, bunu %16 ile *Bacillaceae* ve %10 ile *Staphylococcaceae* familyaları izlemiştir.



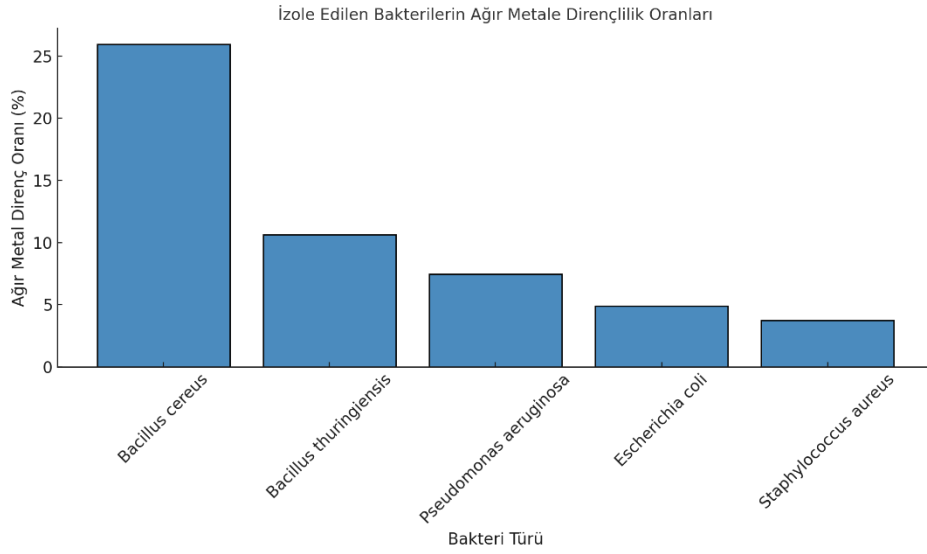
Şekil 6. Çanakkale Boğazı kıyı örneklemesinden izole edilen bakterilerin familyalara göre dağılımı (%)

Tüm örneklemler sırasında Çanakkale Boğazı'nda kıyı örneklemlerinden izole edilip tanımlanan bakterilerin familyalara göre dağılımı yukarıdaki grafikte verilmiştir. Tanımlaması yapılan 118 izolatın %56'si *Enterobacteriaceae* familyasına aitken onu %16 *Bacillaceae*, %10 *Staphylococcaceae* ile izlemiştir (Şekil 6).

4.4. Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri

Tüm istasyonlardan örnekleme dönemi boyunca elde edilip, ağır metal tuzlarına karşı test edilen izolatların gösterdiği dirençlilik konsantrasyonları aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir.

Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen toplam 94 bakteri izolatu, gümüş (Ag), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), çinko (Zn), demir (Fe), krom (Cr) ve kurşun (Pb) olmak üzere 9 farklı ağır metalin 1000 mM'lik solüsyonlarına karşı test edilmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) testlerine göre en yüksek direnç sırasıyla *Bacillus cereus* (%25,96), *Bacillus thuringiensis* (%10,62) ve *Pseudomonas aeruginosa* (%7,44) suşlarında gözlemlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bakterilerin ağır metal dirençlilik prevelansı

Bacillus cereus izolatlarının özellikle Cd ve Cr'a karşı belirgin tolerans gösterdiği ve bu metallerin varlığında da üreme yeteneklerini büyük oranda korudukları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* türü ise Zn ve Ni gibi metallerde görece bir direnç sergilemiş olup, endüstriyel ortamlarda çoklu metal kirliliğinin olduğu koşullar için potansiyel bir biyoremediasyon ajanı olabileceği düşünülmektedir.

Özellikle kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) gibi yüksek toksisiteye sahip metallerin, izolatların büyük çoğunluğunda inhibisyona neden olduğu, ancak bazı suşların bu metallerle baş edebildiği görülmüştür. Bu durum, bu izolatların direnç genlerine sahip olabileceğini ve metal bağlama proteinlerini (örneğin metallotionein) sentezleyebildiklerini göstermektedir.

Veriler, SPSS yazılımı ile analiz edilerek ANOVA ve Tukey HSD testleriyle gruplar arası farkların anlamlılığı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Böylece, *Bacillus* türlerinin metale karşı gösterdiği dirençlilik düzeyi diğer türlere kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu ortaya konmuştur (Şekil 7; Tablo 10).

Escherichia coli suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları gümüş ve Pb 1000 mM, en düşük kroma 3,75 mM ve kadmiyuma 60 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

Enterobacter cloacea suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları gümüş ve kurşun 1000 mM, en düşük kadmiyuma ve krom 31,25 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

Klebsiella pneumoniae suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları gümüş 1000 mM ve kadmiyum 500 mM, en düşük kroma 7,81 mM ve demire 31,25 mM, şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

Klebsiella oxytoca suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları kurşun 1000 mM, en düşük kroma 7,81 mM ve demire 31,25 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

Proteus vulgaris suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları gümüş ve kobalt 500 mM, en düşük kroma 0,97 mM ve demire 15,62 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo10).

Enterococcus faecalis suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik konsantrasyonları gümüş ve kobalt 1000 mM en düşük kroma 0,97 mM ve kurşun 7,81 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

E.coli ATCC 25922 referans suşunun üreme gösterdiği en yüksek ağır metal dirençlilik Ag 250 mM, en düşük kadmiyum 0,97 mM ve kobalt, bakır, nikele 1,98 mM şeklinde bulunmuştur (Tablo 10).

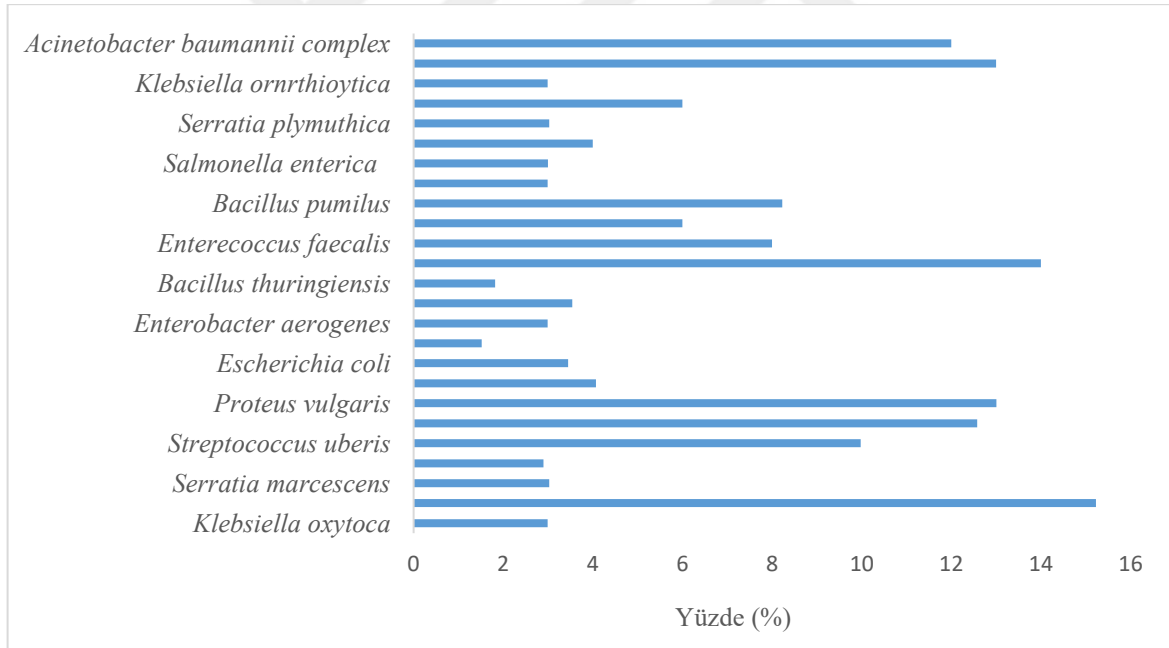
Tüm istasyonlardan izole edilen izolatın ağır metal solüsyonlarına karşı dirençlilik frekansları Tablo 10 verilmiştir.

Dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan izolatların gümüş için en yüksek dirençlilik frekansı %57 1000 mM için, krom dirençlilik frekansı %43 31,25mM için, kadmiyum dirençlilik frekansı %21 1000 mM için, kobalt dirençlilik frekansı %18 1000mM için, çinko en yüksek dirençlilik frekansı %11 1000mM için, kurşun dirençlilik frekansı %10 1000mM için, demir en yüksek dirençlilik frekansı %9 500 mM şeklinde

kaydedilmiştir. En düşük dirençlilik frekansı bakır ve nikel % 4 1000mM şeklinde tespit edilmiştir. Tablo 10, Ek 1.'de sunulmuştur.

