

***Ralstonia eutropha* H16 suşuyla sulu çözeltilerden kurşun ve bor biyogiderimi**

Kamil Varınca¹, Miraç Uçkun², Şeyma Akkurt¹, Aysel Alkan Uçkun*¹

¹ Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, 02040, Merkez/Adıyaman

² Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 02040, Merkez/Adıyaman

(Alınış / Received: 30.05.2021, Kabul / Accepted: 05.07.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 31.08.2021)

Anahtar Kelimeler

Biyosorpsiyon
Ralstonia eutropha
Atık suların biyolojik arıtımı
Sulardan metal biyogiderimi
Bakterilerin SEM görüntüleri

Öz: Bu çalışmada, su ortamlarına en fazla karışan ve canlılar üzerinde önemli toksik etkileri bulunan kurşun (Pb) ile kullanımı giderek yaygınlaşan ve ülkemiz için oldukça büyük stratejik öneme sahip olan bor (B) elementinin sulardan gideriminde, geleneksel yöntemlere alternatif olarak daha ekonomik, kullanışlı ve etkin bir yöntem olan biyolojik arıtımın kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, *Ralstonia eutropha* H16 suşunun Pb ve B bağlama kapasitesi test edilmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK), kurşun klorür (PbCl₂) için 1365 ppm, borik asit (H₃BO₃) için 2500 ppm olarak belirlenmiştir. PbCl₂ ve H₃BO₃'ün üç alt dozu (PbCl₂ için 5, 25, 50 ppm; H₃BO₃ için 500, 1000, 1500 ppm) bakterilere 24 saat boyunca uygulanmış ve bu sürenin sonunda kültür ortamında, bakteriyel hücrelerin yüzeyinde ve içinde olmak üzere üç farklı ortamda biriken Pb ve B konsantrasyonları bir İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanılarak tayin edilmiştir. En fazla Pb biyogiderimi %88'lik bir oranla 5 ppm PbCl₂ uygulamasında, en fazla B giderimi ise %7'lik bir oranla 500 ppm H₃BO₃ uygulamasında gözlenmiştir. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri, PbCl₂ uygulanan hücrelerin yüzeyinin kontrole göre pürüzlü olduğunu ve önemli derecede çökeltmeler olduğunu göstermiştir. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) spektrumları ise PbCl₂ uygulanan hücrelerde Pb varlığını doğrulamıştır. Çalışmanın sonuçları, *R. eutropha* H16 suşunun sulardan Pb gideriminde önemli derecede etkili olduğunu ancak B gideriminde yeterli olmadığını göstermiştir.

Lead and boron bioremoval from aqueous solutions by *Ralstonia eutropha* H16 strain

Keywords

Biosorption
Ralstonia eutropha
Biological treatment of waste waters
Metal bioremoval from waters
SEM images of bacterias

Abstract: In this study, it was aimed to use biological treatment, which is a more economical, useful and effective method alternative to traditional methods in removal of lead (Pb), which is the most involved element in aquatic environments and has significant toxic effects on organisms from the waters, and boron (B), which is increasingly widespread and has great strategic importance for our country. For this purpose, the binding capacity of *Ralstonia eutropha* H16 strain to Pb and B was tested. Minimum Inhibition Concentrations (MIC) were determined as 1365 ppm for lead chloride (PbCl₂) and 2500 ppm for boric acid (H₃BO₃). Three sub-doses of PbCl₂ and H₃BO₃ (5, 25, 50 ppm for PbCl₂; 500, 1000, 1500 ppm for H₃BO₃) were applied to the bacteria for 24 hours, and at the end of this period the metal concentrations accumulated in the medium, on the surface of the bacterial cells and inside the cells were calculated using a Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). The highest Pb removal was observed in 5 ppm PbCl₂ application with a rate of 88%, and the highest B removal was observed in 500 ppm H₃BO₃ application with a rate of 7%. Scanning Electron Microscope (SEM) images showed that the surface of the cells treated with PbCl₂ was rough compared to the control and there was significant precipitations. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) spectra confirmed the presence of Pb in PbCl₂ treated cells. The results of the study showed that *R. eutropha* H16 strain was significantly effective in Pb removal from water, but not sufficient in B removal.

*İlgili Yazar: ayseluckun@gmail.com

1. Giriş

Gelişen sanayi ile birlikte, endüstriyel atıkların su kaynaklarına ulaşması, akarsuların ağır metallere daha çabuk ve fazla kirlenmesine sebep olmaktadır. Ağır metaller hem doğal olaylar (erozyon, rüzgâr taşınımı, volkanik etkiler, vb.) hem de antropojenik etkiler (atık su deşarjları, zirai faaliyetler, atık depolama vb.) sonucunda yer altı ve yüzeysel su kaynaklarına karışmaktadır [1]. Toprak ve su ortamlarının çeşitli toksik metallere kirlenmesi ekosistem ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit olup uygun iyileştirici önlemlerin acilen uygulanmasını gerektirmektedir. Krom (Cr), kadmiyum (Cd), cıva (Hg), arsenik (As), kurşun (Pb) vb. ağır metallerin, çevre ve insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri nedeniyle başlıca çevresel kirlenmeler olarak kabul edilmektedir [2].

Kurşun (Pb), yaygın bir çevresel toksik kirlenici olarak kabul edilmektedir ve kurşun-asit pillerin işlenmesinde, madencilik, metal işleme endüstrisi, nükleer reaktör koruma kalkanı, elektronik bileşenlerin ince tabakaları, araçlar, akü plakaları, boyalar, seramikler, kabloların üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [3, 4]. Ayrıca bu endüstrilerin kanalizasyon çamurunda, enerji santrali ve atık yakma tesislerinden kaynaklanan atıklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan tehlikeli ağır metallere biridir [4]. Düşük konsantrasyonlarda bile kurşun canlılar için toksik olup nörodejeneratif bozukluk, böbrek yetmezliği, üreme hasarı ve kanser gibi insanlar üzerinde ciddi sağlık sorunlarına neden olan mutajenik ve teratojenik bir metaldir [5]. Bu toksik özellikleri nedeniyle, ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından kurşun tehlikeli inorganik atıklar listesine eklenmiş [5], içme suyundaki sınır değeri olarak da 15 µg/L belirlenmiştir [6].

