

## Rekombinant *Escherichia coli* hMT1 Suşunun Nikel ve Alüminyuma Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Şeyma Akkurt<sup>1</sup>, Aysel Alkan Uçkun<sup>1</sup>

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

(Alınış / Received: 21.09.2022, Kabul / Accepted: 29.11.2022, Online Yayınlanma / Published Online: 30.12.2022)

### Anahtar Kelimeler

Nikel  
Alüminyum  
Minimum inhibisyon  
konsantrasyonu  
Genetiği değiştirilmiş bakteri  
Atıksuların biyolojik arıtımı

**Öz:** Bu çalışmada, insan MT1 geninin *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 yabancıl suşuna klonlanmasıyla elde edilen rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun Ni ve Al'ye karşı direnç kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yabancıl *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 bakterilerine farklı Ni<sup>2+</sup> ve Al<sup>3+</sup> konsantrasyonları uygulanarak hücrelerin büyüme potansiyelleri ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. *E. coli* BL21 ve *E. coli* hMT1 suşlarının Ni ve Al için MİK değerleri sırasıyla 200 mg/L ve 425 mg/L, 275 mg/L ve 650 mg/L olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, rekombinant suşun Ni ve Al toleransının yabancıl suşa göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metaller arası bir kıyaslama yapıldığında ise Al'ye olan tolerans Ni'den daha yüksek bulunmuştur. *E. coli* hMT1 suşunun düşük konsantrasyonlarda bile bu metalleri adsorbe etmesinin, çevrede kullanılabilirliği açısından, yabancıl suşa göre daha yararlı olduğu söylenebilir. Bu çalışma, *E. coli* hMT1 suşunun Ni ve Al metallerinin suların biyolojik arıtımında kullanılması için bir ön fikir sağlayabilir.

## Determination of Minimum Inhibition Concentrations of *Escherichia coli* hMT1 Recombinant Strain against Nickel and Aluminum

### Keywords

Nickel  
Aluminum  
Minimum inhibition  
concentration  
Genetically engineered bacteria  
Biological treatment of waste  
waters

**Abstract:** The aim of this study was to determinate the resistance capacity of the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) hMT1 strain against Ni and Al, obtained by cloning the human MT1 gene into *E. coli* BL21 wild strain. Growth potentials and Minimum Inhibition Concentrations (MIC) of cells were determined by applying different Ni<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> concentrations to wild *E. coli* BL21 and recombinant *E. coli* hMT1 bacteria. MIC values for Ni and Al of *E. coli* BL21 and *E. coli* hMT1 strains were determined as 200 mg/L and 425 mg/L, 275 mg/L and 650 mg/L, respectively. As a result, Ni and Al tolerance of the recombinant strain was found to be higher than the wild strain. When a comparison was made between metals, the tolerance for Al was found to be higher than for Ni. It can be said that the *E. coli* hMT1 strain adsorbing these metals even at low concentrations is more beneficial than the wild strain in terms of its availability in the environment. This study may provide a preliminary idea for the use of the *E. coli* hMT1 strain in the biological treatment of Ni and Al metals from waters.

\*İlgili Yazar: sakkurt@adiyaman.edu.tr

## 1. Giriş

Endüstriyel faaliyetlerin yoğunlaşmasıyla birlikte su kirliliği katlanarak artmaktadır. Uygun arıtma yapılmadan toksik metallerle kirlenmiş atıksuların salınması çevreye büyük zarar verir. Madencilik, galvanizleme ve pigmentasyon gibi endüstriyel işlemler krom (Cr), kurşun (Pb), arsenik (As), kadmiyum (Cd), nikel (Ni) ve alüminyum (Al) gibi toksik metallerden oluşan önemli miktarlarda atık üretir [1]. Metal içeren atıksuları arıtmak için geleneksel yöntemlerden (kimyasal çöktürme, elektrokimyasal arıtma, filtrasyon) ileri teknolojilere (iyon değiştirme, ters ozmoz ve membran teknolojileri) kadar çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır [2-3]. Bununla birlikte, bu yöntemlerin ilk kurulum maliyeti yüksektir ve yüksek konsantrasyonda metal iyonlarının varlığından dolayı düşük verimde arıtım yapılmaktadır [2]. Etkili bir alternatif, biyosorpsiyon gibi düşük maliyetli adsorbanlarla biyolojik yöntemlerin kullanılmasıdır. Biyosorpsiyon, belirli biyokütlenin kirleticilere bağlanmasına izin veren doğal bir fiziko-kimyasal mekanizmadır. Bir diğer deyişle, metal ve fonksiyonel grupların biyokütle üzerine hızlı bir şekilde bağlanması işlemidir [2]. Başlıca avantajları arasında, düşük maliyet, düşük konsantrasyonlardaki metalleri giderme etkinliği, iyi seçicilik ve adsorban biyomateryalini yeniden oluşturma/yeniden kullanma yeteneği yer alır [4].

