

Saccharomyces cerevisiae Hücreleri ile Ağır Metal Giderimi ve Metal Toleransı¹

Ahmet Çabuk², Tamer Akar³, Zeynep Kotluk⁴, Samet Şaşmaz⁵

Özet

Bu çalışmada, endüstriyel olarak alkol üretiminde aktif olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) iyonu giderim yetenekleri ve besiyerindeki Cu(II) dirençlilikleri araştırılmıştır. pH, başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu, ve süre gibi biyosorpsiyon parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. En yüksek Cu(II) biyosorpsiyon kapasitesine (58.8 mg/g) pH 5.0 değerinde, 5 dakika gibi kısa bir sürede ve 200 mg/l başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyon değerinde ulaşılmıştır. Ayrıca hem katı hem de sıvı besiyerinde *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) iyonlarına karşı toleransı incelenerek biyosorpsiyon özelliği ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyosorpsiyon, metal dirençliliği, Saccharomyces cerevisiae

Giriş

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ağır metaller ve türevlerinin çevrede yaygın olarak bulunması endüstriyel faaliyetlerin doğal bir sonucudur. Ancak ağır metallerin canlı tarafından fark edilmeden dokularda biriktirilebilmesi ve metabolizmada bu ağır metallerin neden olabileceği toksik etkiler tartışılmaz bir gerçektir. Bu durum çevre ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir.

Ağır metallerin gerek endüstriyel atık sularından ve gerekse ağır metal ile kirlenmiş/kirletilmiş çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılmasında çeşitli kimyasal ve fiziksel süreçler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin ekonomik olmayışları ve elde edilen arıtım düzeyinin yeterli olmaması nedeniyle bu alanda önemli bir potansiyele sahip mikroorganizmaların etkin bir şekilde kullanıldığı ve tercih edildiği görülmektedir (1-4). Bu amaçla çeşitli bakterilerin, fungusların ve alglerin kullanıldığı bilinmektedir (5-12). Bu mikroorganizmaların sahip oldukları biyomoleküller gerek canlı ve gerekse ölü biyokütlelerin yüksek bir metal ilgisine sahip olmasını sağlamakta ve dolayısıyla çok yüksek bir biyosorpsiyon kapasitesi sunmaktadırlar.

¹ Bu çalışma, XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, (31-08/02-09/ 2005, Eskişehir) Çevre Biyoteknolojisi dalında poster olarak sergilenmiş ve üçüncülük ödülüne layık görülmüştür.

² Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: acabuk@ogu.edu.tr

³ Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Eskişehir.

⁴ Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.

⁵ Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Ağır metal gideriminde kullanılacak olan mikroorganizmanın iyi bir biyosorbent olmasının yanı sıra ekonomik olarak üretilebilmesi de önemlidir. Pek çok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan mayalar ekonomik olarak üretilebilmeleri, kolay elde edilebilir olmaları, çevresel değişimlere karşı hassas olmamaları gibi nedenlerle ağır metal giderim amacıyla kullanılabilir önemli bir kaynaktır (13-14). Biyokütlelerin sahip oldukları biyosorpsiyon yetenekleri ile metal iyonlarına karşı gösterdikleri direnç arasında bir korelasyon olup olmadığı yönünde literatürde farklı yaklaşımlar vardır (15-19).

Bu çalışmada, endüstride aktif olarak alkol üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) iyonu giderim yetenekleri araştırılmıştır. pH, başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu, ve süre gibi biyosorpsiyon parametreleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca hem katı kem de sıvı besiyerinde *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) iyonlarına karşı toleransı incelenerek biyosorpsiyon özelliği ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Biyokütle Üretimi

