

Bakır-Çinko İkili Metal Karışımının *Synechocystis* sp. E35 ile Biyosorpsiyonu/Biyobirikimi

Sevgi DEMİREL^{1*}, Beyza ÜSTÜN², Belma ASLIM³

¹Harran Ünv. Mühendislik Fak. Çevre Mühendisliği Bölümü

²Yıldız Teknik Ünv. İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü

³Gazi Ünv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü

ÖZET: Bu çalışmada, Küçükçekmece Gölü'nden, ötrofikasyon döneminde alınan su örneklerinden izole edilen *Synechocystis* sp. E35 izolatı ile Cu-Zn metallerinin biyosorpsiyonu/biyobirikimi incelenmiştir. Biyosorpsiyon/biyobirikim çalışmalarında 1 ve 4 mg/L Cu-Zn içeren bimetalik metal çözeltileri kullanılmıştır. Metal gideriminin pasif ve aktif alım şeklinde iki aşamada gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Çözeltideki metal konsantrasyonlarının yaklaşık 120. dakikadan itibaren azaldığı, hücre yüzeyine tutunan metal konsantrasyonunun ise arttığı tespit edilmiştir. Hücre içine alınan metal konsantrasyonu 0.021 mmol/l'ye kadar yükselmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, biyosorpsiyon, biyobirikim, siyanobakteri, Küçükçekmece Lagünü

Multi-Component Biosorption/Bioaccumulation of Copper and Zinc Ions Using By *Synechocystis* sp. E35

ABSTRACT: In this study, Cu-Zn biosorption/bioaccumulation characteristics of *Synechocystis* sp. E35 that are isolated from Küçükçekmece Lake in the period of eutrophication have been researched. The experiments were conducted with binary metal solution contained 1 and 4 mg/L Cu-Zn. Results were verified that metal removal takes place in two stages: surface biosorption and intracellular bioaccumulation. Metal concentration in binary metal solution decreased with increasing of metal ions adsorbed onto cell surface. Intracellular metal uptake has been reached 0.021 mmol/L.

Key Words: Heavy metals, biosorption, bioaccumulation, cyanobacteria, Küçükçekmece Lagoon

1.Giriş

Günümüzde en önemli çevre sorunlarından birisi toksik metallere kaynaklanan su kirliliğidir. Gübreleme, otomotiv, boya ve pil endüstrilerinden gelen atıksular, su kaynaklarında potansiyel metal kirliliğine sebep olabilmektedir [1]. Atıksularda bulunan metaller kimyasal çöktürme, iyon değiştirme, koagülasyon, membran ile ayırma gibi yöntemlerle arıtılabilmektedir [2-3]. Ancak bu yöntemler hem pahalı hem de ikincil çevre sorunlarına (atık çamur) yol açabilecek yöntemlerdir. Bu nedenle son yıllarda alternatif biyolojik arıtma yöntemlerinin araştırılması çalışmaları hız kazanmıştır [4-5].

Canlı bakteri/fungi/alg hücreleri ile metal giderimi ile ilgili uygulamaları özetleyen derleme çalışması Malik (2004) tarafından yapılmıştır [6]. Metal gideriminde ölü mikroorganizmaların kullanılması durumunda gerçekleşen mekanizma "biyosorpsiyon", canlı bir organizmanın kullanılması halinde ise "biyosorpsiyon/biyobirikim" adını almaktadır. Biyosorpsiyonda çözeltide bulunan metal iyonları, canlı ya da ölü hücrenin yüzeyine tutunurken; biyobirikim mekanizmasında hücre zarından stoplazmaya ve organellere geçebilmektedir [7].

