

Atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile kurşun ve nikel ağır metallerinin giderimi

Removal of the lead and nickel heavy metals with *Pseudomonas* spp. strains which isolated from waste water

Berrin KELOĞLU¹, Şahlan ÖZTÜRK², Süleyman YALÇIN³

ÖZET

Amaç: Son yıllarda endüstriyel ve teknolojik gelişmelerden kaynaklanan atıkların çevreye olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için atık su arıtımında kullanılan klasik yöntemlerin yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. *Pseudomonas* spp. suşları çevresel biyoteknoloji çalışmalarında çevre kirliliğine neden olan kirletici faktörleri yok etme kabiliyetleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bu çalışmada, atık sudan izole edilen 40 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanılarak insanlar ve diğer canlı organizmalar için toksik olan kurşun ve nikel metallerinin giderim mekanizması incelenmiştir. Bu çalışma ile endüstriyel ve evsel atık sularındaki ağır metallerin canlı mikroorganizmalar ile giderimi çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma için atık su arıtma tesisinin çeşitli havuzlarından izole edilen toplam 40 adet *Pseudomonas* spp. ile kurşun ve nikel metallerine olan direnç ve tolerans tespiti çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen LC50 değerleri ile hücre yüzeyine tutunma ve hücre içine alımın olma üzere biyobirikim deneyleri gerçekleştirilmiştir.

ABSTRACT

Objective: In recent years, biotechnological methods are preferred instead of classical methods used in wastewater treatment in order to eliminate or reduce the negative effects of wastes on the environment arising from industrial and technological developments. *Pseudomonas* spp. are preferred in environmental biotechnology studies because of their ability to remove pollutant factors that cause serious environmental pollution. In this study, the removal mechanism of lead and nickel metals which are toxic for humans and other living organisms were investigated with 40 *Pseudomonas* genus bacteria which isolated from waste water. With this study, it is aimed to contribute to the removal works of heavy metals in industrial and domestic wastewater by living microorganisms.

Methods: 40 *Pseudomonas* spp. which were isolated from the pools of wastewater treatment plant, have tolerance and resistance tests for lead and nickel. Bioaccumulation tests were performed using the determined LC50 values and the removal of metal ions by the *Pseudomonas* spp. was evaluated as cell uptake and cell surface involvement.

¹Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı, Nevşehir

²Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Nevşehir

³Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Berrin KELOĞLU

15 Temmuz Mahallesi Halk Sağlığı Laboratuvarı Nevşehir - Türkiye

E-posta / E-mail : berrinkeloglu@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 19.03.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 03.11.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.78095

Keloğlu B, Öztürk Ş, Yalçın S. Atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile kurşun ve nikel ağır metallerinin giderimi
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 289-300

Bulgular: İzolatlardan 22 tanesi *P. aeruginosa*, 11 tanesi *P. stutzeri*, yedi tanesi de *P. mendocina* olarak tanımlanmıştır. Suşların 50 ppm metal içeren besiyerlerinde 37°C'deki inkübasyonu sonrası, üreme yoğunlukları doğrultusunda her bir metal için en dirençli beş adet izolat belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp.'ler metal toleranslarının tespiti amacıyla 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm ve 400 ppm kurşun ve nikel içeren ayrı besiyerlerinde 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılarak % ölüm ve LC50 değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; en dirençli suşlar Pb (+2) için *P. aeruginosa* BK14, Ni (+2) için *P. stutzeri* BK23 olarak belirlenmiştir. LC50 değerlerinde metal içeren besiyerlerinde 37°C'de tekrar inkübasyona bırakılan BK23 ve BK14 suşlarında sırası ile 10. ve 30. dakikalarda ve 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Metallerin giderimi, hücre yüzeyine adsorbsiyon ve hücre içine alınım şeklinde gerçekleşmiştir. *P. aeruginosa* BK14 suşu ile 204,30 ppm Pb (+2)'nin %56'sı hücre yüzeyinde olmak üzere % 84 giderim; *P. stutzeri* BK23 suşu ile 186,21 ppm Ni (+2)'in %47'si hücre yüzeyinde olmak üzere toplamda %76 giderim gerçekleşmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre her iki metal için de giderim daha çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile olmuştur. Bu çalışma ile ilk defa kurşun ve nikel dirençli canlı *Pseudomonas* spp.'ler ile ağır metal giderim mekanizması hücre yüzeyine tutunma ve hücre içine alınım şeklinde mukayeseli olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, nikel, ağır metal, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*

Results: 22 isolates were identified as *P. aeruginosa*, 11 were *P. stutzeri* and seven were *P. mendocina*. After incubation of bacteria strains at 37°C for 24 hours in media containing 50 ppm metal, the most resistant five isolates were determined for each metal. For determination of metal tolerances, *Pseudomonas* spp. are incubated at 37°C for 24 hours on separate media containing 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm and 400 ppm lead and nickel and the % of death and LC50 values were calculated. According to results of this study, it was determined that isolates highest metal tolerance for Pb (+2) is *P. aeruginosa* BK14 and for Ni (+2) is *P. stutzeri* BK23. Bioaccumulative assays were performed at 10, 30 minutes and at the 1st, 2nd, 4th, 8th, 12th, 16th, 20th and 24th hours, respectively. Removal of the metals was carried out on the cell surface by adsorption and cell uptake. *P. aeruginosa* BK14 strain removed 84 % of 204,30 ppm Pb (+2) in total, as which 56 % of on the cell surface and *P. stutzeri* BK23 strain removed the 76 % of 186,21 ppm Ni (+2) in total, as which 47 % of on the cell surface.