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma Eskişehir Şeker Fabrikası Alkol Ünitesinde aktif olarak alkol üretiminde kullanılmaktadır ve ilgili kuruluştan temin edilmiştir. Çalışma süresince *Saccharomyces cerevisiae* kültürleri malt extract agar (Merck) (MEA) ortamında +4°C'de saklandı. Stok kültürden, aşu üretimi için 10 ml malt extract broht (Merck) (MEB) içeren tüplere ekim yapılarak 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen aşılama kültürleri ile 100 ml MEB içeren erlenlere aşılama yapıldı ve çalkalamalı etüvde 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek biyokütle elde edildi. Yaş biyokütler 80°C'de 24 saat etüvde bekletilerek kurutuldu. Elde edilen biyokütle, öğütülerek 200 µm aralıklı eleklerden geçirildi ve çalışma yapılana kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

Metal Çözeltilerinin Hazırlanması

Cu₂SO₄.5H₂O (Merck) kullanılarak 1g Cu(II) için gerekli olan miktar orantıyla hesaplanarak tartıldı ve 1 l'ye distile suyla tamamlanarak 1g/l'lik stok Cu(II) çözeltisi hazırlandı. Denemeler sırasında bu stok çözeltiden distile su ile seyreltme yapılarak gerekli konsantrasyonlarda ki çözeltiler hazırlandı. Gerekli pH değerini ayarlamak için 1 N H₂SO₄ ve 1 N NaOH kullanıldı. Hazırlanan Cu(II) çözeltilerinin atomik absorpsiyon cihazında ölçümleri yapılarak konsantrasyonları kontrol edildi.

Metal Analizleri

Çalışmada yapılan bütün metal analizleri atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (Hitachi 180-70 Japan) hava-asetilen alevinde gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon Çalışmaları

Saccharomyces cerevisiae hücreleri ile en uygun Cu(II) iyonu giderim koşullarının belirlenmesi amacıyla, pH, başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu, biyokütle miktarı ve süre gibi biyosorpsiyon parametreleri incelenmiştir. pH çalışması için 1.0-6.0 aralığında, başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu için 25-250 mg/l aralığında ve 0-180 dakika süre ile değişen aralıklarda örnekler alınarak Cu(II) ölçümleri yapılmıştır. Bütün çalışmalar 250 ml'lik erlenlerde 50 ml çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir.

Biyosorpsiyon kapasite değerini belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$Q = [(C_o - C_i) \cdot V] / M_b$$

burada; Q, gram biyokütle başına biyosorbe edilen mg metal miktarı (g/mg); C_o, başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu (mg/l); C_i, biyosorpsiyon çalışmasından sonra çözültide kalan Cu(II) iyon konsantrasyonu (mg/l); V, çalışma hacmi (l); M_b, ilave edilen biyokütle miktarını (g) ifade etmektedir.

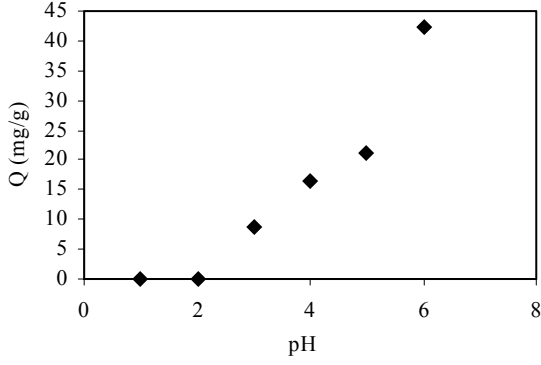
Sıvı ve Katı Besiyerinde Cu(II) Toleransının Belirlenmesi