Bor (B), metal ve ametal arasında bir özelliğe sahip olan yarı metaldir ve 3A grubu elementidir. Bor, doğada serbest hâlde bulunmaz, her zaman oksijene bağlanır [7]. Bor ve bileşikleri, ekosistemlerin abiyotik ve biyotik bileşenlerinde kendilerine özgü kimyaları nedeniyle bozunamazlar. Bu nedenle tuz birikintilerinin süzülmesi ve minerallerin kayalardan ayrıştırılması gibi doğal süreçler sonucunda su ortamlarına salınırlar [8]. Ayrıca bor, antropojenik kaynaklardan da doğaya salınmaktadır [9]. Bor, doğada düşük konsantrasyonlarda yaygın bir şekilde dağılmıştır ve yüzey tatlı sularında genellikle 0,1-0,5 mg/L'den daha azdır, ancak daha yüksek konsantrasyonları birkaç alanda ölçülür [10]. Bor, bir mikro besin olup bitkilerin, tek hücreli ökaryotların ve hayvanların büyümesi için gereklidir, ancak gerekli bor seviyeleri bu organizmalar arasında farklılık gösterir [11]. Öte yandan bor belirli bir eşiğin üzerinde canlı hücreler için toksiktir. Ayrıca insanlarda bor maruziyetinin üst eşiğinden daha yüksek dozlar, testisler ve üreme fonksiyonları üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir [7]. Bor minerallerinin endüstride kullanım alanları oldukça geniştir. Borun en yaygın kullanıldığı alan cam endüstrisi olup diğer endüstri alanları seramik, temizleme ve ağartma, alev geciktiriciler, tarım, metalürji, nükleer uygulamalar, bor elyafları, havacılık, enerji, sağlık ve çimentodur. Seramik sektöründe bor mineralleri genellikle seramik sır üretiminde ve porselen emaye yapımında frit üretimi aşamasında kullanılmaktadır [12]. Bununla birlikte, sucul ekosistemlerdeki en önemli antropojenik bor kirlilik yolu, boraks içeren deterjanların kullanılmasıdır. Boraksla zenginleştirilmiş deterjanlar ve temizlik ürünleri kullanılması durumunda, borik asit (H_3BO_3) gibi suda çözünür bor formları, evsel atık su ile kolayca kanalizasyon arıtma sistemlerine deşarj edilir [13]. Türkiye dünyanın en büyük bor ihracatçılarından biridir. Tinkal, kolemanit ve üleksit mineral konsantreleri, rafine boraks dekahidrat; boraks pentahidrat ($Na_2O \cdot 2B_2O_3 \cdot 5H_2O$); susuz boraks ($Na_2O \cdot 2B_2O_3$); ve borik asit (H_3BO_3) ihraç edilmektedir. Türkiye, dünyadaki bor rezervlerinin %73'üne sahiptir. Ülkemizde bilinen bor yatakları; Eskişehir-Kırka, Kütahya-Emet, Balıkesir- Bandırma ve Bigadiç'te bulunmaktadır [14]. Birçok endüstride yaygın olarak kullanılan bor bileşiklerinin endüstriyel gelişmelere bağlı olarak yüzeysel sulardaki konsantrasyonu artış göstermektedir. Bor, Türkiye'de su kaynaklarının kirlenmesine neden olan önemli kirlenicilerden biridir. Borun arıtılması hem insan sağlığı hem de tarımsal ürün yetiştiriciliği için büyük önem taşımaktadır. Borun giderilmesinde, konvansiyonel su arıtımı yöntemleri (pıhtılaşma, çökeltme, filtrasyon) etkili değildir. Bu nedenle, bor konsantrasyonu yüksek olan suların borun giderilmesi için özel yöntemlerin kullanılması gerekir. İyon değişimi ve ters ozmoz süreçleri önemli ölçüde giderim sağlayabilir, ancak bu yöntemler görece daha pahalıdır.

Türkiye'de Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterleri verilmiştir. Buna göre kurşun sınır değeri I. Sınıf sular için 0,01 mg/L, bor sınır değeri ise tüm sınıf sular için 1,0 mg/L olarak belirlenmiş olup bora karşı hassas bitkilerin sulanmasında ise sınır değer 0,3 mg/L'ye kadar düşürülmüştür. Maden sanayii atık sularının alıcı ortama deşarj standartlarında ise kurşun için sınır değer 0,5 mg/l, bor için ise sınır değer 500 mg/L olarak verilmiştir [15]. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'e göre içme suyunda bulunabilecek maksimum kurşun konsantrasyonu 0,01 mg/L, maksimum bor konsantrasyonu ise 1 mg/L'dir [16]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından içme suyundaki kılavuz kurşun değeri 0,01 mg/L, bor değeri ise 2,4 mg/L olarak tayin edilmiştir [17].

Toprak ve su ortamlarının çeşitli toksik metallere kirlenmesi ekosistem ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit olup uygun iyileştirici önlemlerin acilen uygulanmasını gerektirmektedir. Farklı endüstriyel ve tarımsal atıkların oluşturduğu ağır metallerin kirlenmiş ortamlardan (su, atık su, toprak vb.) giderilmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır [18]. Fiziksel ve kimyasal arıtma teknolojileri (ileri oksidasyon prosesleri, kimyasal çökeltme, iyon değişimi, elektrokimyasal yöntemler, aktif karbon, membran filtrasyonu ve ters ozmoz vb.) farklı kirlenicileri uzaklaştırmasına rağmen, artan enerji tüketimi, arıtım süreçlerinin zorluklar içermesi, ek kimyasallara ihtiyaç