Ni, insan sağlığı ve çevre üzerinde toksik etkisi olan ağır metallerden biridir [5]. Atom numarası 28 ve atom kütlesi 58,69 olan, besin açısından önemli bir eser metal türüdür. pH'ya bağlı olarak, çeşitli kimyasal formlarda ( $Ni^{2+}$ ,  $Ni(OH)_2$ ,  $Ni_3(O)_4$ ,  $Ni_2O_3$  vb.) bulunabilir [6]. Ni, kadmiyum-nikel piller, boya ve pigmentler, gübre, galvanik endüstrileri, paslanmaz çelik için ferronikel üretiminden alaşım elementlerine, tıbbi ekipmanlara, enerji üretim endüstrilerine kadar geniş endüstriyel uygulamalara sahip ağır metallerden biridir [7-8]. Ni; esneklik, mukavemet ve yalıtım özellikleri nedeniyle alaşım hazırlamada büyük ölçüde kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek sıcaklıklara dayanabilmesi nedeniyle gaz türbinlerinde ve roket motorlarında da kullanılmaktadır [8].  $Ni^{2+}$  iyonları, Ulusal Toksikoloji Programı (NTP), ABD Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı (HHS) ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insanlar için kanserojen olarak kabul edilmektedir [9]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen izin verilen içme suyu sınır değeri Ni için 0,07 mg/L'dir [10]. Ni'ye uzun süre maruz kalınması, insanlarda alerji, DNA hasarı, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları, akciğer fibrozisi ve burun kanserine neden olabilir [11].

Çalışmamıza konu olan bir diğer çevresel kirlenici metallerden Al, yerkabuğunda doğal haliyle yüksek miktarlarda bulunur. 2019 yılında dünya çapında yaklaşık 63 milyon ton Al üretilmiştir [12]. Al, yüksek iletkenlik, dövülebilirlik ve korozyon direnci gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı birçok endüstriyel sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Makine ve inşaat endüstrilerinde Al, esas olarak metal alaşımlarını oluşturmak için kullanılır. İlaç endüstrisinde ise paketleme, antasitler ve aşılarda kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde deri için tabaklama maddesi olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca alüminyum sülfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) ve polialüminyum klorür (PAC), su arıtma tesislerinde kullanılan başlıca pıhtılaştırıcı maddelerdir [13-14]. Al'nin farklı endüstriyel sektörlerde yaygın kullanımı, bu metal tarafından kirlenmiş yüksek miktarda atık üretir. Bu atıkların su kütlelerinden yetersiz bertarafı, su sistemlerini, toprakları, bitkileri ve canlıları etkileyen çeşitli çevresel sorunlara neden olur [15]. Nötr pH'larda Al'nin çözünmemesi nedeniyle [16-17], bu metal nadiren doğal olarak suda litre başına miligramın birkaç onda birinden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur [18]. Bununla birlikte, içme suyunda Al'in büyük bir kısmı, inorganik ve organik ligandlarla ilişkili çözünebilir, monomerik Al olarak mevcut olabilir [18-19], bu da ölümcül sonuçları olan ciddi sağlık sorunlarının nedeni olabilir. Sucul ortamlarda yaşayan organizmalar da  $Al^{+3}$  formundaki Al'nin varlığından etkilenir. Balıklar üzerindeki etkileri literatürde en çok ele alınan konudur. Araştırmacılar, bu iyon formunun 0,5 mg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarının, birçok türde yüksek bir ölüm oranına neden olabileceğini ve esas olarak ozmoregülasyon ve solunum sistemini etkilediğini bildirmektedir. DSÖ, Al'nin içme suyunda maksimum tolere edilme miktarını 0,2 mg/L olarak belirlemiştir [20]. Al, organizmaların işlevi için gerekli olan kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe) ve diğer elementlerin emilimini azaltabilir ve böylece normal metabolik süreçlerine müdahale edebilir. Hayvanlar için iyi bilinen bir nörotoksindir ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğundan şüphelenilmektedir [21]. 3 mM'dan düşük Al konsantrasyonunun *E. coli*'nin büyümesini inhibe ettiği [22] ve 1 mM'dan yüksek dozunun *Desulfovibrio desulfuricans* üzerinde toksik etki yarattığı rapor edilmiştir [23]. Toksisitesine rağmen, bazı türler metabolik yollarını değiştirerek Al'ye dirençli olabilir. Oksaloasetat ve oksalat gibi organik asitler, mikroorganizmaların Al'yi dışarı atmasına izin verir [22]. Bugüne kadar Al toleransı üzerine yapılan çalışmaların çoğu bitkiler ve mantarlar üzerinde yapılmıştır ve çok az bakterinin Al toleransı gösterdiği rapor edilmiştir [22-23].

Çökeltme, oksidasyon/indirgeme, iyon değişimi, filtrasyon, elektrokimyasal işlem, membran ayırma ve buharlaştırma dahil olmak üzere metal giderimi için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin çoğu, metal konsantrasyonları 100 mg/L'den düşük olduğunda etkisizdir veya aşırı pahalıdır [24]. Bu nedenle, yeni teknolojilerin araştırılması son zamanlarda teşvik edilmiştir. Mikroorganizmaların kullanımına dayalı biyoremediasyon stratejileri potansiyel bir alternatif olarak kabul edilmiştir [25]. Ağır metallerle dirençli mikroorganizmalar endüstriyel atıksuların arıtılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu dirençli mikroorganizmaların detoksifiye etme yeteneği, atıksu sistemlerindeki ağır metallerin biyoremediasyonu için kullanılmaktadır [26]. Bakteriler her yerde bulunur, kontrollü koşullar altında yayılabilir ve ortamdaki değişikliklere karşı oldukça dirençlidir. Bu nedenle, bakteri biyokütlesi avantajlı bir biyosorbenttir [27]. Bakterilerin hücre duvarlarında enzimler, lipopolisakaritler, peptidoglikan ve lipoproteinler gibi karboksil, sülfat, fosfat ve amino grupları gibi işlevsellik açısından zengin makromoleküller bulunur. Katyonik ve anyonik grupların bir arada bulunması, bakteri hücre duvarına amfoterik bir davranış kazandırır. Bununla birlikte, Van Der Wal ve arkadaşları [28] anyonik grupların katyonik gruplara üstün olduğunu ve bu nedenle çoğu bakteri biyokütlesinin izoelektrik noktasının pH 4'ü geçmediğini doğruladı. Sonuç olarak, bakteriler ve Ni<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> gibi pozitif yüklü kirleticiler arasındaki elektrostatik etkileşimler biyosorpsiyon sürecini destekleyebilir.

Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar, kirleticilerin biyoremediasyonu ve biyodegradasyonunu arttırmak için farklı canlılardan (bakteri, maya, ökaryotlar vb.) kirleticileri gidermede etkili olduğu bilinen genlerin mikroorganizmalara aktarılması sonucunda üretilmektedir [29]. Fitoşelatinleri (PC'ler) ve metalotiyoneinleri (MT) kodlayan genler, ağır metallerin gideriminde metal bağlayıcı proteinler olarak kullanılmaktadır [30]. MT'ler mayalar da dâhil olmak üzere bakterilerden insanlara kadar çoğu organizmada bulunan düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir [31]. MT'ler, metal iyon koordinasyonunda ortaya çıkan metal-tiyolat komplekslerini oluşturan, sistein açısından zengin proteinlerin (amino asit içeriğinin %30'una yakın) heterojen bir ailesini oluşturur. MT'lerin toksik metallerle karşı koruma, fizyolojik metallerin homeostazi, serbest radikal temizleme ve antioksidatif stres koruması, hücrenin oksidatif durumunun kontrolü, antiapoptotik savunma gibi birçok rolü olduğu düşünülmektedir. Bazı özellikleri hala bilinmiyor olsa da tüm MT'lerin metal iyonlarını, özellikle Zn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>1+</sup>'yu hücre içine alma kapasitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir [32]. İnsan MT'leri dört farklı izoformdan oluşur. İnsan vücudunda metal toksisitesine karşı en çok sentezlenen MT izoformu MT1'dir [33]. Metal toksisitesine karşı koruma, öncelikle MT1 ve MT2'ye indirilirken, MT3'ün nöronlarda Zn homeostazında rol oynadığı düşünülmektedir ve MT4'ün işlevi tam olarak bilinmemektedir [34]. Memeli ve mikrobiyal MT'lerin metal biyosorpsiyonundaki etkinlikleri açısından incelendiği bir çalışmada genel olarak, insan MT'sini (MT1A) eksprese eden hücrelerin en iyi metal (Cd, Cu, Zn, Pb) adsorpsiyon performansını sergilediği tespit edilmiştir [35]. Bu bilgiler göz önüne alınarak, insan MT 1 geni yabanıl *E. coli* BL21 suşunun Ni ve Al metal iyonlarına karşı toleransını arttırmak için tercih edilmiştir. Bakterilerin metallerle karşı direnç kapasiteleri, minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) testi ile belirlenir [36]. Bakterilerin MİK'inin belirlenmesi, o bakteri türleri tarafından tolere edilebilecek en yüksek metal konsantrasyonunu gösterir [37]. Ayrıca MİK değerinin belirlenmesi, biyosorpsiyon çalışmalarında, ne kadar konsantrasyonda metal giderilebileceği hakkında bir ön fikir vermesi açısından faydalıdır. Literatürde, rekombinant bakterilerin yabanıl bakterilerden hem metal direnç kapasitelerinin hem de metal giderim oranlarının daha fazla olduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır [38-39-40].

Bu çalışmanın amacı, yabanıl *E. coli* BL21 suşuna, insan MT 1 geni klonlanarak Ni ve Al metal iyonlarına karşı direnç kapasitesinin artırılmasıdır. Çalışmada, yabanıl *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarının Ni ve Al metal iyonları için MİK değerleri belirlenmiştir. Belirlenen bu MİK değerleri, atıksulardan Ni ve Al metallerinin gideriminde, klonlanan insan MT 1 (hMT1) geninin etkinliği hakkında ön fikir vermesi açısından oldukça önemlidir. Rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun Ni ve Al'ye karşı MİK değerlerinin belirlenmesi ilk defa bu çalışmada yapılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bakteri kültürlerinin yetiştirilmesi

Çalışmada *E. coli* BL21(kontrol grubu) ve *E. coli* hMT1 rekombinant suşları kullanılmıştır. Hücreler, sıvı özü (10 g/L), pepton özü (10 g/L) ve sodyum klorür NaCl (3 g/L) içeren Luria Bertani (LB) ortamında 120 rpm çalkalama hızında (MS, Major Science orbital çalkalayıcı) 37 °C'de büyütülmüştür. Rekombinant bakterilerin büyümesi için gerekli olan amfisilin antibiyotiği (Sigma-Aldrich) besiyeri ortamına eklenmiştir.