Saccharomyces cerevisiae hücrelerinin sıvı besiyerinde Cu(II) toleransının belirlenmesi amacıyla MEB ortamına 25-5000 mg/l aralığında değişen farklı konsantrasyonlarda Cu(II) ilave edilerek çalışıldı. Katı besiyerinde Cu(II) toleransının belirlenmesi amacıyla MEA besiyerine *Saccharomyces cerevisiae* aşılmasını takiben yine 25-5000 mg/l aralığında değişen farklı konsantrasyonlarda Cu(II) emdirilmiş diskler yerleştirildi. Katı besiyerinde toleransın belirlenmesinde zon oluşup-oluşmaması ve oluşan zonların ölçümü, sıvı besiyerinde ise kuru ağırlık miktarı dikkate alınarak değerlendirilme yapıldı.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada endüstriyel olarak alkol üretiminde etkin olarak kullanılan ve bu nedenle ekonomik olarak üretimi yapılabilen *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri biyosorbent olarak kullanılarak sulu çözültülerden Cu(II) giderim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca katı ve sıvı besiyerinde Cu(II) toleransı çalışmaları da yapılarak biyosorpsiyon yeteneğinin tolerans ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır.

Metal-mikroorganizma etkileşimlerinde ortamın pH değeri, metalin formunu ve hücrede bulunan, metal ilgisine sahip olan fonksiyonel grupları önemli derecede etkilemesi nedeniyle biyosorpsiyon süreçlerinde önemli bir parametredir (2). Düşük pH değerine sahip çözültülerde ortamda bulunan yüksek orandaki protonlar ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara bağlanmak için yarışmakta ve bu da hücre-metal arasındaki etkileşim potansiyelini azaltmaktadır. Ancak çözültinin pH değeri arttıkça protonların azalması ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara daha fazla bağlanabileceklerdir. Bu durum pH 5.0 değerine kadar pH arttıkça biyosorpsiyon kapasitesinin de artmasını açıklamaktadır. Bu çalışmada optimum pH değeri 5.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

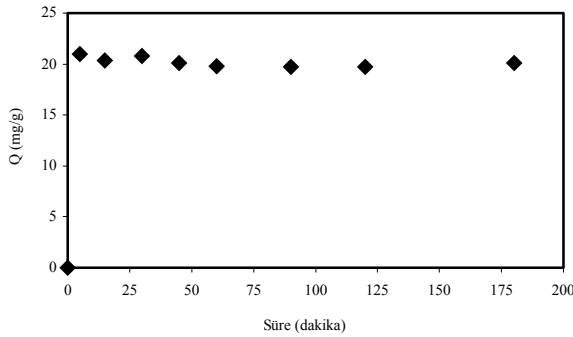


Şekil 1. *S. cerevisiae* hücreleri ile Cu(II) biyosorpsiyonu üzerine pH değerinin etkisi.

Saccharomyces cerevisiae hücrelerinin bulunmadığı sadece Cu(II) çözeltisi olan kontrol gruplarında yapılan ölçümler çalışma grubundaki ölçümlerin tamamen biyosorpsiyon verilerine ait olduğunu göstermektedir. Şekil 1 incelendiğinde 5.0 den daha yüksek pH değeri olan 6.0'dan itibaren biyosorpsiyon kapasitesinin daha yüksek olduğu düşünülebilir. Ancak pH 5.0 değerinden itibaren pH değeri arttıkça ortamdaki OH⁻ iyon konsantrasyonu da artmakta ve dolayısıyla Cu(II) iyonları çökmektedir.

Bu durumu ortamdaki Cu(II) iyonlarının *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile uzaklaştırılmasına neden olan mekanizma ile ilişkilendirmek olanaksızdır.

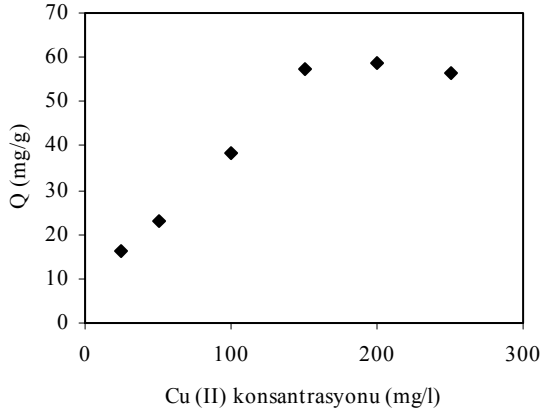
S. cerevisiae hücreleri ile Cu(II) biyosorpsiyonuna sürenin etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışma toplam 180 dakika sürdürülmüştür. Çalışmanın başlamasını takiben ilk 60 dakikada daha sık aralıklarla örnekler alınmış ve daha sonra örnekleme zaman aralıkları arttırılmıştır.