duyulması, arıtma verimliliğinin düşük olması, yan ürünlerden kaynaklanan ikincil kirlilik vb. birçok dezavantajlara sahiptir [19, 20]. Bununla birlikte, kimyasal çöktürme ve elektrokimyasal arıtma, özellikle sulu çözeltideki metal iyon konsantrasyonu düşük konsantrasyonlarda etkili değildir ve proses sonunda arıtımı oldukça zor ve maliyetli olan yüksek miktarda çamur üretilir. İyon değiştirme, membran teknolojileri ve aktif karbon adsorpsiyon işlemi, düşük konsantrasyonda ağır metal içeren atık suların arıtılması için son derece pahalıdır ve bu yüzden büyük ölçekte kullanılamazlar [21]. Biyoremediasyon prosesinde ise, metallerin giderilmesi ve geri kazanımı, kullanılan konvansiyonel fiziksel-kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla çevre dostu, ekonomik, kolay uygulanabilir olması, ek kimyasal gerektirmemesi, yüksek arıtma verimine sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir [22]. Bu proses; kontamine toprak ve su ortamlarından, kirlilik yaratan bileşiklerin (metal, pestisit vb.) doğada doğal olarak bulunan mikroorganizmalar (bakteri, mantar, maya, yosun vb.) tarafından biyolojik olarak parçalanarak çevreye daha az zararlı bileşiklere dönüştürülmesi ile kirlenen bölgelerin temizlenmesi işlemidir [23]. Ayrıca, bu proseste kullanılan mikroorganizmaların metallere karşı yüksek affinitesinin olması nedeniyle ağır metal ve metal iyonlarının neden olduğu çevre sorunlarını çözmek için konvansiyonel yöntemlere önemli bir alternatiftir [24].

Yüksek konsantrasyondaki ağır metaller ile kirlenmiş bölgelerde yaşayan mikroorganizmalar çeşitli genetik mekanizmalar geliştirerek metallerin zararlı etkilerine karşı direnç gösterirler. Genellikle, kirliliğin hayatta kalma yetenekleri olan suşlar ortamdan izole edilerek, biyoremediasyon uygulaması için kullanılırlar [25]. Gram negatif betaproteobacterium *Ralstonia eutropha* toprakta ve tatlı su ortamlarında bulunur. Kısmen birçok farklı bileşiği besin ve enerji kaynağı olarak kullanma kabiliyetinden dolayı, *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* ve *Wautersia eutropha* olarak daha önce adlandırılmış ve yeniden adlandırılmıştır. Organizmanın günümüzde kullanılan isimleri; *Cupriavidus necator* ve *Ralstonia eutropha*'dır [26]. Metabolik olarak çok yönlü *R. eutropha*, zorlu çevre koşullarında hayatta kalma yeteneğine sahiptir. Aromatikler ve ağır metaller dâhil olmak üzere çeşitli çevre kirleticilerine karşı toleranslıdır [27]. Bir çalışmada [28], ağır metallerle kirlenmiş toprağa *R. eutropha* aşılandığında, ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksik etkisinin azaldığı görülmüştür. Bu durum, *R. eutropha*'nın ağır metal biyoremediasyonu için bir detoksifikasyon ajanı olabileceğini göstermiştir. *Ralstonia sp.* dâhil olmak üzere metale dirençli bakterilerin uygulanması, biyoremediasyon prosesi için etkili perspektifler sunar [28]. Daha önce bu konuda yapılmış olan çalışmalarda, göl çökeltilerinde ve endüstriyel biyotoplarda *Ralstonia*'nın metal direnci daha önce bildirilmiştir [29].

Bu çalışmada, sulara karışan en toksik elementlerden biri olan kurşun ile ülkemizde bol bulunan ve dolayısıyla sulara karışması kaçınılmaz olan borun sulardan biyolojik olarak gideriminde, toprak ve tatlı su ortamlarında doğal olarak bulunan yabancıl *R. eutropha* H16 suşunun etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), bir mikroorganizmanın büyümesini en az seviyede inhibe eden metal konsantrasyonudur [30]. *R. eutropha* H16 suşunun Pb ve B metallerine karşı direnç kapasitesi, Aleem vd. (2003)'nin [31] MİK metoduna göre belirlenmiştir. Çalışmada, yalnızca Lauren Broth besiyeri (LB), LB ve metal solüsyonu, LB ve hücre kültürü olmak üzere üç farklı kontrol grubu kullanılmıştır. *R. eutropha* H16 suşu (ATCC 17699) farklı konsantrasyonlarda PbCl₂ (50-2000 mg/L) ve en yaygın B formu olan H₃BO₃ (400-3000 mg/L) içeren LB agar ve broth ortamına ayrı ayrı inoküle edilmiştir. LB agar ve broth daha sonra 37°C'de 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat) numuneler alınmış ve bir mikropilaya okuyucusunda (Thermo Flash 2000) 600 nm'de ölçülmüştür.

2.2. Biyobirikim deneyleri

Biyobirikim deneylerinde, *R. eutropha* hücresine farklı oranlarda PbCl₂ (5, 25 ve 50 ppm) ve H₃BO₃ (500, 1000, 1500 ppm) içeren çözeltiler uygulanmış ve çalkalamalı olarak ayrı ayrı 120 rpm'de 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu suşun kontrol gruplarına PbCl₂ ve H₃BO₃ uygulaması yapılmamıştır. Besiyerinde kalan Pb ve B miktarını belirlemek için 24 saat sonunda kültür ortamından örnekler alınmıştır. Vortekslenerek homojenize edilen numunelerden 1 ml alınarak steril bir tüpe aktarılmıştır. Örnekler, 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve 0,45 µm gözenek çapına sahip bir filtreden süzölmüştür. Hücre yüzeyindeki metal birikimlerini belirlemek için önceki aşamada santrifüjden sonra çökmüş hücrelere 1 ml 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi ilave edilmiş, 2500 rpm'de vortekslenerek homojen hâle getirilmiştir. Bu örnekler oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilmiş ve 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra 0,45 µm gözenek çapına sahip bir filtreden süzölmüş, filtratta kalan numune 1/100 oranında seyreltilmiştir. Hücrelerin içinde biriken metal konsantrasyonlarını belirlemek için çöken hücrelere 1 M HNO₃ (Merck)'den 1 ml eklenmiş, 3 dk boyunca 2500 rpm'de vortekslenmiş ve sonra 10000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süzüntüler 0,45 µm gözenek çapına sahip bir filtreden süzölmüştür. Her üç

ekstraksiyon sonucunda filtratta kalan numuneler 1/100 oranında seyreltilmiştir. Örneklerdeki Pb ve B miktarı, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS; Perkin Elmer & Nexion 350X) kullanılarak belirlenmiştir.