4.5. Ağır Metal Analiz Sonuçları

Bu aşamada, izole edilen bakterilerin ağır metal iyonlarını ortamdaki uzaklaştırma kapasitelerinin yüzde olarak hesaplanmıştır Şekil 8’de gösterilmiştir. Bakterilerin ağır metalleri uzaklaştırma etkinliği formülde hesaplanarak yüzdeleri ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen veriler, söz konusu bakteri izolatlarının çevresel ortamlardaki ağır metal kirliliğinin biyolojik yöntemlerle giderilmesinde potansiyel biyoremediasyon ajanları olarak değerlendirilebileceğini düşünülen izolatlar olarak stoklanmıştır. İzole edilen suşlar içerisinde *Acinetobacter baumannii complex* türü yüzde 15,23 ve en düşük ise *Bacillus mycoides* türü yüzde 1,52 oranında ağır metal uzaklaştırma potansiyeli hesaplanmıştır.

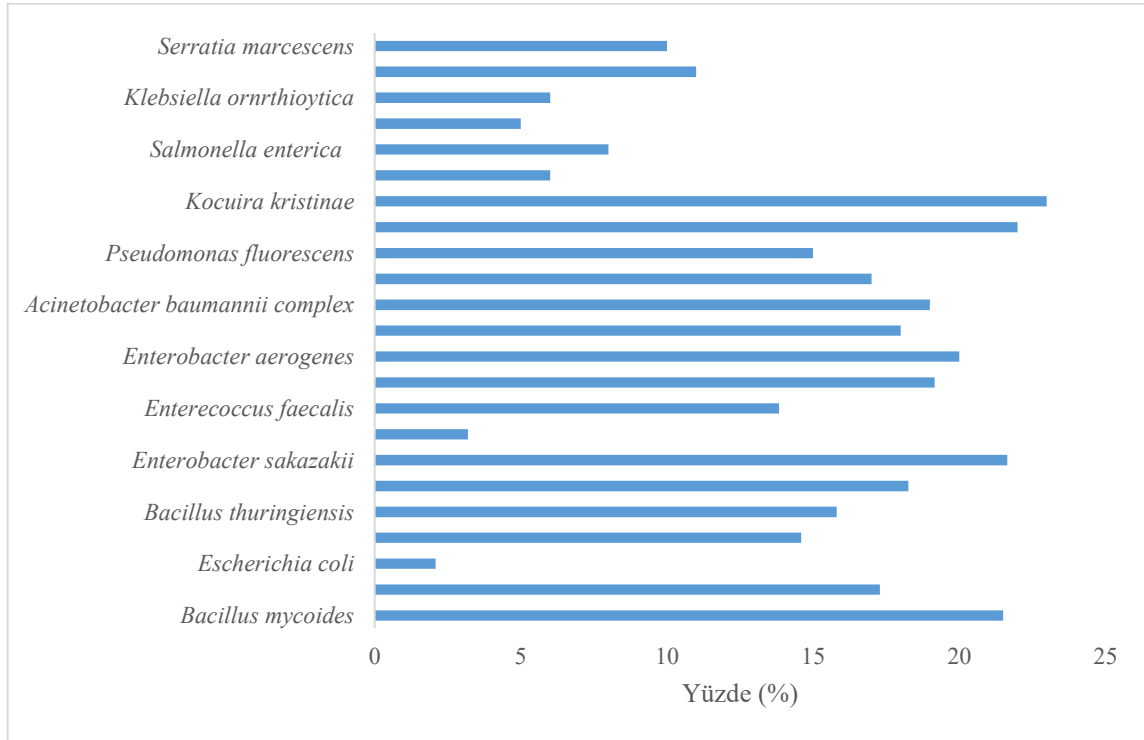


Şekil 8. İzole edilen bakterinin farklı ağır metalleri uzaklaştırma kapasitelerinin yüzde dağılımı (%)

4.5.1. İzolatlardan Ağır Metal Giderimi Analiz Sonuçları

Bu aşamada, ağır metal potansiyeli taşıyan suşlar arasından sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitesi en yüksek olanları analiz edilmiştir. Ağır metal uzaklaştırma

etkinliği (% giderim) formül yardımı ile hesaplanmış ve Şekil 9’da gösterilmiştir. Bu ölçümler sonucunda, sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitesi en yüksek olan suşlar belirlenerek ileri analizlere alınmak üzere stoklanmışır. Belirlenen suşlarda, ağır metal giderimi, yüzde giderim oranı şeklinde hesaplanarak değeriendirilmiştir. Bu yöntemle hem zaman içerisindeki giderim kinetiği hem de maksimum uzaklaştırma kapasitesi belirlenmeye ve çevresel biyoremediasyon açısından en etkili suşlar ortaya koyulmuştur.



Şekil 9. Bakteri izolatlarından sudan ağır metal uzaklaştırma kapasitelerinin dağılımı (%)

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Bu araştırmada Çanakkale Boğazı ve çevresindeki 13 farklı istasyondan alınan deniz suyu örnekleri üzerinden yürütülen bakteriyolojik ve ağır metal dirençlilik analizleri, hem bölgesel çevresel kirlenmenin düzeyi hem de bu kirlilikten etkilenen mikrobiyal yapının çeşitliliği hakkında kapsamlı bilgiler sunmaktadır. Bu kapsamda değerlendirilen indikatör bakteri düzeyleri, heterotrofik aerobik bakteri konsantrasyonları, izole edilen bakteri türlerinin dağılımları ve ağır metaller karşısındaki dirençlilik düzeyleri, mevcut literatürle karşılaştırıldığında önemli benzerlikler ve yerel farklılıklar göstermektedir.

İndikatör bakteriler üzerinden yürütülen analizlerde özellikle toplam koliform ve fekal koliform düzeylerinin bazı istasyonlarda yüksek düzeylerde kaydedilmesi, bölgedeki kentsel atıkların ve tarımsal akışın etkisini göstermektedir. Gökçeada, Lapseki ve Kepez gibi istasyonlarda tespit edilen yüksek enterokok düzeyleri, fekal kirliliğin önemli bir göstergesi olup benzer şekilde İstanbul Boğazı ve Marmara Denizi'ne ait geçmiş çalışmalarla örtüşmektedir (Çardak vd., 2016; Çiftçi Türetken vd., 2019). Koliform grubu bakterilerin varlığı, fekal kaynaklı bulaşın göstergesi olarak kullanılmaktadır ve bu gruba ait suşların yüksekliği insan sağlığı açısından potansiyel risk taşımaktadır (Hitchins vd.,1992). Araştırmamızda fekal koliform ile enterokoklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamış olması, bu iki grubun çevresel koşullara ve kaynaklara farklı hassasiyet göstermesiyle açıklanmaktadır (Yamahara vd.,2007).

Heterotrofik aerobik bakteri (HAB) düzeyleri incelendiğinde, özellikle yaz aylarında dramatik bir artışın gözlemlenmesi dikkat çekicidir. HAB düzeylerinin yaz aylarında artış göstermesi, artan sıcaklık ve organik madde girişleri ile açıklanmaktadır (Pomeroy, 1984). Çanakkale Belediye Halk Plajı gibi yerleşim alanına yakın bölgelerdeki yüksek düzeyler, bu bölgelerdeki antropojenik baskının göstergesi olup benzer şekilde Marmara Denizi'nde yürütülen çalışmalarda da yüksek HAB yoğunlukları rapor edilmiştir (Çiftçi vd., 2008; Gürün, 2008).

Bakteri türleri açısından yürütülen izolasyon çalışmaları sonucunda, *Bacillus cereus* (%25,96), *Bacillus thuringiensis* (%10,62), *Escherichia coli* (%10,62) ve *Staphylococcus pseudintermedius* (%9,44) gibi türlerin baskın olarak bulunması çevresel stres faktörlerine karşı yüksek adaptasyon kabiliyetlerine işaret etmektedir. *Bacillus* cinsine ait türlerin çevresel biyoremediasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanıldığı ve ağır metal tutulum kapasitelerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Beveridge, Murray, 1976; Singh, Malaviya, 2015). *E. coli* gibi fekal kökenli bakterilerin yüksek sıklıkla izole edilmesi, kıyı bölgelerinin fekal bulaş açısından tehdit altında olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Enterobacteriaceae familyasına ait çok sayıda türün yüksek sıklıkta izole edilmesi, bu familyanın çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığını ve geniş habitat aralığını ortaya koymaktadır (Cardak, Altug, 2014; Çardak vd., 2016). Enterobacteriaceae üyeleri, gerek antibiyotik gerekse ağır metal dirençlilik genlerini taşıyabilme kapasiteleri nedeniyle çevre sağlığı açısından özel önem arz etmektedir (Çiftçi Türetken vd., 2019; Matyar, 2012).

İzole edilen türlerin sınıfsal ve familyasal dağılımına bakıldığında, Gamma Proteobacteria sınıfına ait türlerin baskın olması dikkat çekicidir. Bu durum, bu sınıfa ait mikroorganizmaların yüksek metabolik esneklik ve adaptasyon potansiyeli ile açıklanmaktadır (Dash vd., 2013; Dell'Anno vd., 2020). *Sphingomonas paucimobilis* ve *Burkholderia mallei* gibi çevresel stres faktörlerine oldukça dayanıklı türlerin varlığı da özellikle deniz ortamında endüstriyel ve evsel kirliliğin yoğunluğunu ortaya koymaktadır (Gerbino vd., 2011; Naik, Dubey, 2017).