Şekil 2. *S. cerevisiae* hücreleri ile Cu(II) biyosorpsiyonunun zamanla değişimi

Şekil 2. incelediğinde ilk 5 dakika içerisinde biyosorpsiyonun hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve daha sonra 180. dakikaya kadar neredeyse dengede seyrettiği görülmektedir. Burada 5 dakika gibi kısa bir sürede Cu(II) iyonlarının *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri tarafından biyosorbe edilmesi, optimize edilmeye çalışılan sistemin endüstriyel atıksulardan Cu(II) iyonlarının uzaklaştırılmasında kullanılabilirliğini ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilebilirliğini destekleyici bir sonuçtur.

Belirlenen optimum pH ve temas süreleri sabit tutularak başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonunun *S. cerevisiae* hücreleri ile Cu(II) iyonunun biyosorpsiyonu üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu 25-250 mg/l aralığında giderek artan konsantrasyonlarda değiştirilerek çalışıldı. Şekil 3'te görüldüğü gibi gram biyokütle başına biyosorbe edilen mg Cu(II) iyon miktarı başlangıç Cu (II) konsantrasyonu arttıkça artış göstermektedir. Ancak bu durum başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonu 150 mg/l'ye ulaşıncaya kadar geçerlidir.



Şekil 3. *S. cerevisiae* hücreleri ile Cu(II) biyosorpsiyona başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonunun etkisi

Bu değerden sonra biyosorpsiyon kapasitesinde önemli bir artışın gözlenmemesi nedeniyle bir doygunluğa ulaşıldığını söyleyebiliriz. En yüksek biyosorpsiyon kapasite değerine 58.8 mg/g değeri ile 200 mg/l başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Literatürde farklı biyokütleler kullanılarak Cu(II) iyonlarının giderimi için yapılan çalışmalar incelendiğinde elde edilen biyosorpsiyon kapasite değerinin diğerleri ile kıyaslanabilir olduğu düşünülmektedir. Chang vd., *Pseudomonas aeruginosa* PU21 biyokütlesi ile yapmış oldukları bir çalışmada g biyokütle başına 23 mg Cu(II) iyonu biyosorbe edebildiklerini bildirmişlerdir (20).

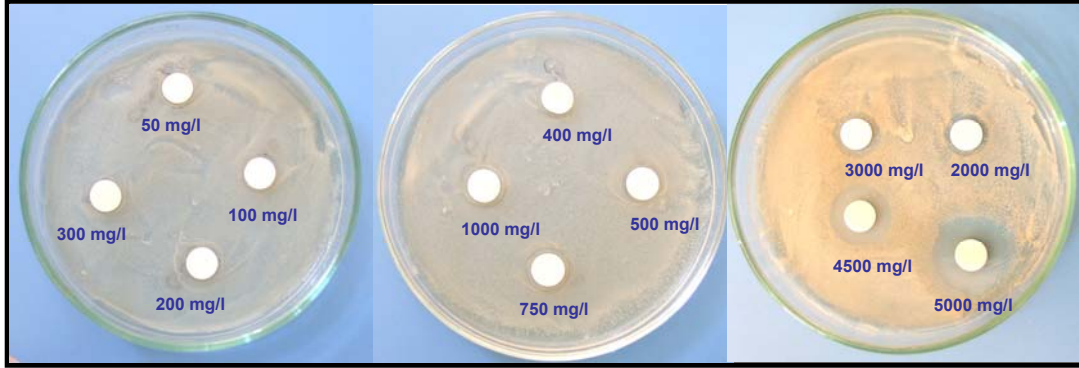
Aspergillus niger biyokütlesi ile yapılan bir çalışmada elde edilen biyosorpsiyon kapasite değeri 3.07 mg/g olarak bildirilmiştir (6).