Ağır metallerin biyoteknolojik olarak gideriminde birçok mikroorganizma türü denenmiş olup bu konudaki çalışmalar halen sürdürülmektedir. Bu

mikroorganizmalardan siyanobakteriler, hem su hem de kara ortamında bulunabilmeleri, hücre büyüklükleri ve hücre duvarı yapısındaki bileşenlerinden dolayı ağır metallerin gideriminde kullanılan bakteri türleri arasındadır [8]. Siyanobakteriler ve algler, ağır metali hücre içinde tutabilen ve hücre içindeki yüksek metal konsantrasyonunu detoksifiye edebilme özelliğine sahip metal bağlayan proteinler üretirler [9]. Ayrıca siyanobakteriler su kaynaklarından kolaylıkla izole edilebilmekte ve minimum maliyetle üretilebilmektedir. Ülkemizin ender lagün göllerinden biri olan Küçükçekmece Gölü'nde kontrolsüz evsel ve endüstriyel deşarjlar sonucu dönem dönem ötrofikasyon meydana gelmektedir. Ustun ve diğ., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, Küçükçekmece Gölü'nde su ve sediment yapıda ağır metal izlemeleri yapılmış ve en fazla bakır, demir ve çinko metallerinin olduğu saptanmıştır [10]. Bu nedenle, bu çalışmada bakır ve çinko metallerinin giderimi araştırılmıştır.

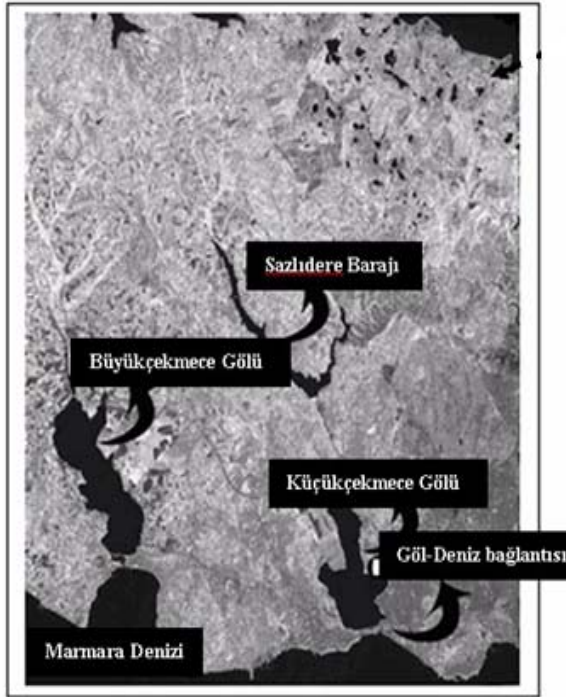
Gerçek atıksu ortamlarının, birçok metal içermesine karşılık, ağır metal giderimine yönelik çalışmalar genellikle tek metal üzerine yoğunlaşmaktadır [1]. Bu amaçla, bu çalışmada Küçükçekmece Gölü'nden, ötrofikasyon döneminde alınan su örneklerinden izole edilen *Synechocystis* sp. E35 izolatı ile Cu ve Zn metallerinin birarada bulunması halinde biyosorpsiyonu/biyobirikimi incelenmiştir.

*Sorumlu Yazar: Demirel, S., sevgi.demirel@gmail.com

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Küçükçekmece Gölü

Küçükçekmece Gölü, İstanbul'un Avrupa yakasında yer alan bir doğal lagün gölüdür. Gölün yüzey alanı yaklaşık 17 km² ve deniz seviyesindeki su hacmi yaklaşık 145 milyon m³'tür. Havzadaki kontrolsüz evsel ve endüstriyel atıksu deşarları, derelerle Küçükçekmece Gölü'ne taşınmaktadır.