## 2.2. Ni ve Al solüsyonlarının hazırlanması

MİK tayininde kullanılan metal solüsyonları, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) ve Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) metal tuzları kullanılarak hazırlanmıştır. Ni ve Al stok çözeltileri 1000 mg/L konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler distile su ile seyreltilerek deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

## 2.3. Gen sentezi ve klonlama

İnsan MT1 gen dizisi (genbank erişim numarası: NM\_005946), Twist Bioscience'dan temin edilmiştir. MT1 gen parçası ve pET21 plazmidi, EcoRI ve NotI kesme enzimleri (Thermo Scientific) ile çift sindirilmiştir. Bu gen daha sonra pET21 plazmitine bağlanmıştır. Konakçı *E. coli* BL21 suşu kimyasal CaCl<sub>2</sub> protokolüne (Sigma-Aldrich) göre geni almaya hazır hâle getirilmiştir. Rekombinant pET21 plazmitleri (Sigma-Aldrich), konakçı *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra rekombinant *E. coli* hMT1 suşu, amfisilin (50 µg/mL), X-gal (mavi/beyaz hücre taraması için) ve IPTG ile takviye edilmiş LB agar plakalarına ekildi ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Plazmidi izole etmek için QIAGEN Qiaprep Spin Miniprep Kiti (Kat no: 27104) kullanılmış ve klonlamayı doğrulamak için PCR kullanılmıştır. Ek genleri doğrulamak için, izole edilmiş plazmitlerin dizileme kütüphaneleri hazırlanmış ve Miseq platformu kullanılarak dizilenmiştir.

## 2.4. Hücrelerin büyüme eğrisi

Yabanıl *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarına belirli konsantrasyonlarda Ni (0-800 mg/L) ve Al (0-1000 mg/L) metalleri uygulanarak hücrelerin büyümeleri üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Hücreler, belirlenen Ni ve Al konsantrasyonlarını içeren LB besiyerinde 120 rpm karıştırma hızında, 37 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Belirli aralıklarda (6., 12., 18., 24., 36., ve 48. saatlerde) erlenlerden örnekler alınarak büyümenin en iyi gözleendiği optimum değer olan 600 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Thermo Varioscan Flash 2000) ölçülen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu verilere göre hücrelerin büyüme eğrileri çizilmiştir (Şekil 1-2).

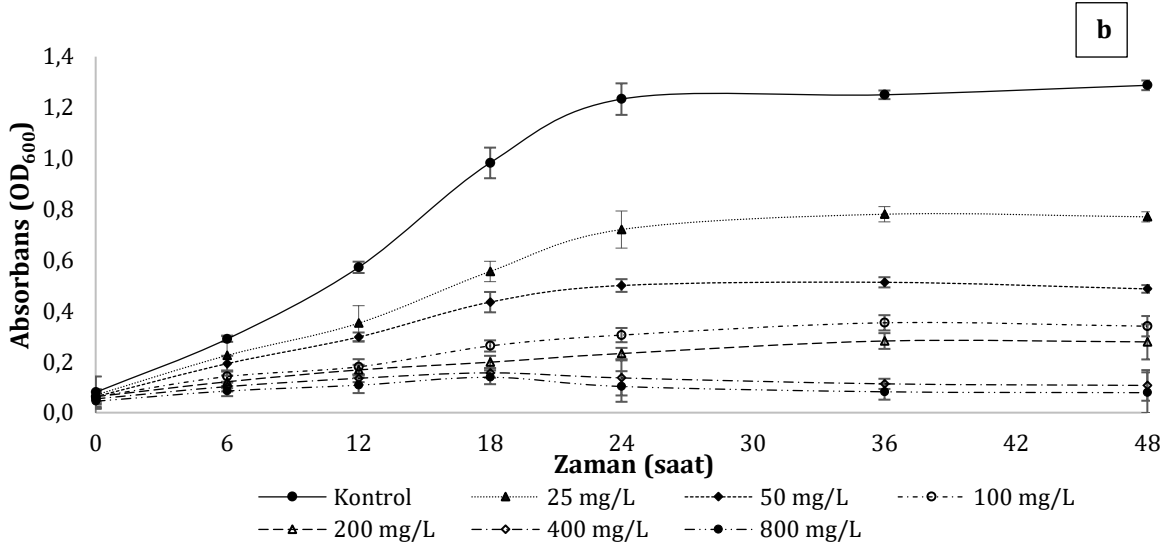
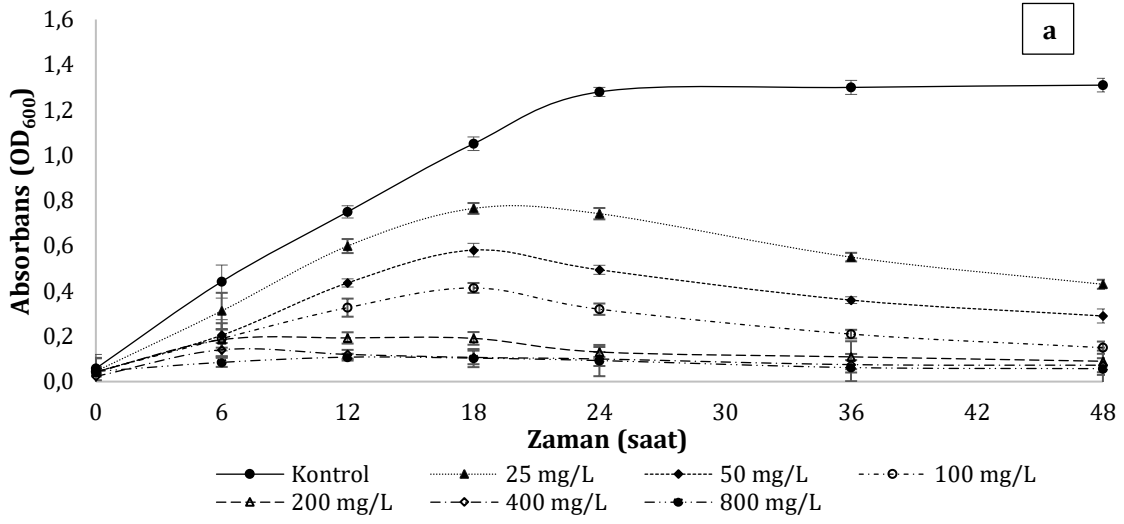
## 2.5. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