Cladosporium resinae'den elde edilen melaninle yapılan bir çalışmada 25.4 mg/g biyosorpsiyon kapasitesi elde edildiği bildirilmiştir (21). Jianlong, 2002 yılında *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini ve bu hücreleri kimyasal olarak modifiye ederek elde ettiği biyokütleri Cu(II) biyosorpsiyonu amacıyla kullanmıştır. Bu çalışmada modifiye edilmemiş *S. cerevisiae* biyokütlesi ile 6 mg/g civarında biyosorpsiyon kapasite değeri bildirmiştir (14). Gupta vd., *Spyrogyra* sp. ile yapmış oldukları bir çalışmada Cu(II) iyonu için biyosorpsiyon kapasitesini 133.3 mg/g olarak elde ettiklerini bildirmişlerdir (15).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre pH 5.0 değerinde, 200 mg/l başlangıç Cu(II) iyon konsantrasyonunda ve 5 dakika gibi kısa bir sürede en yüksek biyosorpsiyon kapasite değerine ulaşılmaktadır. Belirlenen optimum koşullarda ulaşılan 58.8 mg/g'lık en yüksek biyosorpsiyon kapasitesi değerinin literatür ile kıyaslanabilir olduğu düşünülmektedir.

Literatürde biyokütlelerin sahip oldukları biyosorpsiyon özelliklerinin metal toleransı ile ilişkilendirilmesi konusunda farklı görüşler bulunmaktadır (15-19). *S. cerevisiae*'nin katı ortamda daha yüksek konsantrasyonlardaki Cu(II) iyonlarını tolere edebildiği görülürken; sıvı ortamda bu toleransın daha düşük konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür. Çeşitli araştırmacılar tarafından benzer sonuçlar rapor edilmiştir (4,16-18). Sıvı ortamda Cu(II) iyonu içermeyen kontrol gruplarına göre yapılan kıyaslama sonucunda 250 mg/l konsantrasyondan sonra üremenin sınırlandığı görülmüştür. Sıvı ortamda tolerans kuru ağırlıklar üzerinden kıyaslandı. Malt extract broth içerisine ilave edilen Cu(II) iyon konsantrasyonu 250 mg/l' ye kadar artıkça ortamda gelişen *S. cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) iyon konsantrasyonundan etkilenmedikleri görüldü. Gerek kontrol (Cu (II) iyonu içermeyen malt ekstarkt broth) ve gerekse 250 mg/l'ye kadar Cu (II) içeren ortamlarda elde edilen kuru ağırlık değerleri neredeyse birbirlerine eşitti (yaklaşık 0.002 g). Sıvı ortamda Cu(II) iyon konsantrasyonu 1000 mg/l'nin üzerine çıktığında üremenin tamamen inhibe olduğu görüldü.

Katı ortamda ise ortamdaki Cu(II) iyon konsantrasyonunun 2000 mg/l ye kadar *S. cerevisiae* hücrelerinin gelişimini etkilemediği görüldü (Şekil 4). Elde edilen veriler Rho ve Kim 2002, de *Streptomyces* sp. hücreleri ile elde edilen verilerle uygunluk göstermektedir (16).



Şekil 4. Malt ekstrakt agar ortamında gelişen *S. cerevisiae* hücrelerinin Cu(II) toleransları