Şekil 1. Küçükçekmece Gölü ve Havzasının Yerleşimi

2.2. Siyanobakterilerin İzolasyonu ve Kültür Şartları

Küçükçekmece Gölü'nden alınan su örnekleri sıvı BG11 besiyerinde geliştirilmiştir [11]. BG11 besiyerinin içeriği: NaNO₃ (15 g/L), K₂HPO₄ (0.4 g/L), MgSO₄.7H₂O (0.75 g/L), CaCl₂.2H₂O (0.36 g/L), sitrik asit (0.06 g/L), demir (III) amonyum sitrat (0.06 g/L), Na₂-EDTA (0.01 g/L), Na₂CO₃ (0.2 g/L) and iz element

çözeltisi (1 mL): H₃BO₃ (61 mg/L), MnSO₄.H₂O (169 mg/L), ZnSO₄.7H₂O (287 mg/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (12.5 mg/L), CuSO₄.5H₂O (2.5 mg/L). BG11 besiyerinin pH'ı 6.8'dir. Siyanobakteri izolatlarının izolasyonu iki şekilde yapılmıştır. Genelde saflaştırma yoğun halde üreyen karışık kültürden, ucu alevde uzatılıp inceltilmiş cam pastör pipeti ile tek hücre halinde alınıp yeni bir besiyerine aktarılacak suretiyle yapılırken; bazı izolatlar BG11 agar plaklarında tek koloni yöntemi ile izole edilmişlerdir. Kültürler 25 °C'de, çalkalayıcı inkübatörde (MINITRON) 12 saat gece 12 saat gündüz periyodunda 20 gün inkübasyona bırakılmıştır.

2.3. Çinko-Bakır İyonlarının Biyosorpsiyonu/Biyobirikimi

Biyosorpsiyon/biyobirikim denemelerinde, optik yoğunlukları eşitlenmiş, metabolik olarak aktif hücreler kullanılmıştır. İzole edilen *Synechocystis* sp. E35 izolatı, 100 ml'lik erlenlerde metal içeren 40 ml'lik BG11 çözeltileri içerisinde inkübe edilmiştir. Siyanobakteriler ilave edilmeden önce 1 N NaOH/HCl kullanılarak metal çözeltilerinin pH'ı ayarlanmıştır. *Synechocystis* sp. (E35) izolatının, bakır ve çinko metallerinin bir arada bulunduğu koşullardaki biyosorpsiyon/biyobirikim özelliklerini incelemek amacıyla;

- C₀: 1 mg/L Cu (0.016 mmol Cu/L) ve 1 mg/L Zn (0.015 mmol Zn/L)
- C₀: 4 mg/L Cu (0.063 mmol Cu/L) ve 4 mg/L Zn (0.061 mmol Zn/L) içeren iki deneme seti kurulmuştur.

2.4. Hücrenin Kısımlara Ayrılması

Alınan örneklerde a) duru fazda (suda kalan), b) hücre yüzeyinde ve c) hücre içine alınan metal miktarı olmak üzere 3 kısımda ölçüm yapılmıştır. Çözeltide kalan çinko ve bakır konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120. dk ve 1, 2, 3, 4, 5, 6. günlerde 1'er ml numune alınarak santrifüj (7000Xg) edilmiş ve duru fazdaki metal konsantrasyonu tespit edilmiştir. Daha sonra peletin üzerine 1 ml 10 mM EDTA çözeltisi konularak vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir (7000Xg). Hücre yüzeyine bağlanan metal bu duru fazda belirlenmiştir. Hücre içindeki metal birikimini tespit etmek için önce, peletin üzerine 1 ml 1 N HNO₃ (pH<2) ilave edilmiştir. Santrifüj edilen örnek üzerindeki duru faz alınmıştır [12]. Bu fraksiyonda bulunan metal değerleri "hücre içi" metal fraksiyonunu temsil etmektedir. Birbirinden ayrılan 3 ayrı kısımdaki metal konsantrasyonları Agilent 7500 marka ICP-MS cihazı ile okunmuştur.