Tablo 9'daki veriler, *Enterobacter aerogenes* (c4), *Escherichia coli* (c6) ve *Klebsiella oxytoca* (c13) suşlarının gümüşe karşı >1000 mM MİK değerleriyle yüksek direnç gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, gümüşün bakteriyel hücre duvarı ve membran yapıları üzerindeki etkilerine karşı bu suşların adaptasyon geliştirdiğini düşündürmektedir. Beveridge ve Murray (1976), *Bacillus subtilis*'in hücre duvarlarının metal iyonlarını bağlama kapasitesini incelemiş ve hücre duvarı bileşenlerinin metal iyonlarını tutmada önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Gerbino vd., (2011), *Lactobacillus kefir*'in S-tabakalarının metal iyonlarıyla etkileşimini FTIR spektroskopisi ile analiz etmiş ve bu yapıların metal bağlama kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, çalışmamızdaki suşların hücre duvarı yapılarının gümüş iyonlarına karşı direnç geliştirmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Kalkan, S. (2022), Karadeniz sedimanlarından izole edilen 29 bakteriyel suşun 16 farklı ağır metal tuzuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK) belirlemiştir. En yüksek tolerans Fe için gözlenirken, en toksik metalin Cd olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, bu çalışmada da *Bacillus* cinsine ait türlerin Cr, Ni ve Pb gibi metallere karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği görülmüştür. Karadeniz örneklerinde en dirençli suş *Bacillus wiedmannii* olarak belirlenmiş, MHMR (Multiple Heavy Metal Resistance) indeksi ise 0.81 gibi yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. Bu değer, Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bazı suşların da benzer şekilde çoklu direnç genleri taşıyor olabileceğini ve biyoremediasyon süreçlerinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduklarını desteklemektedir.

Karadeniz sedimanlarından elde edilen bakteriyel izolatların ağır metallere karşı yüksek tolerans göstermesi, denizel ortamlarda bakterilerin kirletici baskıya maruz kaldıkça evrimsel olarak direnç kazanabileceğini göstermektedir (Kalkan, 2022). Bu durum, Çanakkale Boğazı gibi yoğun gemi trafiği, endüstriyel atıklar ve kıyasal yerleşimlerin etkisinde kalan alanlar için de geçerli olabilir. Kalkan'ın çalışmasında en yüksek MIC değerleri Sr, Mo ve Pb için elde edilmiş olup, bu metallerin yüksek konsantrasyonları altında dahi bakteriyel büyümenin devam ettiği görülmüştür. Bu bulgu, bakterilerin biyofilm oluşturma, metal iyonlarını kompleksleme ve hücre dışı polimerik maddeler (EPS) sentezleme gibi mekanizmalarla çevresel stres koşullarına adaptasyon sağladığını göstermektedir (Chaturvedi vd., 2015; Valls, M., De Lorenzo, 2002).

MHMR indeksi >0.2 olan izolatların oranı Karadeniz örneklerinde %96.5 olarak raporlanmış olup, bu durum bölgede ciddi ağır metal kirliliğinin göstergesidir. Çalışmamızda da bazı suşların benzer direnç profilleri göstermesi, Türkiye kıyılarında bulunan bakterilerin hem ekolojik stres göstergesi hem de biyoteknolojik kaynak olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmada elde edilen bakteriyel izolasyonların ağır metaller karşısındaki dirençlilik düzeyleri, İskenderun Körfezi'nden izole edilen *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. üzerine yapılan benzer bir araştırmayla desteklenmektedir. Matyar ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, *Aeromonas* spp.'nin %98.3'ünün ve *Pseudomonas* spp.'nin %75.4'ünün bakıra karşı yüksek düzeyde dirençli olduğu, buna karşın kurşuna karşı direnç oranlarının sırasıyla yalnızca %1.7 ve %7.2 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda

da benzer şekilde, kurşun ve kadmiyum gibi ağır metallere karşı düşük direnç düzeyleri gözlemlenirken, özellikle *Bacillus* cinsine ait türlerin krom, nikel ve bakır gibi metallere karşı anlamlı düzeyde direnç geliştirdiği saptanmıştır. Bu durum, farklı denizel ekosistemlerdeki mikroorganizmaların, bölgesel kirletici baskılara paralel olarak benzer direnç stratejileri geliştirdiklerini göstermektedir.

Matyar ve ark. (2010), İskenderun Körfezi'ndeki yoğun endüstriyel ve evsel baskının, bakteriyel türlerde hem antibiyotik hem de ağır metal direnç düzeylerini artırdığını göstermiştir. Bu çalışmada, *Aeromonas* suşlarının MAR (Multiple Antibiotic Resistance) indekslerinin 0.2–0.6 arasında değiştiği, *Pseudomonas* suşlarının ise 0.2–0.73 aralığında çoklu direnç gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise belirlenen MIC değerleri ve MAR indeksleri ile karşılaştırıldığında benzer direnç eğilimleri gözlemlenmiştir. Özellikle metal dirençli izolatların antibiyotiklere de dirençli olması, bu genlerin aynı mobil genetik elementler (örneğin R-plazmitler) üzerinde taşındığını düşündürmektedir (McIntosh vd., 2008; Silver., Phung, 1996). Bu durum, sadece çevresel riskler açısından değil, aynı zamanda halk sağlığı açısından da potansiyel tehlike arz etmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, denizel ortamlarda ağır metal kirliliğiyle baş edebilen bakterilerin aynı zamanda yüksek antibiyotik direnci gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Matyar ve ark. (2010) tarafından bildirilen bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, özellikle *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türlerinin hem çevresel stres faktörlerine hem de farmasötik bileşenlere karşı direnç geliştirme kapasiteleri, bu türlerin biyoremediasyon potansiyelini artırmakta; ancak aynı zamanda direnç genlerinin patojen türlere transferiyle halk sağlığına yönelik risk oluşturma olasılığını da gündeme getirmektedir. Bu nedenle, yerel izolatların hem ekolojik restorasyon hem de halk sağlığı bağlamında entegre şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir.

Klebsiella oxytoca (c13) ve *Escherichia coli* (p54) suşlarının kadmiyuma karşı >1000 mM MİK değerleriyle yüksek direnç gösterdiği gözlemlenmiştir. Ji ve Silver (1995), bakterilerin ağır metallere karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarını incelemiş ve özellikle kadmiyum gibi metallere karşı iyon effluks sistemlerinin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Nies ve Silver (1995) ise bakteriyel metal dirençlerinde iyon effluks sistemlerinin yanı sıra metal bağlayıcı proteinlerin de etkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu

mekanizmalar, çalışmamızdaki suşların kadmiyuma karşı yüksek direnç göstermesinin altında yatan biyokimyasal yolları açıklamada yardımcı olmaktadır.

Citrobacter freundii (c31) suşunun kobalt MİK değeri 3,90 mM olarak belirlenmiştir, bu da diğer suşlara kıyasla daha düşük bir direnç seviyesini göstermektedir. Joho vd., (1995), mayalar ve diğer mantarlarda nikel direnci mekanizmalarını incelemiş ve bu organizmaların metal iyonlarına karşı spesifik taşıyıcı proteinler geliştirdiğini belirtmişlerdir. Benzer mekanizmaların bakterilerde de mevcut olabileceği ve kobalt gibi metallere karşı direnç düzeylerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Klebsiella oxytoca (c13) suşunun bakıra karşı 62,50 mM MİK değeriyle orta düzeyde direnç gösterdiği gözlemlenmiştir. Silver vd., (1989), bakteriyel direnç ATPazlarının toksik katyonları hücre dışına taşıyarak bakır gibi metallere karşı direnç sağladığını belirtmişlerdir. Bu enzimlerin varlığı, çalışmamızdaki suşların bakıra karşı gösterdiği direnç düzeylerini açıklamada önemli olmaktadır.

Klebsiella oxytoca (c13) suşunun nikel MİK değeri 125,00 mM olarak belirlenmiştir. Joho vd., (1995), nikel direnci mekanizmalarının özellikle metal iyonlarının hücre içine alımını sınırlayan taşıyıcı proteinlerin varlığına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu mekanizmalar, çalışmamızdaki suşların nikel direncini açıklamada yardımcı olmaktadır.

Klebsiella oxytoca (c13) suşunun çinko MİK değeri 1000,00 mM olarak belirlenmiştir, bu da yüksek bir direnç seviyesini göstermektedir. Nies ve Silver (1995), bakteriyel metal dirençlerinde iyon effluks sistemlerinin çinko gibi metallere karşı da etkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu sistemlerin varlığı, çalışmamızdaki suşların çinko direncini açıklamada önemli olmaktadır.

Klebsiella oxytoca (c13) suşunun demir MİK değeri 31,25 mM olarak belirlenmiştir. Demir, bakteriyel metabolizmada esansiyel bir element olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilere sahip olmaktadır. Bu nedenle, bakterilerin demir homeostazını düzenleyen mekanizmaları, demir direncini etkilemektedir.