Conclusion: According to the results obtained, the removal of both metals was mostly due to the attachment to the cell surface. In this study, the heavy metal removal mechanism with live *Pseudomonas* spp. which resistant to lead and nickel was evaluated as comparative to cell surface attachment and cell uptake for the first time.

Key Words: Lead, nickel, heavy metal, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*

GİRİŞ

Su bütün canlılar için hayati öneme sahiptir. Dünyadaki hızlı nüfus artışı, endüstriyel kuruluşların artması ve tarımsal faaliyetler sonucu temiz su kaynaklarında ciddi bir azalma yaşanmaktadır. Yapılan araştırmalar bugünkü koşulların değişmeden devam etmesi durumunda, dünyadaki temiz ve

kullanılabilir su kaynaklarının tükeneyeceğini; şu anda dahi dünya nüfusunun %40'ını barındıran 80 ülkenin temiz su sıkıntısı çektiğini göstermiştir (1). Özellikle ağır metal endüstrilerinin atıkları ile toprağın ve suyun kirlenmesi, havaya karışan zararlı maddelerin yağmurlarla suya ve toprağa karışması,

evsel atık suların doğaya karışması, denize dökülen petrol ve katı atıkların artması ve buna benzer birçok örnek, su kirliliğinin artık doğanın dengesini bozuyor olduğunun birer kanıtıdır. Gelecekteki su yoksunluğuna önlem olması ve doğanın dengesini korumak için, su arıtımının verimli şekilde yapılması gerekmektedir. Birçok canlı için toksik olan ağır metallerin atık sudan gideriminde farklı yöntemler kullanılmaktadır (2). Sudan metal gideriminde kullanılan çöktürme, buharlaştırma, iyon değişimi ve membran yardımı ile ayırma gibi yöntemlerin pahalı ve zahmetli olması bu alanda kullanılacak alternatif çözüm arayışına neden olmaktadır (3). Son yıllardaki endüstriyel ve teknolojik gelişmeler sonucu ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için, atık maddelerin gideriminde kullanılan klasik yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu uygulamalar ile atık maddelerin geri kazanımı, çevre dostu teknolojilerin temel hedefi haline gelmiştir. Bu şekilde; hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemler ile geri kazanılması ve tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek; hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır (4). Yaşayan veya yaşamayan mikroorganizmalar, seçici olarak, atık sulardaki inorganik iyonları biriktirme ve ayırmada yüksek bir potansiyele sahiptirler (5). Toprakta ve atık suda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler ise çevre kirliliği bakımından risk oluşturan kirletici faktörlerin giderimindeki kabiliyetleri sebebiyle çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmada da atık su arıtma tesisinden alınan su örneklerinin genel florasında yoğun olarak bulunduğu tespit edilen *Pseudomonas* spp. suşları ile insanlar ve diğer canlılar için toksik etkiye sahip olan kurşun ve nikel metallerinin giderimi ve biyobirikim mekanizmaları incelenmiş; ağır metaller ile kirlenen suların canlı mikroorganizmalar ile arıtımı çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların Tespiti ve Tanımlanması:

Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yüksek lisans tezi olarak 2016 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Nevşehir Atık Su Arıtma Tesisinde bulunan arıtma işlemlerinin her bir basamağına ait havuzlardan su numuneleri alınmıştır. Numuneler her bir petri kutusuna 1 mL olacak şekilde dökme plak yöntemiyle *Pseudomonas* Agar (Merck KGaA) besiyerine ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında olası *Pseudomonas* spp. kolonilerinin Nutrient Agar (Merck KGaA) besiyerine tek koloni yöntemiyle ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında Gram negatif ve saf olduğu tespit edilen suşlar VITEK 2 Compact 30 (Biomérieux) cihazında biyokimyasal olarak tanımlanmıştır.

İzolatların Metal Toleranslarının Tespiti:

Çalışma kurşun ve nikel metalleri için ayrı olarak aynı yöntemlerle yürütülmüştür. Mc Farland cihazı (DensiCHEK™ PLUS, Biomérieux) ile biyokütle yoğunlukları 1 (bir) değerine eşitlenen sıvı besiyerindeki (Nutrient broth, Merck KGaA) izolatların herbiri 50 ppm nikel (Merck Nickel-II-chloride hexahydrate) ve 50 ppm kurşun (Sigma-Aldrich Lead-II-chloride) derişimine 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Kurşun ve nikel maruz kalan izolatların biyokütle yoğunlukları inkübasyon sonrası 630 nm'de mikroplate okuyucuda (Ivyman 2100-c) tespit edilmiştir. Belirlenen değerler ve herbir izolatın metalsiz olarak aynı hacimlerdeki inkübasyonu sonrasındaki kontrol ekimlerinin biyokütle yoğunluk değerleri kullanılarak % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Her bir metal için en dirençli beş izolat ile çalışmaya devam edilmiştir.