3. Araştırma Bulguları ve Sonuçlar

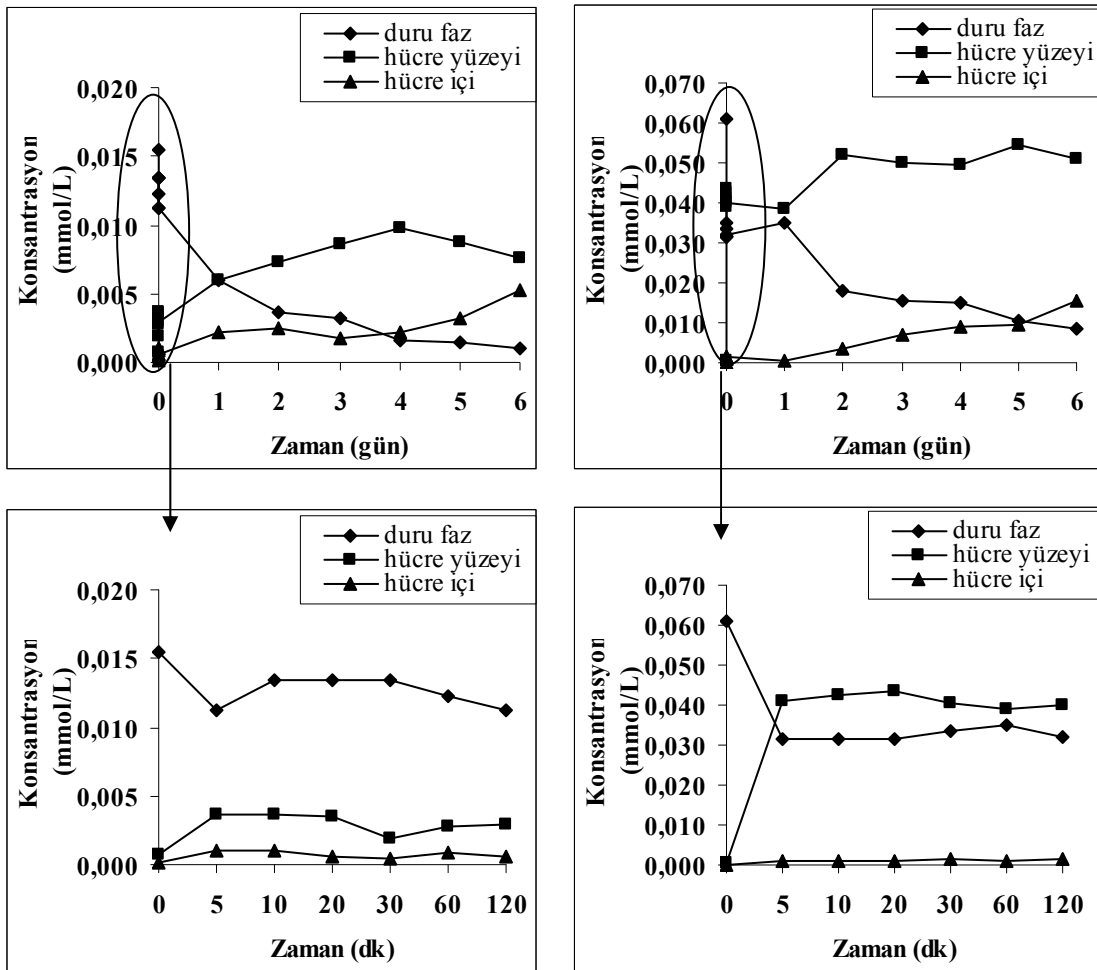
Mikroorganizmalar tarafından metal alımı; a) Hızlı (pasif) alım, b) Yavaş (aktif) alım olmak üzere iki

aşamada gerçekleşmektedir [13]. Pasif alım sırasında; metal iyonları hücre yüzeyine tutunurken, aktif alımda; metal iyonları hücre zarını geçerek stoplazmaya ya da organellere taşınmaktadır.