Klebsiella oxytoca (c13) suşunun krom MİK değeri 31,25 mM olarak belirlenmiştir. Ackerley vd., (2004), *Pseudomonas putida* ve *Escherichia coli*'nin kromat indirgeme özelliklerini incelemiş ve bu bakterilerin kromat iyonlarını daha az toksik formlara dönüştürebildiğini göstermişlerdir. Bu özellik, çalışmamızdaki suşların krom direncini açıklamada önemli olmaktadır. *Klebsiella oxytoca* (c13) suşunun kurşun MİK değeri >1000 mM olarak belirlenmiştir, bu da yüksek bir direnç seviyesini göstermektedir. Velásquez ve Dussan (2009), *Bacillus sphaericus*'un ölü ve canlı biyokütlesinin ağır metallerin biyosorpsiyonunda etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu özellik, çalışmamızdaki suşların kurşun direncini açıklamada yardımcı olmaktadır. Bu bulgular, çevresel örneklerden izole edilen bakteriyel suşların ağır metallere karşı gösterdiği direnç düzeylerinin çeşitliliğini ve bu dirençlerin altında yatan potansiyel mekanizmaları ortaya koymaktadır. Bu suşların biyoremediasyon uygulamalarında kullanılması, ağır metal kirliliğinin azaltılmasında etkili bir strateji olmaktadır.

Ağır metal dirençlilik düzeylerine ilişkin bulgular, bölgede ağır metal kirliliğinin biyolojik etkilerinin önemli boyutlara ulaştığını göstermektedir. Araştırmada izole edilen bakterilerin önemli bir kısmı yüksek konsantrasyonlarda gümüş, kurşun, kadminyum ve kobalt tuzlarına dirençli bulunmuştur. Özellikle *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi patojen potansiyeli yüksek türlerin ağır metallere karşı dirençlilik göstermesi, hem çevresel hem de halk sağlığı açısından endişe vericidir (Ji , Silver, 1995; Nies, Silver, 1995). Gümüş iyonuna karşı %57 gibi yüksek bir direnç frekansı gözlemlenmiş olup, bu bulgu benzer şekilde Çanakkale Boğazı ve Marmara Denizi'ne yönelik önceki çalışmalarda da doğrulanmıştır (Altug vd., 2020; Çardak vd., 2016). Bu dirençlilik düzeylerinin, çevresel metal stresine karşı plazmid kaynaklı adaptasyon mekanizmalarıyla açıklanabileceği belirtilmektedir (Hardly, 1993; Misra, 1992). Ayrıca, krom ve kadminyum gibi endüstriyel kaynaklı metallerin yüksek dirençlilik konsantrasyonlarında bakteri büyümesine izin verdiği gözlenmiş olup, bu özellik bazı mikroorganizmaların biyoremediasyon potansiyellerinin araştırılması açısından önem arz etmektedir (Ackerley vd., 2004; Ameen vd., 2020).

Bu çalışmada Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bakteri suşlarının çeşitli ağır metallere karşı dirençlilik düzeyleri belirlenmiş ve biyoremediasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, özellikle *Bacillus cereus* ve *B. thuringiensis*

suşlarının kadmiyum, krom ve nikel gibi toksik metallere karşı anlamlı düzeyde direnç gösterdiğini ortaya koymuştur.

Literatürde, benzer şekilde *Bacillus* türlerinin yüksek düzeyde metal toleransına sahip olduğu sıklıkla rapor edilmiştir. Örneğin Singh ve Malaviya (2015), deri endüstrisi kaynaklı atıklarda yüksek Cr(VI) konsantrasyonunu azaltmada *B. subtilis* suşlarının %40'tan fazla giderim sağladığını belirtmiştir. Aynı şekilde, Okeke (2008), *Exiguobacterium* sp. GSI suşunun değişken tuzluluk ve pH koşullarında yüksek düzeyde Cr(VI) indirgeme kabiliyeti gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda izole edilen bazı suşların, krom (Cr) ve kurşun (Pb) gibi toksik metallere karşı yüksek tolerans sergilemesi, Morales ve ark. (2007) tarafından tanımlanan *Streptomyces* sp. CG252'nin benzer performansı ile paralellik göstermektedir. Bu durum, farklı coğrafyalarda izole edilen bakteriler arasında benzer direnç profilleri görülebileceğini göstermektedir.

Buna ek olarak, elde edilen sonuçlar *Bacillus* türlerinin biyofilm oluşturarak metal iyonlarını tutabildiklerini ve bu sayede aktif biyoremediasyon sürecine katıldıklarını desteklemektedir. Bu bulgu, Pandey ve ark. (2015) tarafından ifade edilen *Bacillus* izolatlarının biyofilm temelli arıtma sistemlerinde kullanım potansiyelini doğrulamaktadır.

Başka bir çalışmada izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında PCR ile tespit edilen ağır metal direnç genlerinden *cadD*, *cadX*, *merB*, *merT*, *copA* ve *mco* genlerinin dağılımı, daha önce Marmara Denizi'nden elde edilen 300 örnekte de benzer şekilde gözlenmiştir (Günaydın, 2020). Özellikle *cadD* ve *cadX* genlerinin yüksek sıklıkla (%88,2) görülmesi, kadmiyum toleransının yaygın olduğunu ve bu metalin çevresel kontaminasyon açısından önemli bir baskı unsuru olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerinin kadmiyum ve krom gibi metallere karşı gösterdiği dirençlilikle uyumludur.

Marmara Denizi'nden izole edilen *S. aureus* suşlarında görülen çoklu ağır metal direnç genleri, su ürünleri kaynaklı patojen bakterilerin çevresel baskılara karşı gelişen direnç mekanizmalarının halk sağlığı açısından da tehdit oluşturduğunu ortaya koymuştur

(Günaydın, 2020). Benzer şekilde bu çalışmada elde edilen isolatlar, kadmiyum, kurşun ve cıva gibi ağır metallere karşı hem genetik düzeyde direnç taşımakta hem de potansiyel patojenite riski barındırmaktadır. *copA* ve *mco* genlerinin tespiti, özellikle bakırın çevredeki yaygınlığını ve metal toleransının genomik düzeyde işlenmiş olduğunu göstermektedir. Bu durum, metal direnç genlerinin horizontal gen transferi yoluyla yayılma riskini ortaya koymakta ve deniz bakterilerinin çevresel stres faktörlerine karşı uyum gücünü desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada yerel bakteriyel izolasyonların sadece laboratuvar ortamında değil, aynı zamanda saha uygulamalarında da kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Özellikle Marmara Denizi ve Çanakkale Boğazı gibi yüksek kirletici baskısı altındaki ekosistemlerde, metal toleranslı yerli mikroorganizmaların önemi bir kez daha ortaya konmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda genel olarak, Çanakkale Boğazı kıyılarının hem bakteriyolojik kirlilik hem de ağır metal yükü açısından kontrol altına alınması gerektiği ve bölgedeki denizel mikroorganizma topluluklarının çevresel stres faktörlerine karşı önemli adaptasyon stratejileri geliştirdiği söylenebilmektedir. Ayrıca, bu bölgelerde tespit edilen türlerin bazıları ağır metal biyoremediasyonu ve çevresel izleme açısından potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilebilecek niteliktedir (Velásquez, Dussan, 2009; Medfu Tarekegn vd., 2020).

5.2. Sonuç

Bu araştırma, Kasım 2022–Ekim 2023 tarihleri arasında Çanakkale Boğazı ve çevresindeki 13 farklı istasyondan alınan deniz suyu örneklerinin bakteriyolojik profili ile ağır metallere karşı dirençlilik düzeylerini değerlendirmeyi amaçlayan çok yönlü bir çevre mikrobiyolojisi çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma, kıyı ekosistemlerinde bakteriyel kontaminasyonun mevsimsel ve mekânsal değişimini ortaya koymasının yanı sıra, mikrobiyal tür çeşitliliği ve bu türlerin çevresel stres faktörlerine, özellikle ağır metallere karşı verdiği biyolojik yanıtları da kapsamlı biçimde ele almıştır. Çalışma, kıyı suyu örneklerinin aseptik koşullarda toplanarak, yüzeyden (0-30 cm) alınan 156 örnek üzerinde gerçekleştirilen çok sayıda laboratuvar analizini içermektedir. Araştırma sürecinde indikatör

bakteriler (toplam koliform, fekal koliform, enterokok), heterotrofik aerobik bakteri düzeyleri (HAB), tür teşhisi (VITEK 2 Compact sistemi kullanılarak), ağır metal dirençlilik düzeyleri (MİK testleri ile) ve ağır metal uzaklaştırma kapasiteleri (AAS analizleri ile) değerlendirilmiş ve çok sayıda istasyonlar arası karşılaştırmalı veri elde edilmiştir.