*E. coli* BL21 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. *E. coli* hMT1 rekombinant suşu ile *E. coli* BL21 yabanıl suşunun Ni ve Al'ye direnç kapasiteleri, MİK testi ile mikro seyreltme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ni ve Al'nin farklı konsantrasyonları (0-1000 mg/L) için MİK analizi yapılmıştır. 50 mL LB besiyeri içeren 100 mL'lik erlenmayer şişelerine belirlenen Ni ve Al konsantrasyonları (0-1000 mg/L) ilave edilmiştir. 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu (OD) 0,5'e ulaşan hücreler, bir mikropipet ile konik şişelere eklenmiştir. Rekombinant hücreler içeren erlenlere amfisilin (50 µg/mL) eklenmiştir. Erlenler 120 rpm'de çalkalanarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin MİK değeri, mikropilaka okuyucuda (Thermo Varioscan Flash 2000) 600 nm absorbansda hücrelerin büyümesi analiz edilerek belirlenmiştir. Cihazda okunan sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca hücrelere filtreyle steril edilmiş %0,1'lik trifeniltetrazoryum klorür (TTK) canlılık indikatörü olan TTC konulmuştur. Bu yöntem kullanılarak MİK değerleri doğrulanmıştır. Bu yöntemde, canlılık ve hücresel aktivite varlığında TTK, pembe bir renge dönüşerek trifenil formazana indirgenir [41]. Canlılığın göstergesi olan pembe rengin kaybolduğu ilk Ni ve Al konsantrasyonları MİK olarak belirlenmiştir. Her mikropilaka kuyusuna % 0,1 TTK ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler bir mikropilaka okuyucuda renk değişiminin gözlelenebildiği optimum absorbans değeri olan 480 nm'de ölçülmüştür. Deneysel çalışmalar, her numune için üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