Küçükçekmece Gölü'nün metal konsantrasyonları göz önünde bulundurularak bu çalışmada 1 mg/L ve 4 mg/L Cu ve Zn'den oluşan bimetalik çözeltilerde biyosorpsiyon/biyobirikim incelenmiştir (Şekil 2). Şekil 2.'de görüldüğü gibi sudaki metal konsantrasyonu azalırken, hücre yüzeyindeki metal konsantrasyonu arttığı gözlemlenmektedir. Bu mekanizma "biyosorpsiyon" olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra siyanobakteri hücresinde, aktif taşıma sistemi ile metal iyonları hücre içine taşınmaktadır (Biyobirikim).

Biyosorpsiyon ile tutunan metal konsantrasyonu, biyobirikimle hücre içine taşınandan daha fazladır. Bu durum; düşük konsantrasyonda hücre fonksiyonlarda kullanılan bakır ve çinko metalinin, yüksek konsantrasyonlarda hücrede inhibisyon etkisi oluşturmasından kaynaklanabilir [14]

120. dakikaya kadar Zn biyosorpsiyonunun çok yavaş ilerlediği, bu aşamadan sonra ise keskin bir hızla sudaki çinko konsantrasyonunun azaldığı gözlemlenmektedir (Şekil 2.a). Sheng ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada; biyosorpsiyonun iki aşamalı bir davranış göstermesi biyokütlenin heterojen yapısına bağlanmaktadır [15]



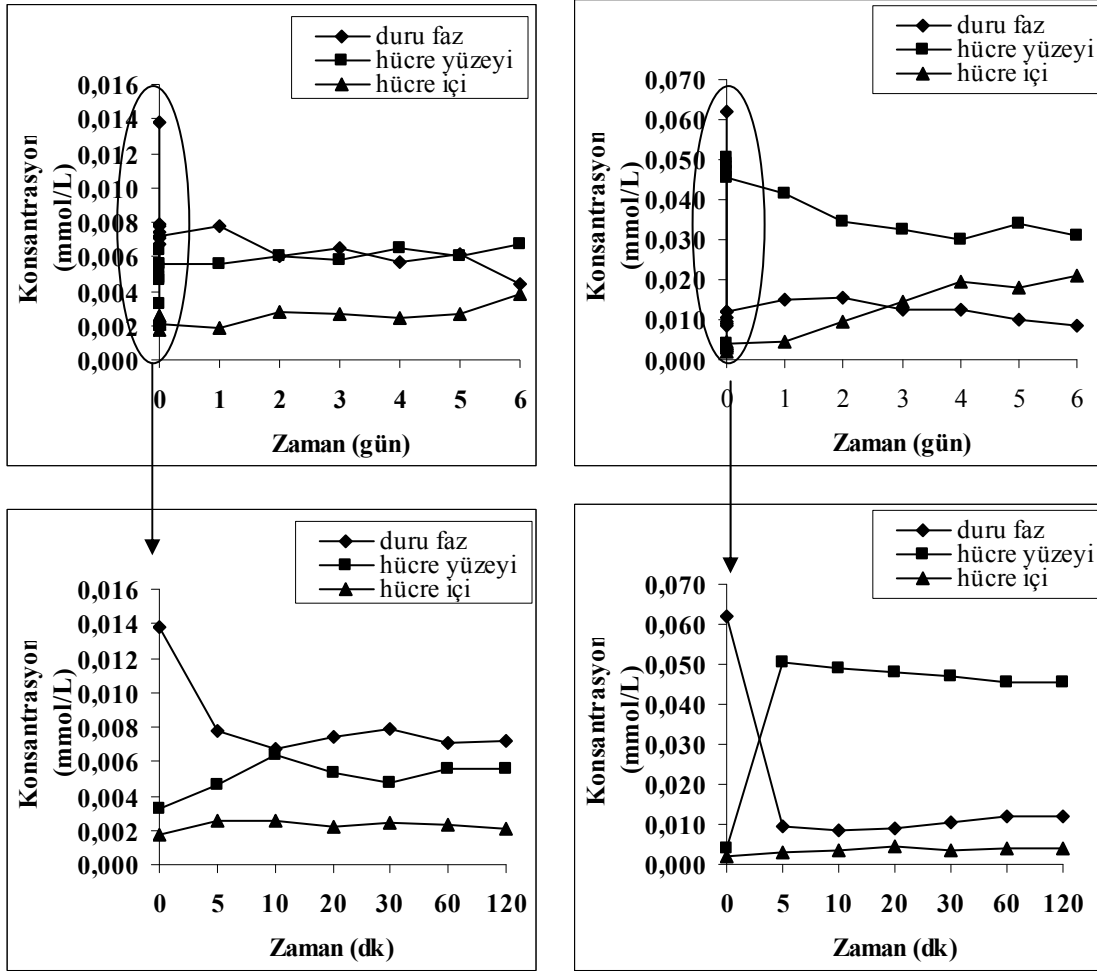
(a) (C0=0.015 mmol Zn/L)