İndikatör bakteri düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, kıyı sularında yer yer ciddi düzeyde bakteriyolojik kontaminasyon olduğu ortaya konulmuştur. Toplam koliform düzeylerinin en yüksek olduğu istasyonun İntepe Merkez Gençlik Kampı olması, bu bölgedeki antropojenik etkileşimlerin ve yerleşim kaynaklı kirliliğin belirgin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Öte yandan fekal koliform düzeylerinin en düşük olduğu istasyonun Gökçeada olması, daha düşük nüfus yoğunluğu ve daha sınırlı karasal etki alanı ile açıklanmaktadır. Fekal koliform ile enterokok bakterilerinin karşılaştırmalı analizinde anlamlı istatistiksel bir ilişki bulunmaması ($p>0.05$), fekal kontaminasyon kaynaklarının heterojen yapısını ve potansiyel olarak farklı kökenleri (insan, hayvan, tarımsal drenaj vb.) işaret etmektedir. Bu bulgu, kıyı sularının mikrobiyal risk değerlendirmesinde yalnızca fekal koliformların değil, enterokokların da ayrı ayrı izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Fekal koliform/enterokok oranının Temmuz ayında maksimuma ulaşması, yaz aylarında artan deniz kullanımı, rekreasyonel faaliyetler ve kıyı turizmi kaynaklı kirlilik artışıyla ilişkilendirilmektedir.

Toplam kültür edilebilir heterotrofik aerobik bakteri düzeyleri ise yıl boyunca istasyonlara ve mevsimlere göre geniş bir varyasyon göstermiştir. Özellikle yaz aylarında gözlenen dramatik artış, çevresel sıcaklık artışlarının bakteriyel üreme hızlarını doğrudan etkilemesiyle açıklanmaktadır. Yaz mevsiminde Çanakkale Belediye Halk Plajı'nda kaydedilen 34×10^7 KOB/100 ml'lik yüksek düzey, kıyı kullanımı yoğunluğu, yüzme ve atık su yüklerinin bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. Buna karşılık, en düşük düzeyin kış mevsiminde Gelibolu-Hamzakoy Plajı'nda gözlenmesi, düşük sıcaklıkların mikrobiyal metabolizma ve üreme üzerindeki inhibe edici etkisini doğrulamaktadır. HAB düzeylerinin istasyonlar arası farklılığı, lokal çevresel koşullara, akıntı sistemlerine, deniz dibi morfolojisine ve insan kaynaklı kirlilik yüklerine bağlı olarak şekillenmektedir.

Araştırmada tür teşhisi amacıyla VITEK 2 Compact 30 otomatik sistem kullanılmış, toplamda 159 izolattan 118'i güvenilir düzeyde tanımlanmıştır. Elde edilen tür dağılımında *Bacillus cereus* (%25,96) ve *B. thuringiensis* (%10,62) gibi sporlu bakterilerin yüksek prevalansı dikkat çekici olup, bu bakterilerin çevresel dayanıklılığının ve sucul ortama adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* gibi fekal kökenli bakterilerin su örneklerinden izole edilmesi, dışkı kökenli kontaminasyonun deniz suyuna taşındığını açıkça göstermektedir. Familya düzeyinde yapılan sınıflandırmada ise en baskın grubun *Enterobacteriaceae* (%56) olması, çalışmanın odaklandığı kıyı ekosistemlerinin mikrobiyolojik risk açısından özellikle insan sağlığını tehdit eden enterik bakteriler yönünden dikkatle izlenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Çalışmanın en özgün çıktılarından biri olan ağır metal dirençlilik düzeyleri analizlerinde, izole edilen pek çok suşun yüksek düzeyde ağır metal toleransı gösterdiği ortaya konmuştur. *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* gibi suşlar gümüş (Ag), kurşun (Pb) ve kadmium (Cd) gibi toksik ağır metallere karşı 1000 mM düzeyine kadar üreme gösterebilmiş, bu da bu suşların çevresel stres faktörlerine karşı genetik ve metabolik adaptasyon mekanizmaları geliştirmiş olduğunu göstermektedir. Özellikle referans suş olan *E. coli* ATCC 25922'nin bu konsantrasyonlarda inhibe olurken, çevreden izole edilen suşların dirençli kalabilmesi, çevresel izolatların evrimsel olarak daha toleran yapılar geliştirdiğini düşündürmektedir. Bu bulgular, sadece çevre sağlığı açısından değil, aynı zamanda halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir; zira bu türlerin çoğu patojen potansiyeline sahip olup, metal dirençliliği aynı zamanda antibiyotik dirençliliği ile korelasyon gösterebilecek mobil genetik elementler tarafından taşınabilmektedir. Ayrıca, bakterilerin ağır metal uzaklaştırma kapasiteleri de ölçülmüş, bazı suşların yüksek oranda ağır metali biyosorbe edebildiği ve bu yönüyle potansiyel biyoremediasyon ajanı olarak değerlendirilebileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Çanakkale Boğazı'ndan izole edilen bakteriyel suşların çeşitli ağır metallere karşı dirençlilik profilleri belirlenmiş ve bu türlerin biyoremediasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bulgular, özellikle *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türlerinin kadmium, krom ve bakır gibi toksik metallere karşı anlamlı düzeyde tolerans geliştirdiğini

ortaya koymuştur. Aynı zamanda bu suşların çoğunun çoklu antibiyotik direnci taşıdığı gözlemlenmiştir.

İskenderun Körfezi'nden izole edilen suşlarla karşılaştırıldığında, her iki bölgede de metal dirençli bakterilerin aynı zamanda yüksek MAR (Multiple Antibiotic Resistance) indeksine sahip olduğu görölmektedir (Matyar vd., 2010). Bu durum, denizel ortamlarda antropojenik baskının sadece çevresel değil, aynı zamanda mikrobiyal patojenlerin yayılımı ve evrimi aćısından da tehdit oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuć olarak, ağır metal ve antibiyotik dirençlilik özellikleri taşıyan bu yerli mikroorganizmalar hem biyoremediasyon süreçlerinde kullanılabilir potansiyele sahip, hem de direnç genlerinin patojenlere aktarımı bakımından halk sağlığı aćısından risk teşkil etmektedir.

Staphylococcus aureus suşlarında ağır metal direnç genlerinin yüksek prevalansı, denizel gıda zincirinde yer alan mikroorganizmaların sadece ekotoksikolojik değil, aynı zamanda zoonotik risk taşıyabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, sadece çevresel izleme değil, gıda güvenliği politikaları kapsamında da dirençli bakterilerin rutin olarak izlenmesi gerekmekte olduğu sözkonusudur (Günaydın,2020).

Marmara Denizi'nde *S. aureus* 'ta tespit edilen cadX, copA gibi direnç genleri, izole edilen suşların biyoremediasyon potansiyelinin yanı sıra, potansiyel patojenite riski taşıdığını da göstermektedir. Bu genetik yapıların plazmid ya da mobil elementler üzerinden başka türlerle gećiş yapma olasılığı dikkate alınarak, genomik analizlerle bu transfer yolları araştırılmalıdır.

Tüm bu anlatılanlar bağlamında, bu çalışma hem kıyı sularının mikrobiyal kirlilik düzeyinin hem de çevredeki bakteriyel popölasyonun çevresel stres etmenlerine karşı biyolojik dayanıklılık düzeyinin kapsamlı bir profilini sunmaktadır. Elde edilen bulgular, yalnızca akademik bilgi üretimine katkı sunmakla kalmamakta, aynı zamanda bölgesel çevre yönetimi, halk sağlığı planlaması ve ileri biyoteknolojik uygulamalara yönelik önemli veri altlıkları oluşturmaktadır. Bu bağlamda, izole edilen suşların ağır metal toleranslarının izlenmesi ve genetik analizlerle desteklenmesi, gelecek araştırmalarda çevresel genetik

değişimlerin ve potansiyel risk unsurlarının daha derinlemesine incelenmesine olanak sağlayacaktır.

5.3. Öneriler

Çanakkale Boğazı ve çevresindeki kıyı sularında yürütülen bu çalışmada elde edilen bakteriyolojik kontaminasyon düzeyleri, mevsimsel HAB varyasyonları, su kaynaklarından izole edilen türlerin çeşitliliği ve ağır metallere karşı dirençlilik profilleri dikkate alındığında, bölgedeki çevresel ve halk sağlığı risklerinin çok boyutlu olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle, özellikle yaz aylarında artış gösteren koliform ve enterokok düzeylerine karşı düzenli mikrobiyolojik su kalitesi izleme programlarının oluşturulması önerilmektedir. İstasyon bazında elde edilen verilerin zamansal takibi yapılacak, bu takip doğrultusunda yüksek risk taşıyan kıyı bölgelerinde koruyucu ve önleyici çevre politikalarının uygulanması sağlanacaktır.

İndikatör bakteri düzeylerinin yerleşim yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesi, kıyı yerleşimlerinden kaynaklanan atık su girdilerinin deniz suyuna doğrudan etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, kanalizasyon altyapılarının gözden geçirilerek açık deşarj noktalarının ivedilikle kapatılması ve biyolojik arıtma kapasitelerinin artırılması önerilmektedir. Ayrıca, arıtılmadan bırakılan kıyı atık sularına yönelik çevresel denetimlerin sıklaştırılması yapılacaktır. Özellikle turizm sezonlarında nüfusun geçici artışına bağlı olarak deniz suyuna karışan atık yükünün azaltılması için mobil arıtma ünitelerinin kurulması da değerlendirilmelidir.