Seçilen İzolatların Belirlenen Metal Derişimindeki Direnç Tespiti ve LC50 Değerlerinin Hesaplanması:

En düşük ölüm değerine sahip olan beşer izolat seçilerek 50-100-200-400 ppm nikel ve kurşun içeren

besiyeri ortamlarında 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerinde herbir izolata ait besiyerinden numuneler alınarak 630 nm'de mikropate okuyucu ile örneklerin biyokütle yoğunlukları ölçülmüştür. Bu değerler ve metalsiz besiyeri ortamında çoğalan mikroorganizma yoğunluk değerleri kullanılarak, % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Canlı hücrelerin % 50'sini öldüren metal dozları (LC50), % 95 güven sınırlarında probit analizleri ile tespit edilmiştir (6, 7).

En yüksek LC50 değerine sahip izolat ile çalışmaya devam edilmiş; biyobirikim deneylerinde bu değer esas alınarak besiyeri ortamları hazırlanmıştır (8).

Biyobirikim Deneyleri:

Kurşun metalinde biyobirikim çalışmaları *P. aeruginosa* BK14 izolatı ile nikel metalinde biyobirikim çalışmaları *P. stutzeri* BK23 izolatı ile yapılmıştır. *P. aeruginosa* BK14 izolatı 204,3 ppm kurşun içeren besiyeri ortamında, *P. stutzeri* BK23 izolatı 186,2 ppm nikel içeren besiyeri ortamında 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda canlı organizmalar ile metal gideriminin ilk dakikalarda yoğun olduğu belirtildiğinden inkübasyonun 10. dakikasında, 30. dakikasında ve sırası ile 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerinde besiyeri ortamından numuneler alınarak metal birikiminin yeri ve miktarı belirlenmiştir (9, 10). Biyobirikim deneyleri Matsunaga ve arkadaşları ile Öztürk Ş.'nin çalışmaları model alınarak gerçekleştirilmiştir (8, 11).

Besiyerinde Kalan Metal Miktarı:

Besiyeri ortamında kalan metal miktarının tespiti için belirtilen saat dilimlerinde, kurşun ve nikel için hazırlanan kültür ortamlarından örnekler alınmış; 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj (Nüve NF 048) edilerek üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS (Perkin Elmer Nexion 300D) cihazında metal tayini yapılmıştır.

Hücre Yüzeyinde Emilim-Tutunma:

Hücre dışı birikimi belirlemek için; santrifüj işlemi sonrasında çökelen hücrelerin üzerine 1 mL 10 mM EDTA (Merck) çözeltisi eklenerek 2500 devirde 3 dakika vortekslenmiş (IKA MS1); hücre yüzeyine tutunan metallerin desorbsiyonu sağlanmıştır. Numuneler 10 000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS cihazında metal tayini yapılmıştır.

Hücre İçinde Birikim

Hücre içine alınan metal birikiminin belirlenmesi için bir önceki aşamada santrifüj sonrasında dibe çöken hücrelerin üzerine 1 mL 1M HNO₃(Merck) ilave edilerek 2.500 devirde 3 dakika vortekslenmiş; 10.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvıdan filtre ve dilüsyon işlemi sonrası ICP-MS cihazında metal tayini yapılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Çalışmalar sonunda elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, uygun tanımlayıcı istatistiklerle (sayı, yüzde olarak) sunulmuştur. Tüm deneyler iki paralel olarak çalışılmış ve ortalama sonuçlar verilmiştir.

BULGULAR

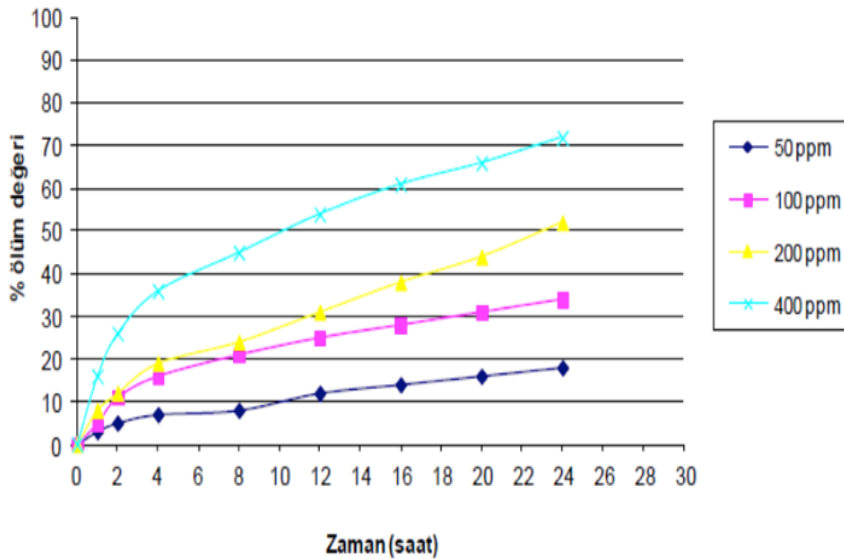
Bu çalışma için atık su arıtma tesisinden alınan numunelerden 40 adet *Pseudomonas* spp. izolatı tanımlanmıştır. Tanımlanan 40 izolatın 22 tanesinin *P. aeruginosa*, 11 tanesinin *P. stutzeri*, 7 tanesinin de *P. mendocina* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların metale olan dirençlerini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda kurşun için *P. aeruginosa* BK1, *P. aeruginosa* BK3, *P. aeruginosa* BK4, *P. aeruginosa* BK14, *P. stutzeri* BK37; nikel için *P. stutzeri* BK8, *P. aeruginosa* BK21, *P. stutzeri* BK23, *P. stutzeri* BK32, *P. aeruginosa* BK40 metal toleransı açısından en dirençli izolatlar olmuştur.