2.3. Görüntü analizleri

PbCl₂ uygulanan ve uygulanmayan *R. eutropha* H16 suşlarının hücre yüzeyinde morfolojik modifikasyonlarını gözlemlemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır. SEM analizi için hücreler, PbCl₂ (100 mg/L) içeren ve içermeyen (kontrol) 50 ml LB sıvı besiyerine aşılınmış ve 120 rpm'de 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler alınmış ve 5000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pelletler üç kere fosfat tamponu (PBS, pH 7,2) ile yıkandıktan sonra 2 saat boyunca 4°C'de %2,5 glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Hücrelerin PBS ile yıkanma işlemi iki kere tekrarlandıktan sonra %1 osmiyum tetraoksit ile sabitlenmiştir. Sabitlenmiş hücreler PBS tamponunda iki kere yıkandıktan sonra değişen konsantrasyonlardaki asetonla (%15, %30, %60, %90 ve %100) dehidre edilmiştir. Son olarak, kritik olarak kurutulmuş numuneler altın-platin (Quorum) ile kaplanmış ve SEM ve EDX (Zeiss & Evo LS 10 (Almanya)) ile analiz edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. MİK değerleri ve metallerin alt dozlarının belirlenmesi

MİK değeri, mikroorganizmaların ağır metallere tolerans kapasitelerini göstermektedir. Yılmaz [32], *Escherichia coli*'nin H₃BO₃ MİK değerini 7,60 ppm, Darcan ve Kahyaoglu [33] ise *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın H₃BO₃ MİK değerlerini 8 ppm olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise *R. Eutropha* H16 suşunun PbCl₂ ve H₃BO₃ için MİK değerleri sırasıyla 1365 ppm ve 2500 ppm olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu MİK değerleri göz önünde bulundurularak da Pb ve B için üç alt doz uygulanmıştır. Uygulanan dozlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. PbCl₂ ve H₃BO₃ MİK değerleri ile uygulanan alt dozları

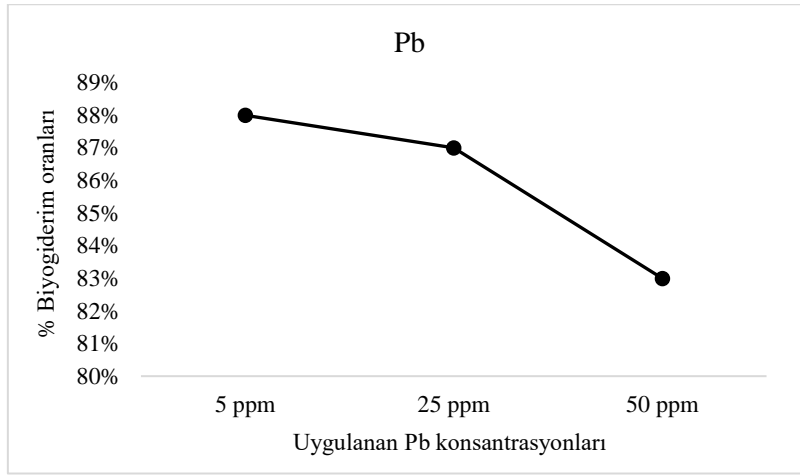
PbCl ₂ (ppm)	H ₃ BO ₃ (ppm)
MİK: 1365	MİK: 2500
50	1500
25	1000
5	500

3.2. Biyogiderim

PbCl₂'nin *R. eutropha*'ya uygulanması sonucu ICP-MS ile besiyerinde, hücre yüzeyinde ve hücre içinde saptanan Pb değerleri uygulanan PbCl₂ miktarına göre Tablo 2'de, uygulanan PbCl₂ miktarına göre toplam Pb biyogiderim oranları ise Şekil 1'de verilmiştir. % Biyogiderim oranları şu formüle göre hesaplanmıştır: Hücredeki toplam metal konsantrasyonu x 100 / Uygulanan metalin konsantrasyonu.

Tablo 2. Uygulanan PbCl₂ miktarına göre Pb'nin besiyerinde, hücre yüzeyinde ve hücre içinde ölçülen değerleri

Uygulanan PbCl ₂ miktarı (ppm)	Besiyerinde ölçülen Pb miktarı (ppm)	Hücre yüzeyinde ölçülen Pb miktarı (ppm)	Hücre içinde ölçülen Pb miktarı (ppm)	Toplam biyogiderim oranı
5	0,60	3,05	1,35	%88
25	3,25	18,00	3,75	%87
50	8,50	37,50	4,00	%83



Şekil 1. Pb'nin toplam biyogiderim oranları

Tablo 1'e göre; uygulanan PbCl₂'nin 5 ppm'lik konsantrasyonunun %12'si besiyerinde, %61'i hücre yüzeyinde ve %27'si hücre içinde birikmiştir. 25 ppm'lik uygulama dozunda Pb'nin %13'ü besiyerinde, %72'si hücre yüzeyinde ve %15'i hücre içinde bulunmuştur. En yüksek doz olan 50 ppm'de ise Pb'nin %17'si besiyerinde, %75'i hücre yüzeyinde ve %8'i hücre içinde saptanmıştır. Bu sonuçlara göre hücre yüzeyinde en fazla tutulum en yüksek konsantrasyon olan 50 ppm'de, hücre içinde en fazla birikim ise en düşük konsantrasyon olan 5 ppm'de gözlenmiştir. Toplam biyogiderim ise en fazla %88'lik oranla 5 ppm uygulama dozunda olmuştur.

Bakterilerin Pb biriktirme kapasiteleri uygulanan Pb başlangıç dozuna bağlıdır. 150 mg/L'den fazla Pb konsantrasyonunda, organizma metalleri taşımak için daha büyük bir itici güç gerektirir [34]. Genellikle düşük konsantrasyonlarda metaller için bakteriyel yüzey üzerindeki bağlanma yerleri mevcut olur ancak yüksek metal konsantrasyonlarında bağlanma yerleri doymuş hâle gelir [35].