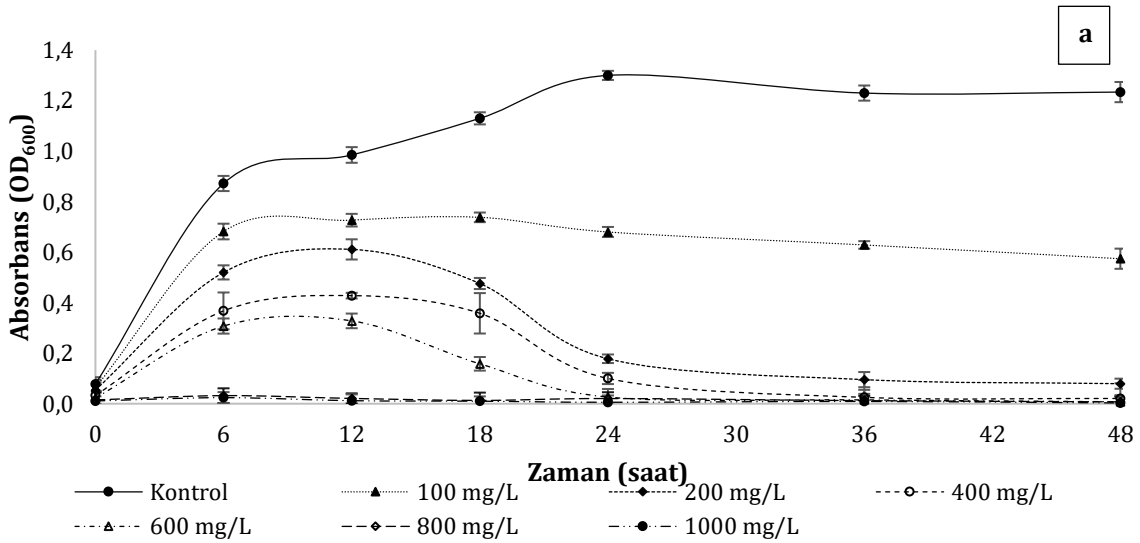
## 3. Bulgular

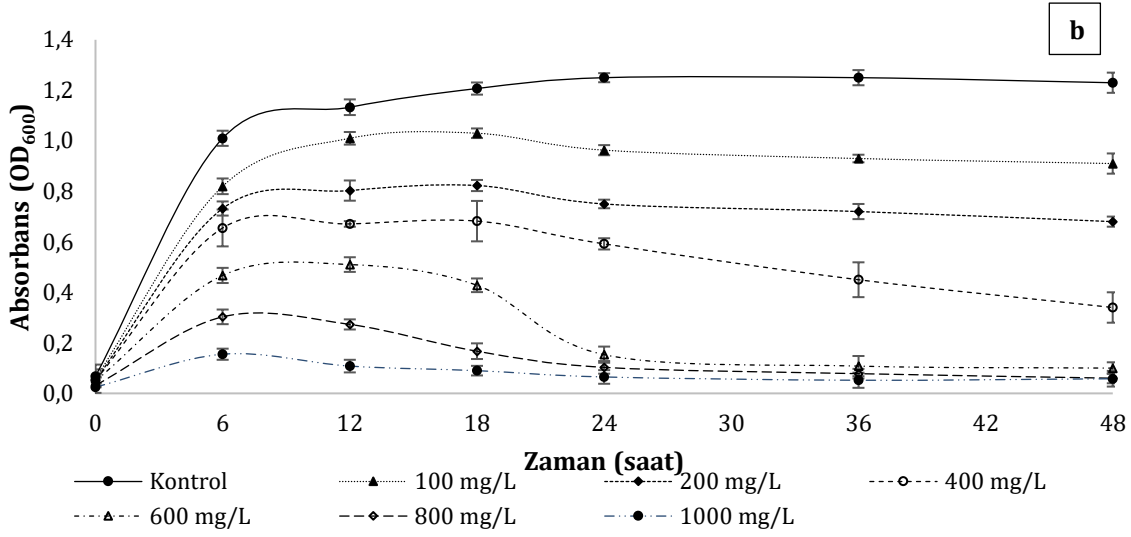
### 3.1. Hücrelerin büyüme potansiyeli üzerine Ni ve Al metallerinin etkisi

Farklı Ni<sup>2+</sup> (0-800 mg/L) ve Al<sup>3+</sup> (0-1000 mg/L) konsantrasyonlarına maruz bırakılan yabanıl *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarının büyüme eğrileri Şekil 1 ve Şekil 2' de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Farklı Ni konsantrasyonlarına maruz kalan *E. coli* BL21 (a) ve rekombinant *E. coli* hMT1 (b) süşlerinin büyüme eğrileri





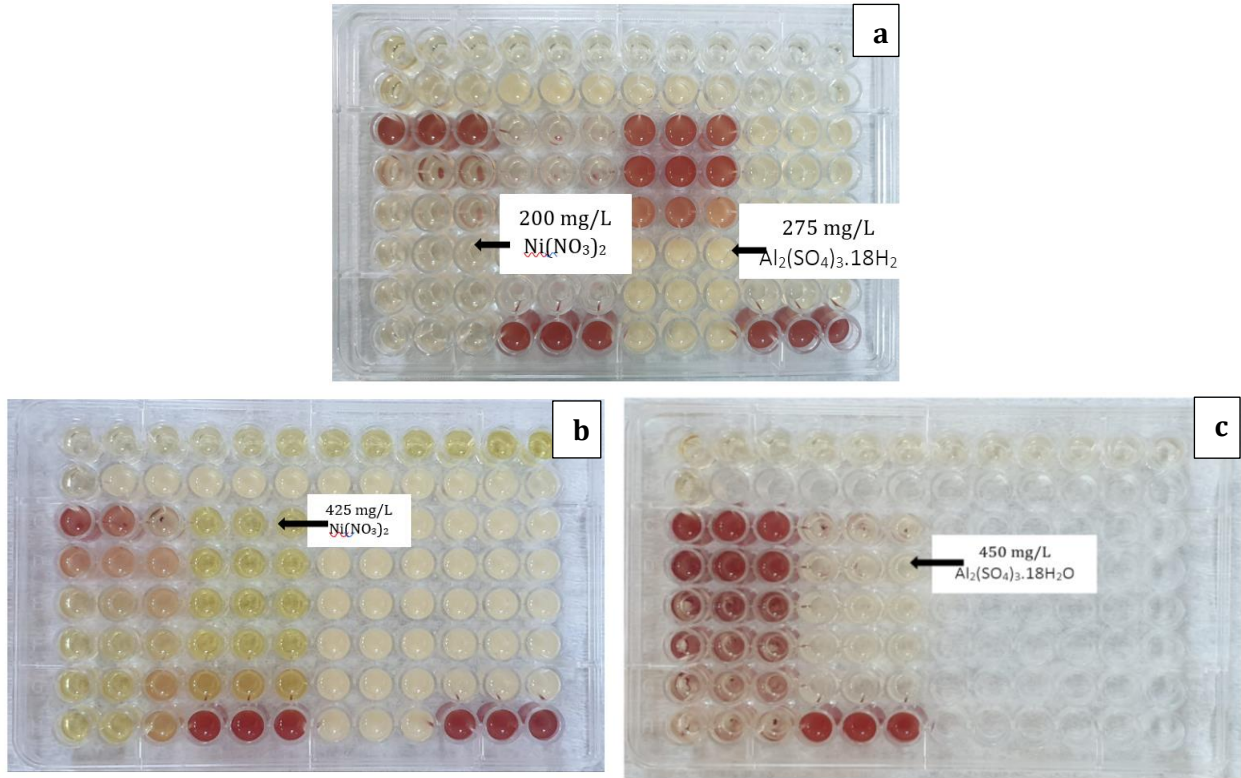
**Şekil 2.** Farklı Al konsantrasyonlarına maruz kalan *E. coli* BL21 (a) ve rekombinant *E. coli* hMT1 (b) suşlarının büyüme eğrileri

Ni varlığında *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarının davranışını değerlendirmek için, suşların büyüme performansları ilk olarak Ni içermeyen (kontrol) bir ortamda belirlenmiştir. Şekil 1a'ya bakıldığında, düşük konsantrasyonlarda (25, 50, 100 mg/L) Ni uygulanan hücreler 18. saate kadar büyüme göstermiş olup 24. saate doğru büyüme hızında önemli oranda azalma gözlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ) ve sonrasında azalma devam etmiş ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p \geq 0.05$ ). Yüksek konsantrasyonlarda ise (200, 400, 800 mg/L) hücreler inhibe olmuş ve herhangi bir büyüme etkisi görülmemiştir. Rekombinant *E. coli* hMT1 hücrelerinde ise (Şekil 1b) 200 mg/L'ye kadar olan konsantrasyonlarda 24. saate kadar büyüme hızında önemli oranda artış gözlenmiş olup ( $p \leq 0.05$ ), 24. saatten sonra hücreler durağan faza girmiştir. 400 mg/L ve 800 mg/L Ni konsantrasyonlarında hücreler inhibe olmuş ve herhangi bir büyüme etkisi görülmemiştir.