Bu izolatlar ile yapılan eşit biyokütle yoğunluğunda ayrı besiyerlerinde 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm metal derişimlerindeki inkübasyon sırasında 1., 2., 4., 8., 12., 16., 20. ve 24. saatlerde numuneler alınarak biyokütle yoğunlukları belirlenmiş; % ölüm değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler kullanılarak elde edilen LC50 değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

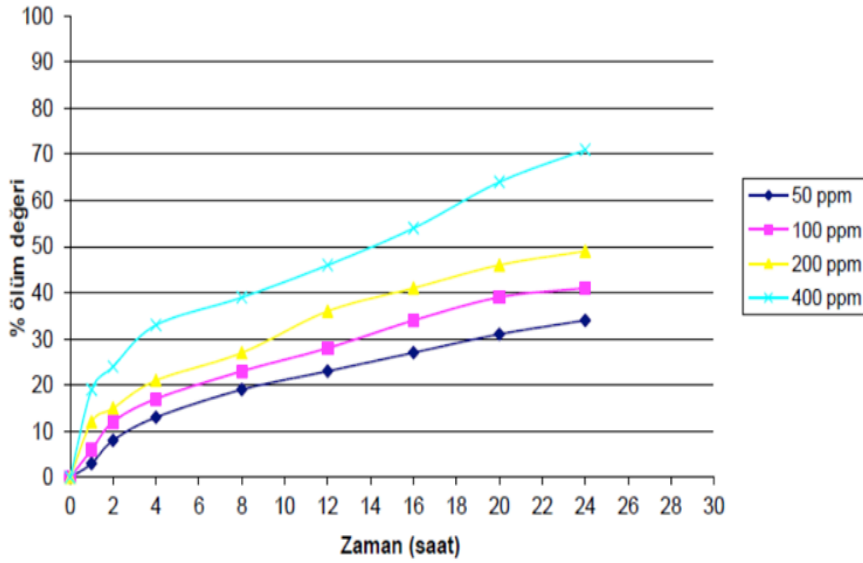
Bu sonuçlara göre 24 saat içinde mevcut bakterilerin yarısını öldüren en yüksek kurşun konsantrasyon değerine sahip olan izolat *P. aeruginosa* BK14, nikelde ise *P. stutzeri* BK23 olmuştur. Biyobirikim deneyleri bu iki izolat ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda nikel ve kurşun metaline maruz bırakılan bu izolatların % ölüm değerlerinin zamana göre değişimleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2’de sunulmuştur.

Tablo 1. Kullanılan metallere göre izolatlara ait LC50 değerleri

Kullanılan Metaller	İzolat	LC50 değeri (ppm)
Kurşun	<i>P. aeruginosa</i> BK1	154,06±6,93
	<i>P. aeruginosa</i> BK3	147,95±6,11
	<i>P. aeruginosa</i> BK4	181,55±7,93
	<i>P. aeruginosa</i> BK14	204,30±9,20
	<i>P. stutzeri</i> BK37	174,59±7,74
Nikel	<i>P. stutzeri</i> BK8	133,64±4,18
	<i>P. aeruginosa</i> BK21	158,9±6,12
	<i>P. stutzeri</i> BK23	186,21±8,43
	<i>P. stutzeri</i> BK32	137,96±5,06
	<i>P. aeruginosa</i> BK40	129,13±3,81



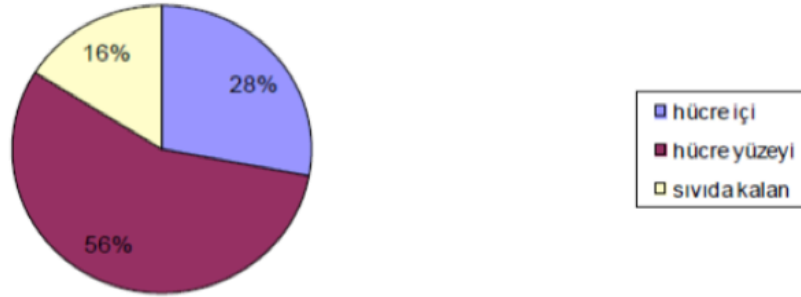
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda nikel maruz bırakılan *P. stutzeri* BK23 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi



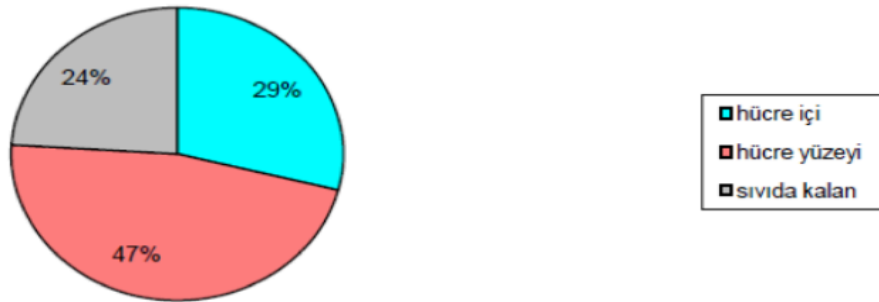
Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda kurşuna maruz bırakılan *P. aeruginosa* BK14 izolatının % ölüm değerlerinin zamana göre değişimi

Biyobirikim deneylerinde LC50 değeri esas alınarak metal içeren besiyerleri hazırlanmıştır. 24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen kurşun miktarının % 16'sı [32,68 ppm Pb (+2)] besiyerinde kalmış, % 84'ü [171,61 ppm Pb (+2)] mikroorganizma tarafından giderilmiştir. Besiyerinde bulunan metal miktarı ilk on dakika içinde hızla azalmıştır. Besiyerine ilave edilen kurşun giderimi iki şekilde gerçekleşmiştir. İlk mekanizma olan hücre yüzeyine adsorbsiyon sırasında hücre yüzeyindeki metal miktarının % 56'sı [114,40 ppm Pb (+2)] hücre yüzeyine adsorbe olmuştur. İlk 20 saat boyunca hücre yüzeyine tutunan metal miktarında artma olmuş; sonrasında ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Yüzeye tutunan metal miktarının yarısından fazlası ilk 10 dakika içinde adsorbe olmuştur. İkinci mekanizma olan hücre içine alınım ise absorblanan kurşun miktarında ilk 20 saat boyunca artış gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre toplam metal miktarının % 28'i hücre içine alınmıştır. Hücre içine alınımın yaklaşık yarısı ilk yarım saat içinde gerçekleşmiştir. Kurşun biyobirikiminde bölgesel oranlar Şekil 3'de verilmiştir.

Nikel biyobirikimi çalışması için seçilen BK23 *P. stutzeri* izolatı, 186,21 ppm Ni (+2) konsantrasyonu içeren besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Çalışmada besiyerine eklenen toplam nikel miktarının % 24'ü [44,69 ppm Ni (+2)] besiyerinde kalmıştır. Besiyerinde kalan metal miktarında ilk 16 saatte azalma gerçekleşmiş sonrasında ise sabit kaldığı izlenmiştir. İlk on dakika içinde azalma hızlı bir şekilde olurken sonrasında daha yavaş seyretmiştir. 24 saatin sonunda besiyerine ilave edilen nikelin % 47'si [87,51 ppm Ni (+2)] bakteriler tarafından hücre yüzeyine tutunma yoluyla giderilmiştir. Adsorbsiyon ilk 16 saat boyunca artmış; sonra sabit kalmıştır. İnkübasyonun ilk on dakikasında tutunma oldukça hızlıdır. Hücre içine nikel alınımı ise inkübasyonun ilk yarım saatinde daha hızlı gerçekleşmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından toplam metal miktarının % 29'u [54 ppm Ni (+2)] hücre içine alınmıştır. İlk 16 saat alınım devam etmiş; sonra durmuştur. Nikel biyobirikiminin bölgesel oranları Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Kurşun biyobirikiminin bölgesel oranları



Şekil 4. Nikel biyobirikiminin bölgesel oranları

TARTIŞMA

Su hayatın her alanında temel ihtiyaçtır ve temiz su vazgeçilmez bir kaynaktır. Tüm dünyada olduğu gibi hızla gelişmekte olan ülkemizde de su arıtımına olan gereksinim her geçen gün artmaktadır. Yüzyılın en önemli konusu olan su yönetimi sürecinde değerlendirilebilen atık sular arıtılmalı ve ilgili yönetmelikler doğrultusunda izin verilen kirlilik düzeyine eriştikten sonra çevreye deşarj edilmelidir.

Bu çalışmada, canlılar için toksik etkiye sahip kurşun ve nikel metalleri ile atık suda giderim ve biyobirikim deneyleri yapılmıştır. Atık sudan ağır

metal gideriminin biyobirikim ile gerçekleşmesinde mikroorganizmalar tercih edilmekte; hızlı üremeleri, biyokütle yoğunluğunun fazla olması ve olumsuz koşullara olan dirençleri sebebi ile de özellikle bakteriler kullanılmaktadır. *Pseudomonas* cinsi bakteriler ise kirliliğe ortamlarda canlılığını devam ettirebilme kabiliyeti ve ürettikleri ikincil metabolitler ile tercih edilmektedir (12, 13). Ceylan Ö. ve arkadaşlarının (14) *Pseudomonas* ve *Pseudomonas* ilişkili cinsler ile 8 ağır metal kullanarak yaptıkları dirençlilik çalışmasında da ifade edildiği üzere bu cins bakterilerin sahip oldukları plazmidler ve hücre duvar yapıları gibi

özellikleri değerlendirildiğinde ağır metal giderimi için uygun özellikte olduğu açıktır.