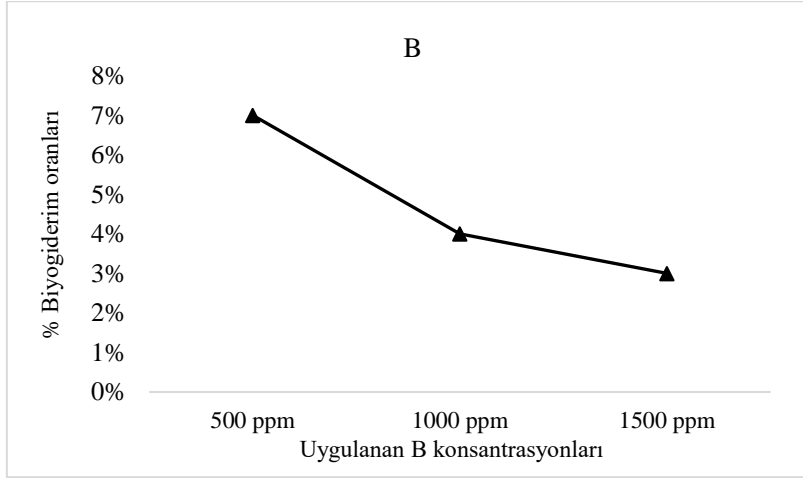
Literatürde pek çok bakterinin Pb'u hücre yüzeyine adsorbe ettiği bildirilmiştir. Roane [36], Pb'ye dirençli bakteri *Pseudomonas marginalis* ve *Bacillus megaterium*'u izole etmiş ve *P. marginalis*'in sitoplazmada ekzopolimer üreterek Pb'u hücre dışında tuttuğunu, *B. megaterium*'un ise Pb'u hücre içinde biriktirdiğini tespit etmiştir. Puyen vd. [37], *Micrococcus luteus* DE2008'in 1965 mg/g Pb(II) adsorpsiyon kapasitesi sergilediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Maldonado vd. [38], bakteriyel ekzopolimer tarafından Pb(II) birikimini bildirmiştir. *Pseudomonas* BC15, *Enterobacter* sp. J1 ve *Bacillus cereus* BPS9'un, besiyerinde bulunan Pb'nun %65, %75 ve %78'ini hücreye absorpladığı bildirilmiştir [24, 39, 40]. Bakterilerin, ağır metalleri hücre içinde biriktirmesinde metal bağlayıcı proteinlerin etkili olduğu bilinmektedir.

Literatürdeki çalışmalar ile bu çalışma genel olarak kıyaslandığında, kullanılan *R. eutropha*'nın %88'lik oranla en fazla giderim yapan tür olduğu söylenebilir. Ancak bu kıyaslama uygulanan dozların ve deney koşullarının (pH, sıcaklık, başlangıç konsantrasyonu, uygulama süresi vs.) farklılığına göre değişkenlik gösterebilir.

H₃BO₃'ün *R. eutropha*'ya uygulanması sonucu ICP-MS ile besiyerinde, hücre yüzeyinde ve hücre içinde saptanan B değerleri uygulanan H₃BO₃ miktarına göre Tablo 3'de, uygulanan H₃BO₃ miktarına göre toplam B biyogiderim oranları ise Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 3. Uygulanan H₃BO₃ miktarına göre B'nin besiyerinde, hücre yüzeyinde ve hücre içinde ölçülen değerleri

Uygulanan H ₃ BO ₃ miktarı (ppm)	Besiyerinde ölçülen B miktarı (ppm)	Hücre yüzeyinde ölçülen B miktarı (ppm)	Hücre içinde ölçülen B miktarı (ppm)	Toplam biyogiderim oranı
500	465	30,00	5,00	%7
1000	960	30,00	10,00	%4
1500	1455	4,50	40,50	%3



Şekil 2. B'nin toplam biyogiderim oranları

Tablo 2'ye göre; H_3BO_3 'ün 500 ppm'lik doz uygulanması sonucu, bu konsantrasyonun %93'ü besiyerinde, %6'sı hücre yüzeyinde ve %1'i hücre içinde belirlenmiştir. 1000 ppm H_3BO_3 uygulamasında, besiyerinde %96, hücre yüzeyinde %3 ve hücre içinde %1 oranlarında B tespit edilmiştir. 1500 ppm'lik H_3BO_3 uygulaması sonucu besiyerinde %97, hücre yüzeyinde %0,3 ve hücre içinde %2,7 oranlarında B varlığı saptanmıştır. Toplam biyogiderim oranları uygulanan H_3BO_3 konsantrasyonları arttıkça sırasıyla %7, %4 ve %3 olarak hesaplanmıştır. Buna göre en fazla biyogiderim en düşük H_3BO_3 konsantrasyonu olan 500 ppm'de gözlenmiştir.