(b) (C0=0.061 mmol Zn/L)

Şekil 2. *Synechocystis* sp. (E35) izolatının Cu-Zn biyosorpsiyonu/biyobirikimi (T=23°C, pH=7, V=40 ml, Çalkalama Hızı=100 rpm)

Cu iyonları, 30. dakikaya kadar suda azalırken, 30. dakikadan sonra sudaki bakır konsantrasyonu çok fazla değişmemiştir (Şekil 3.a). Çinko-bakır ikili biyosorpsiyon sisteminde, her bir metalin başlangıç konsantrasyonu artırıldığında, bakırın biyosorpsiyonunun daha hızlı gerçekleştiği

görülmektedir. Cu-Zn bimetalik biyosorpsiyon sisteminde, hücre içine alınan bakır konsantrasyonu 0.004 mmol/L'dir (Şekil 3.a). Her bir metalin başlangıç konsantrasyonu artırıldığında, hücre içine alınan Cu konsantrasyonu 0.021 mmol/L'ye ulaşmıştır (Şekil 3.b).

(a) ($C_0=0.016$ mmol Cu/L)(b) ($C_0=0.063$ mmol Cu/L)

Şekil 3. *Synechocystis* sp. (E35) izolatının Cu-Zn biyosorpsiyonu/biyobirikimi ($T=23^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $V=40$ ml, Çalkalama Hızı=100 rpm)

Demirel ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada kullanılan siyanobakteri izolatlarının, metal içeren ortamlarda hücre dışı polisakkarit (HDP) yapılar ürettikleri rapor edilmiştir [16]. HDP yapılar negatif yüklü olma özelliklerinden dolayı, pozitif yüklü metallerin ortamdan biyosorpsiyonla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [17]. Bu çalışmada kullanılan *Synechocystis* sp. E35 izolatının da metal çözeltisi bulunan besi ortamında bir savunma mekanizması olarak HDP ürettiği ve bu şekilde ortamdaki metal iyonlarını hücre yüzeyine biyosorbe ettiği düşünülmektedir. Böylece metaller deneme başlangıcında hücre yüzeyine tutunmakta, zamanla aktif alım ile hücre zarından geçerek hücre içine alınmaktadır.

4. Değerlendirme ve Öneriler

Küçükçekmece Gölü ve Havzası'nda; evsel, endüstriyel ve tarımsal kaynaklı kirleticilerin doğrudan ya da dolaylı olarak deşarjı sonucunda, gölde dönem dönem

aşırı alg patlamaları gözlemlenmektedir. Bu çalışmada, alg patlaması sırasında alınan numunelerden izole edilen siyanobakteri türünün, Küçükçekmece Gölü'nde en sık rastlanan metallerden Zn-Cu biyosorpsiyon/biyobirikim özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *Synechocystis* sp. E35'in biyosorpsiyon/biyobirikim özelliğinden dolayı, kendisi ya da bu türden elde edilecek olan HDP yapılar kullanılarak; Küçükçekmece Gölü'nün in-situ (yerinde) arıtımı çalışmaları yürütülebilir. Bu siyanobakteri türü ile başka metaller kullanılarak yapılacak olan çalışmalar, göldeki diğer metallerin de arıtılabilirliğine ışık tutacaktır.