Metale maruz kalan mikroorganizmaların metale maruz kalmayanlara oranla daha uzun süre canlılığını korudukları yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (15). Srinath ve ark. (16), Cr (VI) ile kirlenmiş sulardan bakteri izole etmişler ve laboratuvar ortamında bu bakterilerin Cr (VI) giderimini incelemişlerdir. Kirli sulardan izole ederek tanımladıkları izolatların diğerlerine nazaran kroma daha çok direnç gösterdikleri ve bu dirençli izolatların krom biyobirikimlerinin de yüksek olduğu rapor edilmiştir. Sun ve Shao (15), Pasifik okyanusunun sedimentlerinden izole ettikleri Pb (+2)'ye yüksek oranda dirençli olan *Penicillium* spp. Psf-2 izolatının laboratuvar ortamında da Pb (+2)'ye yüksek oranda hücre yüzeyine ve hücre içerisine aldığını rapor ederek, ağır metal gideriminde metale toleranslı mikroorganizmaların kullanımının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu veriler değerlendirilerek atık su arıtma tesisine ulaşan kirli sulardan alınan örnekler ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Su numunelerinin ön incelemesinde çalışmada kullanılan metallerin ve *Pseudomonas* spp. suşlarının baskın olarak varlığının tespit edilmesiyle birlikte, öncesinde metale maruz kalmış mikroorganizmalar olmaları sebebi ile de çalışmada tespit edilen metal dirençliliği yüksek olmuştur. *P. aeruginosa* BK14 izolatında kurşun için LC50 değeri 204,30 ppm, *P. stutzeri* BK23 izolatında nikel için LC50 değeri 186,21 ppm olarak tespit edilmiştir. Yılmaz (17), *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmada , nikel için LC50 değerini 17,41 ppm, kurşun için ise 126,90 ppm olarak tespit etmiştir. *Gleocapsa* spp. ile yapılan çalışmada ise kurşun için LC50 değerini 1,16 ppm olarak, *Aulosira fertilissima* ile yapılan çalışmada ise nikel için LC50 değerini 0,1 ppm olarak bulmuşlardır (18, 19). Yapılan çalışmalardaki organizmalar ile kıyaslandığında bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* cinsinin metale dirençliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Yılmaz (17) ve Öztürk (8)'ün *Synechocystis* sp. ile yaptığı çalışmalarda Ni (+2)'in % 51 oranında hücre yüzeyine, Pb (+2)'nin % 68 oranında hücre yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmalarda kullanılan organizmalar farklı olsa da kurşunun hücre yüzeyine adsorbsiyonunun nikel oranla daha fazla olması, organizmaların hücre duvarında ortak bulunan fonksiyonel protein gruplarının Pb (+2) iyonuna bağlanma yeteneği ile ilişkilendirilebilir. Çünkü metabolizmadan bağımsız olarak ağır metal katyonları ile hücre duvarı arasındaki etkileşimle bakır, nikel, krom, kurşun, çinko ve kobalt gibi birçok metalin toplandığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (20).

Metallerin hücre zarından taşınarak hücre içinde birikmesi, mikroorganizmanın metabolizmasına bağlı bir biyosorpsiyon yoludur (20). Bueno ve ark. (20), *Rhodococcus opacus*'u kurşun, krom ve kobalt metallerine maruz bırakarak, metallerin hücre üzerine etkisini elektron mikroskopu ile incelemişler ve hücrede bulunan elementlerin analizlerini yapmışlardır. Element analizlerinin sonuçlarına göre kontrol hücrelerinde tespit edilen K (potasyum) elementine metale maruz kalan hücrelerde rastlanılmamıştır. Hücre yüzeyinde bulunan K'nın metallerle yer değiştirmiş olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, kullanılan metallerin hücre içine alınımı, hücre yüzeyine tutunumu ve besiyerinde kalan miktarları karşılaştırılmıştır. Buna göre kurşun metalinin hücre yüzeyine tutunumu da , hücre içine alınımı da nikel oranla daha fazla olmuştur. Acar (21)'in *Desmodesmus armatus* ile yaptığı çalışmada da sucul ortamda kurşun gideriminin nikel göre daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Bu veriler doğrultusunda *Pseudomonas* spp.'nin hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin kurşun metaline afinitesinin nikel oranla daha yüksek olduğu ya da Pb (+2) iyonlarının daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi hücrede bulunan

elementlerle yer değiştirdiği söylenilebilir. Bununla birlikte hücre içine alınımın hücre yüzeyine tutunma ile paralellik gösterdiği sonucuna da varılmıştır.