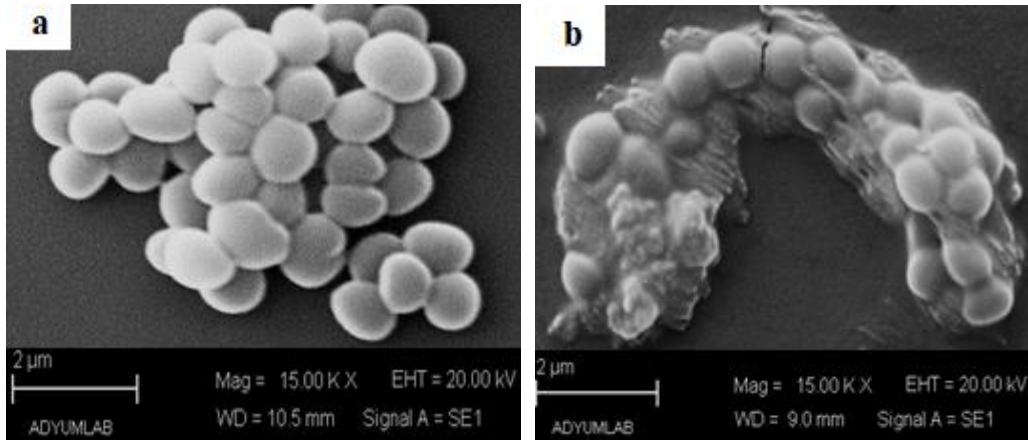
Doğal ortamdaki B konsantrasyonları 0,1-10 mg/L arasında değişir (örneğin, atık suda yaklaşık 10 mg/L, deniz örneklerinde 4-7 mg/L ve tipik toprak örneklerinde yalnızca 0,1-0,7 mg/L) [41]. Yüksek konsantrasyonlarda B içeren kirlenmiş toprak ve kanalizasyon çamuru, yüksek B biriktiren bakteriler için çevresel bir niş oluşturabilir. Ancak tek hücreli mikroorganizmalarda bile, hücre içi B seviyesinin türler arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu, bakterilerde hücre içi B için bir düzenleyici mekanizmanın var olabileceğini düşündürmektedir. B için aktif bir taşıma mekanizması, bakterilerin B eksikliği olan koşullar altında B alması veya fazla B'un sitotoksik etkilerinden kaçınması için önemli bir rol oynayabilir [42]. Miwa ve Fujiwara [42], Hisarcık (Kütahya, Türkiye) bölgesinde borla kirlenmiş topraklardan izole ettikleri BAM522 suşunun 1,36 nmol/g, BAM5 suşunun 0,67 nmol/g oranında hücre içinde B biriktirdiğini, yine aynı çalışmada topraktan izole edilmemiş bir laboratuvar suşu olan *Bacillus subtilis* ISW1214'in ise 0,62 nmol/g oranında B biriktirdiğini tespit etmişlerdir. Buradan görüldüğü üzere, bor ile kirlenmiş topraktan izole edilmiş suşlarla laboratuvar suşu arasında hücre içi B birikimi açısından çok önemli bir fark olmamıştır. Suşların B biriktirme kapasitesi, türlerin membran bileşimi, taşıma mekanizmaları ve borik asidi bağlayabilen protein ve organik bileşiklerin kullanımına göre değişir.

Raja ve Omine [43], uçucu kül boşaltma alanından izole ettikleri B toleranslı bakterilerin karakterizasyonunu yapmışlar, bunların *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium* ve *Ralstonia* cinsine ait olduğunu tanımlamışlardır. Bu suşların 0,1-2,0 mg/L aralığında B'yi besiyerinden ve 2,7-3,7 mg/L aralığında B'yi ise uçucu külden 168 saatte giderdiğini belirlemişlerdir. Laçın vd. [44], *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Aspergillus versicolor* suşlarının B içeren sentetik atık suyundan B giderim kapasitesini araştırmışlar, en etkin suşların *A. versicolor* ve *B. cereus* olduğunu tespit etmişlerdir. Bir fungus türü olan *A. versicolor*'un B biyobirikim verimi 16,20 mg/L B konsantrasyonunda %49,25 olmuştur. *Bacillus cereus*'un 20 mg/L B konsantrasyonunda B biyobirikimi %12,86 oranında olmuştur. Buradan, fungusların B gideriminde bakterilere göre daha etkin olduğu görülmüştür.

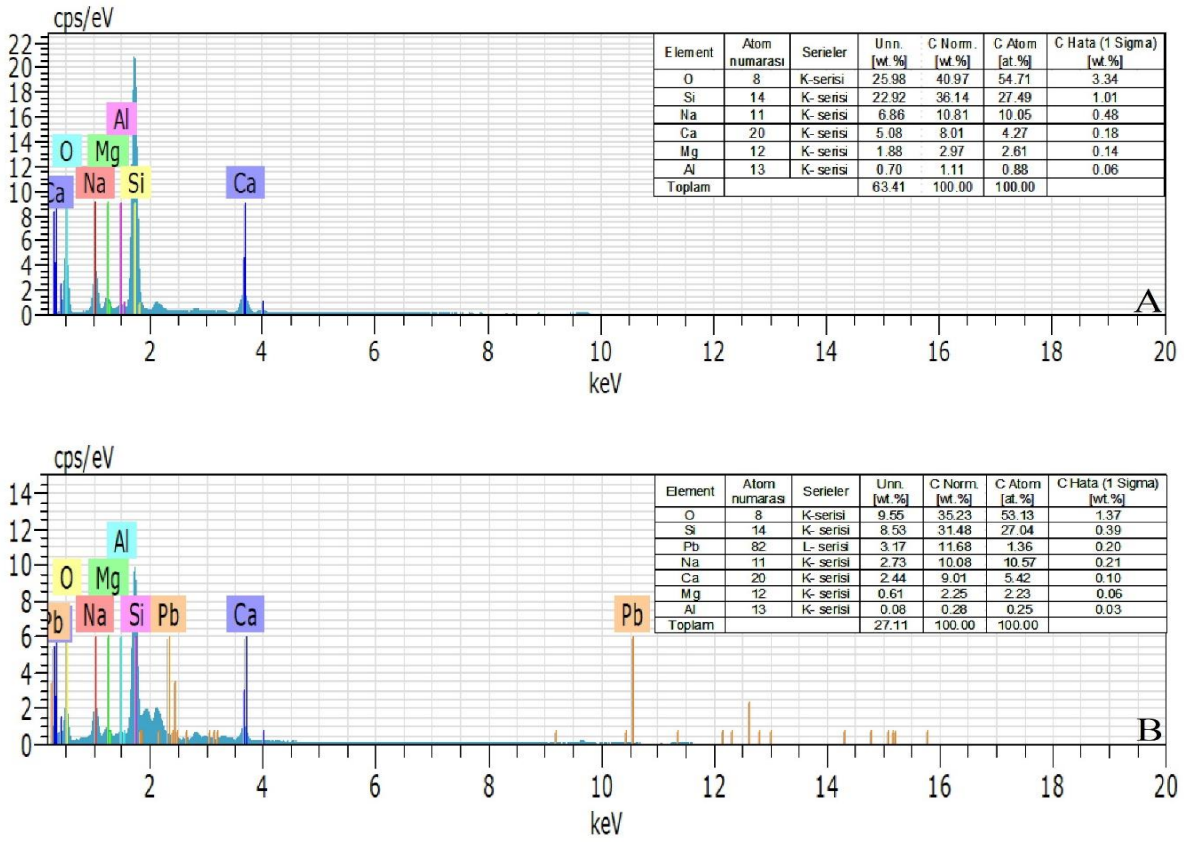
Bu çalışmada uygulanan B konsantrasyonları literatürdekilerden yüksek olduğundan net bir kıyaslama yapılamamakla birlikte genel bir değerlendirme yapıldığında biyogiderim oranlarının literatürdeki çalışmalara yakın değerlerde olduğu görülmüştür.