Heterotrofik aerobik bakteri düzeylerinin yaz döneminde dramatik biçimde artış göstermesi, sıcaklıkla birlikte mikrobiyal yükteki değişimin göz ardı edilemeyecek boyutta olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, kıyı sularında mikrobiyolojik kaliteye ilişkin eşik değerler mevsimsel olarak yeniden değerlendirilerek halk sağlığına yönelik uyarı sistemlerinin kurulması önerilmektedir. Özellikle yaz aylarında yüzme amacıyla kullanılan plajların düzenli analizlerle sınıflandırılması yapılacak, kalite düşüklüğü saptanan sahil alanlarında gerekli uyarı ve geçici kullanım kısıtlamaları uygulanacaktır.

Araştırma kapsamında izole edilen bakteriyel türlerin büyük bir kısmının insan ve hayvan kaynaklı fekal kökenli bakterilerden oluşması, deniz suyu mikrobiyotasının giderek artan antropojenik baskılarla şekillendiğini göstermektedir. Bu nedenle, su örneklerinde tür teşhisinin yalnızca klasik kültür yöntemleriyle değil, moleküler tanı yöntemleri ile de desteklenmesi önerilmektedir. Yapılacak ileri moleküler analizlerle kontaminasyonun kaynağı, yayılım yolu ve genetik adaptasyon mekanizmaları ortaya konulacak, bu veriler su yönetimi politikalarına doğrudan entegre edilecektir.

Ağır metal dirençlilik düzeylerinin oldukça yüksek bulunması, izole edilen bakteriyel suşların çevresel stres koşullarına adaptasyon yeteneklerini açıkça göstermektedir. Bu durum hem çevresel toksisite hem de antimikrobiyal direnç etkileşimi bakımından potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle, ağır metal dirençlilik profiline sahip bakterilerin aynı zamanda antibiyotik dirençlilik düzeyleri ile birlikte analiz edilmesi önerilmektedir. Gelecek çalışmalarda çevrede yaygın olarak bulunan metaller ile antibiyotikler arasındaki eşzamanlı dirençlilik desenlerinin araştırılması yapılacak, çevresel direnç genlerinin izlenebilirliği için genomik çalışmalar başlatılacaktır.

Bakteriyel izolatların bazı türlerinin yüksek düzeyde ağır metal uzaklaştırma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiş olup, bu türlerin biyoremediasyon uygulamalarında kullanılması önerilmektedir. Özellikle *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi suşlar ileri düzeyde biyosorpsiyon yeteneği göstermektedir. Bu bağlamda, bu türlerin kontrollü laboratuvar koşullarında ağır metal uzaklaştırıcı biyoteknolojik ajanlar olarak geliştirilmesi yapılacaktır. Uygun koşullarda optimize edilmiş biyofiltrasyon sistemlerinde bu mikroorganizmaların kullanımı, bölgesel su arıtma stratejilerinde yenilikçi çözümler sunacaktır. Son olarak, bu araştırmanın sürdürülebilir çevre yönetimi politikalarına katkı sunabilmesi için benzer kıyı alanlarında çok merkezli ve uzun soluklu izleme çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Elde edilen verilerin merkezi bir çevre mikrobiyoloji veritabanında toplanarak yerel yönetimlerin erişimine açılması yapılacaktır. Ayrıca, halk sağlığı, denizcilik ve turizm sektörleri arasında disiplinlerarası bir iş birliği modeli geliştirilerek kıyı alanlarının bütüncül yönetimi sağlanacaktır.

Kısaca önerileri özetlemek istersek:

Biyoremediasyon Uygulamaları: Bu çalışmada ağır metallere karşı yüksek tolerans gösterdiği belirlenen suşlar, metal kirliliğinin yoğun olduğu bölgelerde çevresel iyileştirme amacıyla kullanılabilecek potansiyel biyoremediasyon ajanları olarak öne çıkmaktadır. Bu suşlar, biyoreaktör sistemlerinde kontrollü koşullar altında uygulanabileceği gibi, aynı zamanda doğal ortam restorasyon projelerinde, toprak ve su ekosistemlerinin yeniden dengelenmesini desteklemek amacıyla da değerlendirilebilir. Özellikle endüstriyel faaliyetler sonucu kirlenmiş alanlarda, bu mikroorganizmaların kullanımı ile hem çevresel hem de ekonomik açıdan sürdürülebilir çözümler geliştirilmesi mümkündür. Dolayısıyla, bu suşların fizyolojik ve genetik özelliklerinin daha ayrıntılı analiz edilmesi, saha uygulamalarına geçmeden önce optimize edilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır.

Direnç Genlerinin Genomik Analizi: Özellikle hem ağır metallere hem de antibiyotiklere dirençli suşlar üzerinde plazmid analizi, tam genom dizileme ve kantitatif PCR (qPCR) gibi moleküler yöntemlerle genetik taşıyıcılık özellikleri detaylı bir şekilde ortaya konmalıdır. Bu tür analizler, direnç genlerinin kromozomal mı yoksa mobil genetik elementler (örneğin plazmidler, transpozonlar veya integronlar) üzerinde mi bulunduğunu belirlemek açısından büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, genlerin ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi, çevresel stres koşullarında mikroorganizmaların verdiği tepkilerin anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca, direnç genlerinin yatay gen transferi potansiyelinin değerlendirilmesi, bu genetik öğelerin çevreye yayılma riskini ve ekosistem sağlığı üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek açısından kritik bir adımdır. Bu kapsamda elde edilen veriler, hem çevresel risk analizlerine katkı sağlayacak hem de biyoremediasyon amacıyla kullanılacak mikroorganizmaların biyogüvenlik açısından uygunluğunu değerlendirmek için temel oluşturacaktır.

Antibiyotik ve Ağır Metal Etkileşimi: Direnç mekanizmalarının ortak genetik platformlarda (örneğin plazmidler, transpozonlar ve integronlar) taşınması ihtimali göz önünde bulundurularak, Türkiye'nin farklı kıyı bölgelerinde antibiyotik ve ağır metallerin eş zamanlı olarak izlenmesini içeren kapsamlı çevresel çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir. Bu tür izleme çalışmaları, özellikle endüstriyel, kentsel ve tarımsal faaliyetlerin yoğun olduğu kıyı alanlarında çevresel kirleticilerin birikimini, mikrobiyal

topluluklar üzerindeki seçim baskısını ve direnç genlerinin yayılım potansiyelini ortaya koymak açısından kritik öneme sahiptir. Antibiyotik ve ağır metallerin birlikte bulunması, mikroorganizmalarda çapraz direnç ve birlikte direnç gelişimini tetikleyebilir; bu durum hem halk sağlığı açısından hem de ekosistemlerin mikrobiyal dengesini koruma açısından ciddi riskler doğurabilir. Bu nedenle, çevresel genomik, metagenomik ve kimyasal analizlerin entegre edildiği çok disiplinli saha çalışmalarına öncelik verilmelidir. Elde edilecek veriler hem direnç yayılımının izlenmesi hem de çevre politikalarının ve atık yönetimi stratejilerinin bilimsel temellerle güçlendirilmesi açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Kıyı Yönetim Politikaları: Kıyı ekosistemlerinin sürdürülebilirliği açısından, endüstriyel deşarjların etkin bir şekilde denetlenmesi ve özellikle arıtılmamış hastane, evsel ve tarımsal atıkların doğrudan deniz ortamına bırakılmasının önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tür atıklar, sadece organik kirleticiler değil, aynı zamanda antibiyotik kalıntıları, ağır metaller ve direnç genleri taşıyan mikroorganizmalar açısından da ciddi bir risk oluşturmaktadır. Dirençli mikroorganizmaların kıyı sularına yayılımı, hem deniz ekosistemlerindeki mikrobiyal dengeyi bozmakta hem de insan sağlığı açısından potansiyel tehditler yaratmaktadır; özellikle deniz ürünleri tüketimi, rekreasyonel faaliyetler ve deniz suyu ile temas risk grupları için önemlidir. Bu bağlamda, bütüncül bir kıyı yönetim stratejisi kapsamında, kaynak bazlı kirlilik kontrolü, ileri biyolojik arıtma teknolojilerinin teşvik edilmesi, düzenli izleme programlarının oluşturulması ve ilgili yasal düzenlemelerin güçlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, yerel yönetimlerin, sanayi kuruluşlarının ve halk sağlığı otoritelerinin iş birliği içinde çalıştığı entegre bir izleme ve müdahale sistemi, dirençli mikroorganizmaların çevresel yayılımını sınırlamak açısından kritik bir adımdır.