Biyosorpsiyonda önemli çevresel etkenlerden biri ortamın pH değeridir. Ağır metallerin uzaklaştırılmasında ve metal-canlı etkileşmesinde optimum pH değerinin tespit edilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (21). Çalışmada kullanılan besiyeri ortamının pH değeri kurşun içeren çözeltide 6,5, nikel içeren çözeltide 6 olarak tespit edilmiştir. Acar (21), yaptığı çalışmada kurşun içeren kültürlerde pH değerinin 6-7 arasında olduğu günlerde *Desmodesmus armatus*'un kurşunu tutma kapasitesinin %25 oranında arttığını saptamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, uygun pH değerinin sağlanmış olmasının yüksek metal tutunumunu olumlu etkilediği düşünülmektedir.

Metal alınımında dikkat edilmesi gereken önemli bir faktör de zamandır. Yapılan çalışmalar başlangıçta metal alınımının hızlı olduğunu; sonrasında biyosorbent yüzeyindeki doygunluk nedeniyle yavaşladığını göstermiştir (9, 10). Doygunluk, biyokütle artışı ile metal bağlanma bölgelerinin birbirinin üzerine gelmesi veya agregasyon oluşturmamasından kaynaklanmaktadır (22). Ancak, bu durum metalin ve mikroorganizmanın çeşidine ve mikroorganizma yüzeyinde bulunan metal bağlanma bölgelerinin çeşidine ve sayısına göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, kurşun metalinin hücre yüzeyine adsorplanan miktarının (% 56'sının) yarıdan fazlası (% 34'ü) ilk 10 dakika içinde hücre yüzeyine tutunmuştur. Nikel metalinin de ilk 10 dakika içinde % 27'si hücre yüzeyine tutunmuştur. Yapılan bir çalışmada, hızlı metal alınımının biyokütlenin atık suların arıtımında kullanılabilmesi için en önemli kriter olduğu bildirilmiştir (23). Bu çalışmada yer alan *Pseudomonas* spp.'nin hızlı metal adsorpsiyonu ve absorpsiyonu avantajları ile arıtım çalışmalarında kullanım için uygun olduğu söylenebilir.

Hücre yüzeyine tutunmada hücre duvarında bulunan fonksiyonel grupların ve ekzopolisakkaritlerin (EPS) önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Toksik maddelere ve kurumalara karşı bakterileri koruyan EPS üretimi topraktan izole edilen *Pseudomonas* spp.'lerde çalışılmış ve EPS üreten bu mikroorganizmaların toksik bileşiklere yüksek toleransı ve direncinin seçici avantajlar sağladığına dikkat çekilmiştir (24, 25). Yalçın (26) , atık sudan izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarına 5 ppm ve 15 ppm aralığında uygulanan Cr(VI) konsantrasyonlarındaki artış ile EPS üretiminin de arttığını bildirmiştir. Raungsomboon ve ark. (18), *Gleocapsa gelatinosa*'nın EPS'sini saflaştırarak Pb (+2) giderimini araştırmışlar ve EPS'nin monomer yapısını aydınlatmışlardır. Buna göre ksiloz, riboz, ramnoz, galaktoz, glikoz, mannoz ve fruktoz şekerlerinden oluşan EPS yapının yüksek oranda Pb (+2)'u adsorbladığını bildirmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarında yüksek metal tutunumu ile birlikte EPS üretiminin de arttığı ve bu durumun *P. aeruginosa* BK14 ve *P. stutzeri* BK23 izolatlarının seçilimdeki avantajlarından biri olduğu sonucuna varılabilir.

Metalin hücre içerisine alınımında ise düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve aktif transport mekanizmasının da rol oynadığı rapor edilmiştir (22, 26). Diğer bir hücre içi alınım şeklinin de metalotiyonein gibi şelatlayıcı proteinlere tutunarak endositoz yolu ile alınım olduğu gösterilmiştir (24, 25). Biyobirikim mekanizmalarının kullanılan mikroorganizma ve metal çeşidine göre değiştiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (23). Bu çalışmada, *Pseudomonas* cinsi bakterilerin metal iyonlarının hücre içine alınımını gerçekleştirmiş olması, hücre duvarında bulunan ve endositozdan sorumlu proteinlerin Pb (+2) ve Ni (+2)'e olan bağlanma kabiliyetlerini göstermektedir.

Sonuç olarak, suyun kullanıldıktan sonra geri dönüşümünün her geçen gün önem kazanmasıyla

birlikte, evsel ve endüstriyel atık suların mikroorganizmalar yardımıyla arıtım prosesinde *Pseudomonas spp.*'lerin değerlendirilmesi için uygun potansiyele sahip oldukları; tutulan metallerin geri eldesinin mümkün olmasının endüstriyel açıdan fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, ağır metal iyonlarının çeşitli mikroorganizmalarca biyobirikimi değişik türlerden bakteriler, algler, mantarlar ve mayalar kullanılarak yapılmıştır (16, 27). Daha öncesinde metale maruz kalmış ve bizzat atık suyun kendi florasından elde edilen, bu sebeple etkin verim sağlayacağı düşünülen *Pseudomonas spp.* ile yapılmış, nikel ve kurşun giderimi ve biyobirikim mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmanın öncü ve önemli çalışmalar arasında yer aldığı söylenebilir. Metallerin izolatlardaki birikim bölgelerinin tespiti

ve birikim miktarları, metallerin geri dönüşümü prosesi için de önemli bir gösterge niteliğindedir. Bu çalışma ile, ulusal ve uluslararası platformlarda yürütülen su yönetimi politikalarının atık su arıtımı ile ilgili olan çalışmalarına katkı sağlandığı düşünülmektedir.