3.3. Hücre morfolojisi görüntüleri

R. eutropha suşunun SEM görüntüleri Şekil 3'de, EDX analizleri ise Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 3. *R. eutropha* suşunun SEM görüntüleri; a) $PbCl_2$ uygulanmamış b) 50 ppm $PbCl_2$ uygulanmış



Şekil 4. EDX analizi A) $PbCl_2$ uygulanmamış B) 50 ppm $PbCl_2$ uygulanmış

B biyogiderimi çok düşük konsantrasyonlarda olduğundan ve SEM-EDX analizlerinde B elementinin varlığı tanımlanamadığından dolayı sadece $PbCl_2$ uygulanmış (50 ppm) ve uygulanmamış (kontrol) bakterilerin SEM görüntüleri ve EDX sonuçları yazılmıştır.

SEM görüntüleri, hücrelerin yüzey morfolojisini gösterir. Buna göre, $PbCl_2$ uygulanmamış kontrol grubu bakterilerin morfolojisinin küre şeklinde ve pürüzsüz yüzeyli olduğu gözlenmiştir (Şekil 3a). $PbCl_2$ uygulanmış hücrelerin ise morfolojisinin önemli oranda etkilendiği ve gözle görülür hasar gördüğü açıktır. Bu hücrelerin yüzeyinde bazı floklaşmış çökelmeler görülmüştür (Şekil 3b). Agregasyon ve çökeltme, ağır metallerin bağlanmasında önemli bir role sahip olan hücre dışı polimerik maddelerden kaynaklanıyor olabilir [45].

EDX, biyosorbentlerin kimyasal ve elementel analizi için yararlı bir araçtır. EDX spektrumları, hücrelerin polisakkaritlerinde ve proteinlerinde olması muhtemel olan karbon, nitrojen ve oksijen sinyallerini göstermektedir. $PbCl_2$ uygulanmamış hücrelerin EDX analizinde hiçbir metal iyon zirvesi gözlenmemiştir (Şekil 4a). $PbCl_2$ uygulanmış hücrelerin EDX spektrumu ise bakteri hücrelerinin yüzeyinde Pb'nin bağlanmasının gözle görülür kanıtını açıkça göstermiştir (Şekil 4b).

Bu çalışmadaki bulgulara benzer olarak, Pugazhendhi vd. [2], Pb uyguladıkları *Ralstonia solanacearum*'un hücre yüzeyinin kontrole göre önemli derecede pürüzlü olduğunu gözlemlemişlerdir. Sagar vd. [46], ağır metal toksisitesine maruz kalan bakteri hücrelerinin birbirine yapışmasının ve fiziksel olarak parçalanmasının, toplam yüzey alanında bir azalma gösterdiğini öne sürmüştür. *Rhodobacter sphaeroides* SC01 suşuna 7 gün boyunca 160 ppm Pb uygulandığında, hücrelerin kontrole göre önemli ölçüde küçülme gösterdiği ve çok sayıda hücre döküntüsü olduğu gözlenmiştir [47]. Li vd. [45], *R. eutropha*'ya hiçbir metal uygulaması yapmadıklarında hücre yüzeylerinin net sınırlara sahip olup pürüzsüz yapıda olduğunu, 50-100 mg/L Cd uyguladıklarında hücrelerin yüzeylerinin pürüzlü hâle geldiğini ve tortularla kaplandığını gözlemlemiştir ve hücre morfolojisindeki bu değişiklikleri, stresli bir ortama tepki veren koruyucu bir mekanizma olarak yorumlamışlardır.

4. Sonuç ve Değerlendirme

R. eutropha'nın sulu çözeltilerden Pb ve B giderim etkinliği metalin türüne ve konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Bu suşun Pb giderim kapasitesi B'dan daha fazla bulunmuştur. En yüksek giderim verimi her iki metalin de en düşük konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bu metallerin gerçek sularda bulunma konsantrasyonları düşük olduğundan, *R. eutropha* suşunun düşük konsantrasyonlarda bile bu metalleri absorbe etmesi çevrede kullanılabilirliği açısından yararlıdır.