Bu sonuçlardan yola çıkarak diyebiliriz ki; *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri için Cu(II) iyonlarının denenen konsantrasyon aralıklarında tolerans ile biyosorpsiyon arasında bir ilişki bulunamamıştır. Oluşan biyosorpsiyon *S. cerevisiae* biyokütlesi ile Cu(II) iyonlarının fiziksel ve/veya kimyasal bağlanma etkileşimleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Volesky, B. 1990. Biosorption of Heavy Metals. CRC Pres, Boca Raton. 396.
2. Gadd, G.M. 1990. Heavy Metal Accumulation by Bacteria and other Microorganisms. *Experientia*. 46:834-840.
3. Gadd, G.M. 1990. Interactions of Fungi with Toxic Metals. *New Phytol*. 124:25-60.
4. Matheickal, J.T., Yu, Q. 1997. Biosorption of Lead(II) from Aqueous Solutions by *Phellinus badius*. *Miner. Eng.* 10(9)947-957.
5. Fourest, E., Roux, J.C. 1992. Heavy Metal Biosorption by Fungal Mycelial by-Products: Mechanisms and Influence of pH. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 37:399-403.
5. Kapoor, A., Viraraghavan, T. 1998. Biosorption of Heavy Metals on *Aspergillus niger*: Effect of Pretreatment. *Bioresour. Technol.* 63: 109-113.
6. Sağ, Y., Kaya, A., Kutsal, T. 1998. The Simultaneous Biosorption of Cu(II) and Zn(II) on *Rhizopus arrhizus*: Application of The Adsorption Models. *Hydrometallurgy*. 50: 297-314.
7. Aksu, Z. 2001. Equilibrium and Kinetic Modelling of Cadmium(II) Biosorption by *C. vulgaris* in a Batch System: Effect of Temperature. *Sep. Purif. Technol.* 21:285-294.
8. Veglio, F., Beolchini, F. 1997. Removal of Metals by Biosorption: A Review. *Hydrometallurgy*. 44: 301-316.
9. Akar, T., Cabuk, A., Tunali, S., Yamac M. 2006. Biosorption Potential of The Macro-Fungus *Ganoderma carnosum* for Removal of Lead(II) Ions From Aqueous Solutions. *J. of Environ. Sci. and Health, Part A Toxic/Hazardous Substance & Environmental Engineering*. 41:2587-2606.

10. Çabuk, A., Akar, T., Tunali, S., Tabak, O. 2006. Biosorption Characteristics of *Bacillus* sp. ATS-2 Immobilized in Silica Gel for Removal of Pb(II). *J. Hazard. Mater.* 136: 317-323.
11. Tunali, S., Çabuk, A., Akar, T. 2006. Removal of Lead and Copper Ions from Aqueous Solutions by Bacterial Strain Isolated from Soil. *Chem. Eng. J.* 115(3)203-211.
12. Brady, D., Duncan, J.R. 1994. Bioaccumulation of Metal Cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:149-154.
13. Jianlong, W. 2002. Biosorption of Copper(II) by Chemically Modified Biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 37:847-850.
14. Gupta, V.K., Rastogi, A., Saini, V.K., Jain, N. 2006. Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Spirogyra* species. *J. Coll. Interface. Sci.* 296(1)59-63.
15. Rho, J., Kim, J. 2002. Heavy Metal Biosorption and Its Significance to Metal Tolerance of Streptomycetes. *The Journal of Microbiology.* 40:51-54.
16. Hartley, E., Cairney, J.W.G., Meharg, A.A. 1997. Do Ectomycorrhizal Fungi Exhibit Adaptive Tolerance to Potentially Toxic Metals in The Environment?. *Plant and Soil.* 189:303-319.
17. Tam, P.C.F. 1995. Heavy Metal Tolerance by Ectomycorrhizal Fungi and Metal Amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza.* 5:181-187.
18. Vodnik, D., Byrne, A.R., Gogala, N. 1998. The Uptake and Transport of Lead in Some Ectomycorrhizal Fungi in Culture. *Mycol. Res.* 102: 953-958.
19. Chang, J.S., Law, R., Chang, C.C. 1997. Biosorption of Lead, Copper and Cadmium by Biomass of *Pseudomans aeruginosa* PU21. *Wat. Res.* 31:1651-1658.
20. Gadd, G.M., De Rome, L. 1988. Biosorption of Copper by Fungal Melanine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:610-617.