Halk Sağlığı ve Gıda Güvenliği: Dirençli *Aeromonas* ve *Pseudomonas* suşlarının su ürünlerinde yaygın olarak bulunması, özellikle çiğ ya da az pişmiş deniz ürünlerinin tüketimiyle birlikte, insanlara patojenlerin veya direnç genlerinin geçişi açısından ciddi bir halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Bu bakteriler hem fırsatçı patojen olmaları hem de çeşitli antibiyotiklere karşı çoklu direnç geliştirme yetenekleri nedeniyle önem taşımaktadır. Bu nedenle, balık ve kabuklu deniz ürünlerinde düzenli olarak mikrobiyal direnç taraması yapılması, gıda güvenliğini sağlamak adına öncelikli bir ihtiyaçtır. Aynı zamanda, bu taramalar sayesinde dirençli mikroorganizmaların çevresel kaynaklardan gıda zincirine geçiş yolları daha iyi anlaşılabilir ve gerekli önlemler zamanında alınabilir. Gıda güvenliği

çerçevesinde, özellikle ihracata yönelik su ürünleri üretiminde bu tür analizlerin zorunlu hale getirilmesi hem halk sağlığının korunması hem de uluslararası pazarda rekabet gücünün artırılması açısından stratejik önem taşımaktadır. Ayrıca, çiftlik balıkçılığı yapılan alanlarda antibiyotik kullanımının sınırlandırılması, doğal stoklardan avlanan ürünlerin düzenli izlenmesi ve tüketicilere yönelik farkındalık çalışmalarının artırılması da direnç yayılımının kontrolü için tamamlayıcı önlemler arasında yer almalıdır.



KAYNAKÇA

- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Park, C. H., Blake, R. 2., Keyhan, M., Matin, A. (2004). "Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*". *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 873-882.
- Algan A., Cagatay M. N., Sarıkaya H. Z., Balkıs N., ve Sarı M. (1999). "Pollution monitoring using marine sediments: A case study on the istanbul metropolitan arca". *Tr. J. of Engineering and Environmental Science*, 23, 39-48.
- Algan, O., Altıok, H., ve Yüce, H. (1999). "Seasonal variation of suspended particulate matter in two-layered Izmit Bay, Turkey". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 49(2), 235-250.
- Altuğ, G., Çardak, M., Türetken, P. S. Ç., Kalkan, S., ve Gürün, S. (2020). "Antibiotic and heavy metal resistant bacteria isolated from Aegean Sea water and sediment in Güllük Bay, Turkey: Quantifying the resistance of identified bacteria species with potential for environmental remediation applications". *Johnson Matthey Technology Review*, 64(4), 507-525.
- Ameen, F.A., Hamdan, A.M. ve El-Naggar, M.Y., (2020). "Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018". *Scientific Reports* 10(1), 1–11.
- Austin, B. (1988). *Methods in Aquatic Bacteriology*. Wiley: U.S.A.
- Bekar, A. (1997). *Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*. Atatürk Üniversitesi Yayınları: Erzurum.
- Benesty, J., Chen, J., Huang, Y., ve Cohen, I. (2009). "Pearson Correlation Coefficient". in *Noise Reduction in Speech Processing* (pp. 1-4). Springer: Berlin.
- Beveridge, T. J. ve Murray, R. G. (1976). "Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1502-1518.

- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., ve Wei, M. Q. (2012). "Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents". *Journal of applied microbiology*, 112(6), 1193-1206.
- Bhardwaj, R., Gupta, A., ve Garg, J. K. (2018). "Impact of heavy metals on inhibitory concentration of Escherichia coli—a case study of river Yamuna system, Delhi, India". *Environmental monitoring and assessment*, 190(11), 674.
- Chaturvedi, A.D., Pal, D., Penta, S., ve Kumar, A. (2015). "Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem". *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 (10), 1595–1603. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1911-5>.
- Christodoulatos, C. ve Koutsospyros, A. (1998). "Bioslurry reactors". Lewandowsky G.A, DeFilippi, L.J. (eds.). in *Biological Treatment Of Hazardous Wastes*. (pp. 69-103) John Wiley & Sons: New York.
- Çardak, M., Altug, G., Ay, M., ve Erol, O. (2016). "Distribution of antibiotic resistance and the presence of vancomycin-resistance genes (vanA and vanB) in Enterobacteriaceae isolated from the Sea of Marmara, the Canakkale Strait and the Istanbul Strait, Turkey". *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 45(2), 182-190.
- Çardak, M. ve Altug, G. (2014). "Species distribution and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae members isolated from Istanbul Strait". *Fresenius Environmental Bulletin*, 230 OA, 2620-2626.
- Çiftçi Türetken, P. S., Altug, G., Çardak, M., ve Günş, K. (2019). "Bacteriological quality, heavy metal and antibiotic resistance in Sapanca Lake, Turkey". *Environmental Monitoring and Assessment*, 191:1-12.
- Çiftçi, P. (2008). Marmara Denizi'nden İzole Edilen Bakterilerin Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (Pah) Parçalama Yeteneklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Günaydın, R. (2020). Marmara Denizi Kaynaklı İstavrit ve Karideslerde Ağır Metal Dirençli *Staphylococcus Aureus* Suşlarının Prevalansı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, İstanbul.

- Gürün, S. (2008) Ayamama Deresi'nin Marmara Denizi'ne Deşarj Alamndaki Bakteriyolojik Kirlilik Düzeyinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniveritesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., ve Das, S. (2013). “Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 561-571.
- Dell'Anno, F., Brunet, C., Van Zyl, L. J., Trindade, M., Golyshin, P. N., Dell' Anno, A., ve Sansone, C. (2020). “Degradation of hydrocarbons and heavy metal reduction by marine bacteria in highly contaminated sediments”. *Microorganisms*, 8(9), 1402.
- Endo, G., Ji, G., ve Silver, S. (1995). “Heavy Metal Resistance Plasmids and Use in Bioremediation”. in *Environmental Biotechnology: Principles And Applications* (pp. 47-62). Springer Netherlands: Dordrecht.
- Erdem, A., Metzler, D, Cha, D. K., ve Huang, C. P. (2015). “The short-term toxic effects of TiO₂ nanoparticles toward bacteria through viability, cellular respiration, and lipid peroxidation”. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17917-17924.
- Fomina, M. ve Gadd, G. M. (2014). “Biosorption: current perspectives on concept, definition and application”. *Bioresource technology*, 160, 3-14.
- Ji, G. ve Silver, S. (1995). “Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern”. *Journal of industrial microbiology*, 14(2), 61-75.
- Gadd, G. M. (2010). “Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation”. *Microbiology*, 156(3), 609-643.
- Garrity, G. (2007). *Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer: Berlin.
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczynszyn, E., Fausto, R., ve Gómez-Zavaglia, A. (2011). “FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between Lactobacillus kefir S-layers and metal ions”. *Journal of Molecular Structure*, 987(1-3), 186-192.

- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., ve Staley, J. T. (1998). "Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4703-4710.
- Gillard, B., Chatzievangelou, D, Thomsen, L.A., ve Ullrich, M. S. (2019). "Heavy-metal-resistant microorganisms in deep-sea sediments disturbed by mining activity: An application toward the development of experimental in vitro systems". *Frontiers in Marine Science*, 6, 462.
- Gupta, V. K. ve Rastogi, A. (2008). "Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies". *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 407–414.
- Güven, K. C., Saygılı, N., ve Öztürk, B. (1993). "Survey of metal contents of Bosphorus algae, *Zostera marina* and sediments". *Botanica Marina* 36, 175-178.
- Harley, J. P. ve Prescott, L. M. (1999). "Bacterial Morphology and Staining". H. Prescott (Ed.), in *Laboratory Exercises in Microbiology* (pp. 31–36). McGraw-Hill: U.S.A.
- Hardly K.G., 1993, Tolmasky M. E., Actis L.A., Crosa J.H., (eds), *Plasmids*, Oxford, 90-98.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. ve Boudabous, A. (1998). "Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*". *Bioresource Technology*, 65(1-2), 73-82.
- Hitchins, A.D., Feng P., Watkins, W.D., Ripley, S.R., ve Chandler L.A. (1992). *Escherichia coli* and the Coliforms, *Bacteriological Analytical Manual*, 7th ed. American Public Health Association (APHA), Washington, DC, 27-29.
- Joho, M., Inouhe, M., Tohyama, H., ve Murayama, T. (1995). "Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 164-168.

- Kalkan, S. (2022). "Heavy metal resistance of marine bacteria on the sediments of the Black Sea". *Marine Pollution Bulletin*, 179, 113652.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Ckert, J. E., Zinkeernagel, R. M. (2005). Basic principles of medical microbiology and immunology.maipa
- Korkmaz, C., Ay, Ö., Çolakfakioğlu, C., Cicik, B., Erdem, C. (2017). "Heavy metal levels in muscle tissues of Solea solea, Mullus barbatus, and Sardina pilchardus marketed for consumption in Mersin, Turkey. *Water, Air, Soil Pollution*, 228(8), 315.
- Kut, D., Esen, N., Erenturk, N., Sayıgılı, N., Bassarı, A., Seddigh, E., ve Topcuoglu, S. (1990). "İstanbul Boğazı'nda Tutulan Karides ve Midyelerde Toksik Element Seviyeleri". *III. Ulusal Nukleer Bilimler Kongresi Bildiri Kitabı*, Türkiye, 1990, pp 734-739.
- Kut, D., Topçuoğlu, S, Esen, N., Küçükcezzar R., ve Güven, C.K. (2000). Trace metals in marine algae and sediment samples from the Bosphorus, *Water, Air, Soil Pollution*, 1 18:27-33.
- Kut, D., Esen, N., ve Topcuoğlu, S. (1992). "Boğaziçi, Marmara ve Karadeniz'de yakalanan deniz organizmalarında selenyum seviyeleri". *8. Kimya ve Kimya Müh. Sempozyumu*, 243-347.
- Madigan, M.T., Martinko J. M., Dunlap P.V., ve Clark D.P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Benjamin Cummings: San Francisco.
- Maipa, V., Alamanos, Y., ve Bezirtzoglou, E. (2001). "Seasonal fluctuation of bacterial indicators in coastal waters". *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(3), 143-146.
- Matyar, F., Kaya, A., ve Dinçer, S. (2008). "Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey". *Science of the Total Environment*, 407(1), 279–285.
- Matyar, F. (2012). "Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(3), 551-556.