Yapılan deneysel ve istatistiksel çalışmalar sonucunda, ağır metallerin mikroorganizmalarca gideriminin mümkün olduğu ve en çok hücre yüzeyine tutunma yolu ile giderimin gerçekleştiği, öncesinde metale maruz kalan organizmaların bu konuda etkin oldukları tespit edilerek, *P. aeruginosa* BK14 ile *P. stutzeri* BK23 izolatlarının hızlı metal tutunumu özellikleri nedeniyle de atık sudan ağır metal gideriminde etkin bir şekilde değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya olan katkı ve destekleri için Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Atık Su Arıtma Tesisi ve Nevşehir Halk Sağlığı Laboratuvarı yetkililerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özdemir K. Meyvesuyu Fabrikası Atıksularının Elektrokimyasal Olarak Arıtılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
2. Özer A, Özer D. Nikel (II) iyonlarının iki kademeli kesikli kapta *Cladophora crispata* ile giderilmesi. Turk J Eng Environ Sci, 1998, 22: 305-13.
3. Wilde EW, Beneman JR. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. Biotechnol Adv, 1993, 11: 781-812.
4. Tefloncu A. Biyoteknoloji. Bornova/İzmir:Ege Üniversitesi Yayınları: 1995.
5. İleri R. Çevre Biyoteknolojisi. Adapazarı: Değişim Yayınları, 2000.
6. OECD (Organization for the Economic Cooperation and Development), OECD Guideline for testing of chemical: Alga, growth inhibition test, 1984.
7. APHA, AWWA, WPCF, Standart Methods for the examination of water and wastewater, Washington, 1971.
8. Öztürk Ş. Çeşitli tatlı sulardan izole edilen bazı *Synechocystis* sp. izolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerinin etkisi ve giderimi: metal gideriminin protein ve tiyoller açısından değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
9. Fusconi R, Godinho MJL. Screening Exopolysaccharide-Producing Bacteria From Sub-Tropical Polluted Groundwater. Braz. J. Biol., 2002, 62: 363-9.
10. Robertson EB and Firestone MK. Relationship Between Desiccation and Exopolysaccharide Production in soil *Pseudomonas* spp. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 1284-1291.
11. Matsunaga T, Takeyama H, Nakao T, Yamazawa A, Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater, J. Biotechnol., 1999, 70:33-8.
12. King EO, Ward MK, and Raney DE. Two Simple Media for The Demonstration of Pyocyanin and Fluoresci. J. Lab. Clin. Med., 1954, 44: 301-7.
13. Asthana S, Rusin P and Gerba CP. Influence of hydrocarbons on the virulence and antibiotic sensitivity associated with *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Environ Health Research, 1997, 7: 277-87.
14. Ceylan Ö, Uğur A, Bio-Monitoring of Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* Related Genus, J Biol Environ Sci, 2012, 6(18), 233-42.
15. Sun F, Shao Z. Biosorption and bioaccumulation of lead by *Penicillium* sp. Psf-2 isolated from the deep sea sediment of the Pacific Ocean. Extremophiles, 2007, 11: 853-8.
16. Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere, 2002, 48 (4): 427-435.
17. Yılmaz EŞ. Siyanobakterilerle ağır metallerin giderimi ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
18. Raungsomboon S, Chidthaisong A, Bunnag B, Inthorn D, Harvey NW. Production, composition and Pb (+2) adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. Water Res., 2006, 40:3759-66.
19. Banerjee M, Mishra S, Chatterjee J. Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes. Electron J Biotechnol, 2004, 7:3- 15.

20. Bueno BYM, Torem ML, Molina F, de Mesquita LMS. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Miner Eng*, 2008, 21: 65-75.
21. Acar Ç. Kurşun (Pb+2) ve Nikel (Ni+2) İyonlarının *Desmodesmus armatus* ile Biyosorpsiyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
22. Bajguz A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38: 797-801.
23. Kumar YP, King P, Prasad VSR. Adsorption of zinc from aqueoussolution using marine green algae-*Ulva fasciata* sp., *Chem Eng J*, 2007,129: 161-6.
24. Van Ho A, Ward DM, Kaplan J, Transition metal transport in yeast, *Ann Rev Microbiol*, 2002, 56: 237-61.
25. Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia, *Toxicol Appl Pharmacol*,2003, 186: 163-88.
26. Yalçın S, Öztürk Ş, Keloğlu B. Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas Spp.*' lerin Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2018, 7 : 223-39.
27. Kumar KS, Dahms HU, Won EJ, Lee JS, Shin KH. Mikroalgae - A Promising Tool for Heavy Metal Remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113, 329-52.