Şekil 2a'da, yabancı *E. coli* BL21 suşunun Al'ye karşı büyüme potansiyeli görülmektedir. Buna göre, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L Al konsantrasyonlarında büyüme hızının 12. saate kadar arttığı, 24. saatten sonra durağan faza girdiği tespit edilmiştir. 600 mg/L'de ise 6. saate kadar hücrelerin büyüme hızında artış olduğu daha sonra gittikçe azaldığı ve 24. saatten sonra inhibe olduğu belirlenmiştir. 800 mg/L ve 1000 mg/L Al konsantrasyonlarında ise hücrelerde ilk saatten itibaren büyüme gözlenmemiştir. Rekombinant *E. coli* hMT1 hücrelerinin büyüme hızının 400 mg/L'ye kadar olan Al konsantrasyonlarında 18. saate kadar arttığı, 24. saatten itibaren durağan faza girdiği gözlenmiştir (Şekil 2b). 600 mg/L Al konsantrasyonunda hücrelerin 12. saate kadar büyüdüğü, daha sonra büyüme hızının kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek Al konsantrasyonları olan 800 ve 1000 mg/L'de ise ilk 6 saate kadar hücrelerin büyüme hızının arttığı, daha sonra durağan faza girdiği, 36. saatten sonra inhibe olduğu görülmektedir.

### 3.2. MİK değerleri

Bakteriyel hücreler, çevredeki ortama bağlı olarak metal iyonlarına karşı tolerans geliştirerek metal giderme potansiyellerini geliştirme yeteneğine sahiptirler. Bu çalışmanın sonucunda, yabancı *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarının Ni için MİK değerleri, sırasıyla 200 mg/L ve 425 mg/L olarak; Al için ise sırasıyla 275 mg/L ve 650 mg/L olarak bulunmuştur. Hücrelerin MİK değerlerini doğrulamak için kullanılan TTK analizi sonunda elde edilen mikropilaka görüntüleri Şekil 5'te verilmiştir.



**Şekil 5.** Ni ve Al uygulanan yabancıl *E. coli* BL21 suşunun mikroplaka görüntüsü (a), Ni uygulanan rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun mikroplaka görüntüsü (b), Al uygulanan rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun mikroplaka görüntüsü (c)

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmada, Ni ve Al uygulanan yabancıl *E. coli* BL21 ve rekombinant *E. coli* hMT1 suşlarının, büyüme eğrilerinden elde edilen sonuçlar ile hücrelerin MİK değerleri sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, Ni uygulanmış yabancıl hücrelerin 18. saatten sonra, rekombinant hücrelerin ise 24. saatten sonra durağan faza girmeleri, rekombinant hücrelerin Ni'ye karşı direnç kazandığını göstermektedir. Ayrıca yabancıl hücreler 200 mg/L Ni konsantrasyonunda inhibe olurken rekombinant hücrelerin büyümeye devam etmesi, ilk inhibisyonun 400 mg/L Ni konsantrasyonunda görülmesi de yine rekombinant hücrelerin Ni'ye karşı daha toleranslı olduğunu ifade etmektedir. Yabancıl suşun Ni MİK değerinin 200 mg/L, rekombinant suşunkinin 425 mg/L olması da yine rekombinant suşun Ni'ye tolerans kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Büyüme eğrilerinde yabancıl suşun büyüme hızının 200 mg/L Ni konsantrasyonunda, rekombinant suşun ise 400 mg/L'de inhibe olmaya başlaması, belirlenen bu MİK değerleri ile uyumluluk göstermektedir. Benzer durum Al uygulanan yabancıl ve rekombinant suşların büyüme eğrilerinde ve MİK değerlerinde de gözlemlenmiştir. Buna göre, yabancıl hücrelerin büyüme hızı 600 mg/L Al konsantrasyonunda 6. saatten sonra inhibe olurken rekombinant hücreler hala büyüme fazındaydı ve 24. saatten sonra durağan faza girebildi. Ayrıca, en yüksek Al konsantrasyonları olan 800 mg/L ve 1000 mg/L Al konsantrasyonlarında yabancıl hücrelerde ilk saatten itibaren inhibisyon gözlenirken rekombinant hücrelerde 36. saatten itibaren inhibisyon gözlenmiştir. Yani hem tolere edilebilen Al konsantrasyonu açısından hem de inhibisyonun geç saatlerde gerçekleşmesi açısından rekombinant suşun yabancıl suşa göre önemli oranda Al'ye dirençli olduğu söylenebilir. Yine rekombinant suşun Al MİK değerinin (650 mg/L), yabancıl suşunkinden (275 mg/L) daha yüksek bulunmuş olması da rekombinant suşun Al'ye direnç kapasitesinin daha yüksek olduğunu ifade etmektedir. MİK değerlerinin, hücrelerin büyüme eğrilerinde Al'nin ilk inhibisyon konsantrasyonlarıyla örtüşmesi de bulgularımızı doğrulamaktadır. Birçok çalışmada yabancıl bakterilerin MİK değerleri belirlenmiştir. Giovanella ve arkadaşları [42] çalışmalarında, *Pseudomonas* sp. B50D türünün Ni için MİK değerini, 3 mM olduğunu rapor etmişlerdir. Wu ve arkadaşları [43], *Pseudomonas* sp. (X2), *Brevibacterium* sp. (X6) olmak üzere iki farklı deniz bakterisinin ve *E. coli* DH-5 $\alpha$  suşunun Ni MİK değerlerini sırasıyla; 500, 1000 ve 200 mg/L bulmuşlardır. Benzer bir başka çalışmada, *Lactobacillus plantarum* MF042018 suşunun Ni direnç kapasitesi olan MİK değeri 500 mg/L olarak bildirilmiştir [44]. Sharma ve arkadaşları [45], çamur, kanalizasyon ve atıksu ortamlarının 17 farklı bölgesinden izole ettikleri bakteri suşlarının Ni tolerans kapasitelerini araştırmışlardır. 4 farklı *Bacillus* izolatının 700 mg/L Ni konsantrasyonuna direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca izole ettikleri diğer 33 izolatın, 500 mg/L Ni konsantrasyonunu tolere edebildiğini ileri sürmüşlerdir. Al-Gheethi [46], bir kanalizasyon atıksuyundan izole ettiği *Bacillus subtilis* türünün 6 mM Ni iyonlarını tolere edebildiğini ileri sürmüştür. Chaudhary ve arkadaşları [47], *E. coli* (ATCC 11230), *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637),