Kaynaklar

1. Meyyappan, Rm. and Ramsenthil, R. "Single and Multi-component Biosorption of Copper and Zinc Ions Using Microalgal Resin", International Journal of Environmental Science and Development, 1-4, 298-301, 2010.

2. Dönmez, G.Ç., Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T. "A Comparative Study on Heavy Metal Biosorption Characteristics of Some Algae", *Process Biochemistry*, 34, 885-892, 1999.
3. Lee, S.H., Yang, J.W. "Removal of Cu in Aqueous Solution by Apple Wastes", *Separation Science and Technology*, 32-8, 1371-1387, 1997.
4. Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A. "A Review Of The Biochemistry Of Heavy Metal Biosorption By Brown Algae", *Water Research*, 37, 4311-4330, 2003.
5. Iyer, A., Mody, K. And Jha, B. "Biosorption Of Heavy Metals By A Marine Bacterium", *Marine Pollution Bulletin*, 50 (3), 340-343, 2005.
6. Malik, A. "Metal Bioremediation Through Growing Cells", *Environment International*, 30, 261-278, 2004.
7. Chojnacka, K. "Biosorption and Bioaccumulation-The Prospects For Practical Applications", *Environment International*, 36, 299-307, 2010.
8. Zhou, W., Juneau, P. And Qiu, B. "Growth and Phosynthetic Responces of the Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Elevated Levels of Cadmium", *Chemosphere*, 65 (10), 1738-1746, 2006.
9. Humble, A.V., Gadd, G.M., Codd, G.A. "Binding of Copper and Zinc to Three Cyanobacterial Microcystins Quantified by Differential Pulse Polarography", *Water Research*, 31 (7), 1679-1686, 1997.
10. Üstün, B., İnce N., Cansever G., Ülger E., Ağcıoğlu B., Şapçı Z., Demirel S. And Okumuş E. et al. "The Development of Environmental Management Model in Küçükçekmece Basin", Joint Research and Development Project (GSRT-TUBITAK), Proje No: 102Y011, 2005.
11. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R. "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria", *J. Gen. Microbiol*, 111, 1-61, 1979.
12. Matsunaga T., Takeyama H., Nakao T., Yamazawa A. "Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater", *Journal of Biotechnology*, 70, 33-38, 1999.
13. Hong, C. Shan, P. "Bioremediation Potential of *Spirulina*: Toxicity and Biosorption Studies of Lead". *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B(3), 171-174, 2005.
14. Sheng, P., X., Ting, Y., P., Chen, J., P., Hong, L. "Sorption of Lead, Copper, Cadmium, Zinc, And Nickel By Marine Algal Biomass: Characterization Of Biosorptive Capacity And Investigation Of Mechanisms", *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 131-141, 2004.
15. Dursun, A.Y., Uslu, G., Cuci, Y. and Aksu, Z. "Bioaccumulation of Copper(II), Lead (II) and Chromium (IV) by Growing *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 38, 1647-1651, 2003.
16. Demirel, S., Ustun, B., Aslım, B., "Toxicity and Uptake Of Iron Ions By *Synechocystis* Sp. E35 Isolated From Küçükçekmece Lagoon, Istanbul". *Journal of Hazardous Materials*, 171 (1-3), 710-716, 2009.
17. Kaplan, D., Christian, D., Arod, S. "Chelating Properties of Extracellular Polysaccharides From *Chroloa* sp." *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2268-2270, 1987.