Kaynakça

- [1] Doğan G., Pseudomonas cinsi bakterilerde hegzavalent krom indirgeme üzerine organik moleküllerin etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2012.
- [2] Pugazhendhi A., Boovaragamoorthy GM., Ranganathan K., Naushad M., Kaliannan T., New insight into effective biosorption of lead from aqueous solution using *Ralstonia solanacearum*: characterization and mechanism studies, *Journal of Cleaner Production*, 174, 1234-1239, 2018.
- [3] Kalita D., Joshi SR., Study on bioremediation of lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat, *Biotechnology Reports*, 16, 48-57, 2017.
- [4] Lombardi PE., Peri SI., Verrengia Guerrero NR., ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (7), 1704-1711, 2010.
- [5] Shahid M., Pinelli E., Dumat C., Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands, *Journal of Hazardous Materials*, 219-220, 1-12, 2012.
- [6] Rosen MB., Pokhrel LR., Weir MH., A discussion about public health, lead and *Legionella pneumophila* in drinking water supplies in the United States, *Science of Total Environment*, 590-591, 843-852, 2017.
- [7] Çöl M., Çöl C., Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya province of Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1417-20, 2003.
- [8] Türker OC., Yakar A., Gür N., Bioaccumulation and toxicity assessment of irrigation water contaminated with boron (B) using duckweed (*Lemna gibba*) in a batch reactor system, *Journal of Hazardous Materials*, 324, 151-159, 2017.
- [9] Raja CE., Omine K., Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil, *African Journal of Biotechnology*, 11(9), 2267-2275, 2012.
- [10] Howe PD., A review of boron effects in the environment. *Biological Trace Element Research*, 66(1), 153-166, 1998.
- [11] Rowe RI., Eckhart CD., Boron is required for zebrafish embryogenesis, *Journal of Experimental Biology*, 202(12), 1649-1654, 1999.
- [12] Roskill. *The Economics of Boron*, 9th edition, 1999.
- [13] Hasenmueller EA., Criss RE., Multiple sources of boron in urban surface waters and groundwaters, *Science of Total Environment*, 447, 235-247, 2013.
- [14] ETİ Maden. Boron in Turkey. <https://www.etimaden.gov.tr/en/boron-in-turkey>. Erişim tarihi: 11/04/2021.
- [15] Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Resmî Gazete tarih ve sayı: 31.12.2004-25687.
- [16] İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik, Resmî Gazete tarih ve sayı: 17.02.2005-25730.
- [17] WHO, Guidelines for drinking-water quality World Health Organization, fourth, editör WHO, Geneva, 2017.
- [18] Akinci G., Guven DE., Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp., *Desalination*, 268(1), 221-226, 2011.
- [19] Akkoyun MB., Özdemir S., Kılınc E., Birhanli E., Aygün A., Sen F., Resistance, removal, and bioaccumulation of Ni (II) and Co (II) and their impacts on antioxidant enzymes of *Anoxybacillus mongoliensis*, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 235, 108790, 2020.
- [20] Geva P., Kahta R., Nakonechny F., Aronov S., Nisnevitch M., Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19613-19625, 2016.

- [21] Wang J., Chen C., Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnology Advances*, 27(2), 195-226, 2009.
- [22] Vural A., Demir S., Boyno G., Biyoremediasyon ve fungusların biyoremediasyonda kullanılması, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilim Dergisi*, 28, 490-501, 2018.
- [23] Verma S., Kuila A., Bioremediation of heavy metals by microbial process, *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369, 2019.
- [24] Sharma B., Shukla P., Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters, *Journal of Hazardous Materials*, 401 (June 2020), 2021.
- [25] Das S., Dash HR., Chakraborty J., Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2967-2984, 2016.
- [26] Vandamme P., Coenye T., Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (Pt6), 2285-2289, 2004.
- [27] Chen W-M., Chang J-S., Wu C-H., Chang S-C., Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*, *Microbiological Research*, 155(8), 672-680, 2004.
- [28] Pandey G., Jain RK., Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5789-5795, 2002.
- [29] Konstantinidis KT., Isaacs N., Fett J., Simpson S., Long DT., Marsh TL., Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment, *Microbial Ecology*, 5(2), 191-202, 2003.
- [30] Manasi Rajesh V., Santhana Krishna Kumar A., Rajesh N., Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent, *Chemical Engineering Journal*, 235, 176-185, 2014.
- [31] Aleem A., Isar J., Malik A., Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil, *Bioresource Technology*, 86(1), 7-13, 2003.
- [32] Yılmaz M T., Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(2), 1423-1429, 2012.
- [33] Darcan C., Kahyaoğlu M., The effect of some boron derivatives on kanamycin resistance and survival of *E. coli* and *P. aeruginosa* in lake water, *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(4), 476-482, 2012.
- [34] Masoumi F., Khadivinia E., Alidoust L., Mansourinejad Z., Shahryari S., Safaei M., et al. Nickel and lead biosorption by *Curtobacterium* sp. FM01, an indigenous bacterium isolated from farmland soils of northeast Iran, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 950-957, 2016.
- [35] Ren G., Jin Y., Zhang C., Gu H., Qu J., Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb(II). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 117, 141-148, 2015.
- [36] Roane TM., Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils, *Microbial Ecology*, 37(3), 218-224, 1999.
- [37] Puyen ZM., Villagrasa E., Maldonado J., Diestra E., Esteve I., Sole A., Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008, *Bioresource Technology*, 126, 233-237, 2012.
- [38] Maldonado J., Diestra E., Huang L., Domenech A M., Villagrasa E., Puyen Z M., et al., Isolation and identification of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain, *Annals of Microbiology*, 60(1), 113-120, 2010.
- [39] Lu W B., Shi J J., Wang C H., Chang J S., Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance, *Journal of Hazardous Materials*, 134, 80-86, 2006.
- [40] Raja C E., Anbazhagan K., Selvam G S., Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 577-585, 2006.
- [41] Nable RO., Banuelos GS., Paull JG., Boron toxicity, *Plant Soil*, 193(1), 181-198, 1997. metal resistant genes and their transporters, *Journal of Hazardous Materials*, 401 (June 2020), 123285, 2021.
- [42] Miwa, H., Fujiwara T., Isolation and identification of boron-accumulating bacteria from contaminated soils and active sludge, *Soil Science and Plant Nutrition*, 55, 643-646, 2009.
- [43] Raja C E., Omine K., Characterization of boron tolerant bacteria isolated from a fly ash dumping site for bacterial boron remediation, *Environmental Geochemistry and Health*, 35, 431-438, 2013.
- [44] Laçın B, Ertit Taştan B, Dönmez G. Detection of boron removal capacities of different microorganisms in wastewater and effective removal process, *Water Science and Technology*, 72(10), 1832-1839, 2015.
- [45] Li X., Li D., Yan Z., Ao Y., Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by plant growth-promoting rhizobacteria, *RSC Advances*, 8(54), 30902-30911, 2018.
- [46] Sagar S, Bajaj S, Gola D, Malik A, P J Khankhane R K, Singh. D K. A qualitative approach to nickel and lead uptake by heavy metal resistant bacteria *Klebsiella* sp.10KN, *International Journal of Applied Research*, 3(7), 878-885, 2017.
- [47] Su Y J., Lin J Q., Lin J Q., Hao D H., Bioaccumulation of Arsenic in recombinant *Escherichia coli* expressing human metallothionein, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(5), 565-570, 2009.