- Medfu Tarekegn, M., Zewdu Salilih, F., ve Ishetu, A. I. (2020). "Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment". *Cogent Food, Agriculture*, 6(1), 1783174
- McENTEE, J. D., Woodrow, J. R., ve Quirk, A. V. (1986). "Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp". *Applied and environmental microbiology*, 51(3), 515-520.
- McIntosh, D., Cunningham, M., Ji, B., Fekete, F. A., Parry, E. M., Clark, S. E., ve Ritchie, R. (2008). "Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1221-1228.
- Misra, T. K. (1992). "Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials". *Plasmid*, 27(0), 4-16.
- Morales, D. K., Ocampo, W., ve Zambrano, M. M. (2007). "Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure". *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2704-2712.
- Naik, M. M. ve Dubey, S. K. (2017). "Lead-and mercury-resistant marine bacteria and their application in lead and mercury bioremediation". in *Marine pollution and microbial remediation* (pp. 29-40). Springer: Singapore.
- Nies, D. H. ve Silver, S. (1995). "Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances". *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 186-199.
- Okeke, B. C. (2008). "Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1571-1579.
- Park, D., Yun, Y. S., ve Park, J. M. (2010). "The past, present, and future trends of biosorption". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 86-102.

- Pandey, P., Ramegowda, V., ve Senthil-Kumar, M. (2015). "Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms". *Frontiers in Plant Science*, 6, 723.amee
- Pazirandeh, M., Wells, B. M., ve Ryan, R. L. (1998). "Development of bacterium-based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4068-4072.
- Pincus, D. H. (2005). *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, Volume 1: Microbial Identification using the Biomérieux VITEK® 2 System*. In M. J. Miller (Ed.). PDA/DHI (pp. 1–32). Biomérieux, Inc.
- Pomeroy, L. R. (1984). "Microbial Processes in The Sea: Diversity in Nature And Science". in *Heterotrophic Activity in The Sea* (pp. 1-23). Springer: Boston.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., ve Banat, M.I. (2002). "Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials". *Biotechnology Progress*, 18 (6), 1277-1281.
- Rahman, M., Kühn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B., ve Möllby, R. (2004). "Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria". *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2398-2403.
- Saygı, N., Topcuoğlu, S., ve Taşçı, N.Ö. (1994). "İstanbul Bölgesi makroalg ve sediment örneklerinde toksik element düzeyleri", *E.Ü. Fen Fak Dergi Serisi. B*, 16 (1), 49-51.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., ve Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36 (2), 288-305.
- Silver, S. ve Walderhaug, M. (1995). "Bacterial plasmid-mediated resistances to mercury, cadmium, and copper". in *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects* (pp. 435-458). Springer: Berlin, Heidelberg.

- Silver, S., Nucifora, G., Chu, L., ve Misra, T. K. (1989). "Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions". *Trends in Biochemical Sciences*, 14(2), 76-80.
- Silver, S., ve Phung, L. T. (1996). "Bacterial heavy metal resistance: new surprises". *Annual review of microbiology*, 50(1996), 753-789.
- Singh, A., ve Malaviya, P. (2015). "Optimization of culture parameters for tannery effluent bioremediation by *Bacillus galactosidilyticus* APBS5-3". *Journal of Environmental Biology*, 36(5), 1149.
- Topcuoğlu, S., Kırbaşoğlu, Ç., ve Güngör, N. (2002). "Heavy metals in organisms and sediments from Turkish coast of the black sea, 1997–1998". *Environment International*, 27(7), 521-526.
- Tunçsoy, M., Duran, S., Ay, Ö., Cıkcık, B. ve Erdem, C. (2017). "Bakır oksit nanopartiküllerinin antioksidan enzim aktiviteleri ve *Oreochromis niloticus*'un doku birikimi üzerine etkileri". *Çevre Kirliliği ve Toksikoloji Bülteni*, 99 (3), 360-364.
- Valls, M., ve De Lorenzo, V. (2002). "Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution". *FEMS Microbiology Review* 26 (4), 327–338.
- Wang, J., ve Chen, C. (2009). "Biosorbents for heavy metals removal and their future". *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226.
- Volesky, B. (2001). "Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century". *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 203-216.
- Velásquez, L., ve Dussan, J. (2009). "Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*". *Journal Of Hazardous Materials*, 167(1-3), 713-716.
- Yamahara, K. M., Layton, B. A., Santoro, A. E., ve Boehm, A. B. (2007). "Beach sands along the California coast are diffuse sources of fecal bacteria to coastal waters". *Environmental Science, Technology*, 41(13), 4515-4521.

EKLER

EK 1

Heavy metals	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Kocaira kristinae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Klebsiella ornitholytica</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922TM)
A g	>10 00	>10 00	>100 0	500, 00	1000 ,00	>100 0	1000 ,00	500, 00	500, 00	500, 00	500, 00	>100 0	500, 00	500, 00	500, 00	250, 00	1000 ,00	1000 ,00	500, 00	250, 00	1000 ,00	1000 ,00	1000 ,00	1000 ,00	1000 ,00	1000 ,00	1000 ,00	250, 00	250, 00
C d	31,2 5	31,2 5	>100 0	62,5 0	1000 ,00	>100 0	1000 ,00	31,2 5	62,5 0	>10 02	500, 00	500, 00	250, 00	31,2 5	31,2 5	15,6 2	1000 ,00	500, 00	250, 00	31,2 5	125, 00	125, 00	500, 00	125, 00	500, 00	250, 00	250, 00	62,5 0	<0,9 7
C o	125, 00	125, 00	>100 0	3,90	1000 ,00	>100 0	500, 00	500, 00	1000 ,00	3,90	125, 00	1000 ,00	7,81	15,6 2	7,81	3,90	7,81	62,5 0	7,81	7,81	250, 00	7,81	31,2 5	7,81	125, 00	15,6 2	7,81	7,81	1,95
C u	250, 00	250, 00	62,5 0	62,5 0	1000 ,00	62,5 0	31,2 5	125, 00	125, 00	62,5 0	125, 00	125, 00	125, 00	125, 00	62,5 0	31,2 5	125, 00	125, 00	62,5 0	62,5 0	500, 00	31,2 5	62,5 0	62,5 0	62,5 0	31,2 5	15,6 2	62,5 0	1,95
N i	250, 00	250, 00	125, 00	125, 00	1000 ,00	125, 00	125, 00	250, 00	250, 00	125, 00	250, 00	250, 00	125, 00	125, 00	250, 00	7,81	125, 00	250, 00	125, 00	125, 00	500, 00	125, 00	125, 00	31,2 5	125, 00	31,2 5	15,6 2	125, 00	1,95
Z n	250, 00	250, 00	1000 ,00	250, 00	1000 ,00	1000 ,00	125, 00	125, 00	250, 00	125, 00	250, 00	125, 00	250, 00	125, 00	125, 00	7,81	125, 00	125, 00	125, 00	125, 00	500, 00	250, 00	125, 00	250, 00	125, 00	250, 00	125, 00	125, 00	3,90
F e	31,2 5	62,5 0	31,2 5	31,2 5	31,2 5	62,5 0	31,2 5	15,6 2	15,6 2	31,2 5	500, 00	31,2 5	31,2 5	15,6 2	31,2 5	31,2 5	31,2 5	31,2 5	31,2 5	3,90	31,2 5	31,2 5	15,6 2	15,6 2	15,6 2	31,2 5	31,2 5	15,6 2	
C r	31,2 5	31,2 5	31,2 5	31,2 5	31,2 5	3,90	31,2 5	<0,9 7	<0,9 7	15,6 2	31,2 5	<0,9 7	31,2 5	<0,9 7	<0,9 7	<0,9 7	31,2 5	7,81	1,95	<0,9 7	1,95	31,2 5	31,2 5	3,90	7,81	7,81	31,2 5	31,2 5	3,90
P b	250, 00	>10 00	>100 0	125, 00	125, 00	125, 00	250, 00	31,2 5	62,5 0	125, 00	250, 00	7,81	125, 00	1,95	7,81	7,81	62,5 0	62,5 0	7,81	7,81	3,90	7,81	7,81	7,81	3,90	7,81	1000 ,00	15,6 2	7,81

Tablo10. İzole edilen suşların ağır metal solüsyonlarına karşı (1000 mM) minumum inhibisyon konsantersyon (MİK) değerleri (mM)