*Microbacterium* sp. (MTCC 7185) suşlarının Ni MİK değerlerinin üç tür içinde 1mM olduğunu bildirmişlerdir. Senoro ve arkadaşları [48], *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. epidermidis* RP62A'nın sırasıyla Ni MİK değerlerini 62.5 mg/L ve 125 mg/L olarak bulmuşlardır.

Ayrıca literatürde bakterilerin Ni'ye karşı direnç ve giderim kapasitesini arttırmak için Ni affinitesi yüksek genlerin klonlandığı rekombinant bakteriler ile yapılmış olan çalışmalar da bulunmaktadır [49-50]. Deng ve arkadaşları [49], *Helocobacter pylori* (NixA) ve *Staphylococcus aureus*'tan (NisA) iki farklı Ni affiniteli transmembran proteininin (NiCoTs) ve bezelye MT geninin Ni affinitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, hem NiCoT'leri hem de MT'yi ifade eden rekombinant suşların (NixA+MT ve NisA+MT) Ni affinitesinin ve direnç kapasitesinin arttığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada gram pozitif (*B. cereus* RC607) ve gram negatif (*Pseudomonas* sp. K-62) bakteri suşlarından metal bağlayıcı proteinleri (MerP) aşırı eksprese edebilen *E. coli* konakçıları, sulu ortamda Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve Cr<sup>+3</sup>'ü adsorbe etmek için kullanılmıştır. İfade edilen MerP proteinlerinin tipi de rekombinant biyosorbentlerin performansını etkilediğini tespit etmişlerdir. Gram pozitif MerP proteinleri (yani GB hücreleri) içeren biyosorbentler Ni<sup>2+</sup> için daha iyi adsorpsiyona sahipken, Gram negatif MerP içeren GP hücreleri Zn<sup>2+</sup> ve Cr<sup>+3</sup> iyonları için daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi sergilediğini tespit etmişlerdir [50]. Bu bağlamda, MT olarak bilinen bazı metal bağlayıcı proteinlerin, bakterilerin metallere karşı direnç kapasitelerini arttırdığı sonucuna varılabilir [51]. Ayrıca direnç kapasitelerindeki ve metal giderim oranlarındaki farklılıklar, her bakterinin izole edildikleri ortamdaki ve aktarılan genlerin farklı olması ile ilgili olabilir. Sonuç olarak Ni metali ile kirlenmiş ortamlardan izole edilen dirençli suşlar ile bu çalışmada kullanılan rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun, Ni MİK değerlerinin birbirine yakın olduğu, hatta bazılarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu da rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun su ve atıksulardan Ni gideriminde biyoteknolojik bir araç olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Al MİK değerinin belirlendiği çalışmalara baktığımızda ise yine Ni'de olduğu gibi suşların izole edildiği yere ve bakteri cinsine bağlı olarak MİK değerlerinin farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Titah ve arkadaşları [37], Al geri dönüşüm endüstrisi atıksuyundan izole ettikleri azot içeriği yüksek ortamlarda bol bulunan *Brochothrix thermosphacta*'yı ve birçok farklı kirlenmiş alanda bulunabilen sucul bir bakteri türü olan *Vibrio alginolyticus*'un Al MİK değerini 500 mg/L olarak belirlemişlerdir. Huang ve arkadaşları [52] asidik topraktan izole ettikleri Al'ye toleranslı olduğu bilinen *Burkholderia* sp. SB1 suşunun Al<sup>+3</sup>'e direnç oranını 270 mg/L olarak tespit etmişler ve bu suşun Al ile kirlenmiş asidik kırmızı toprakların biyolojik olarak iyileştirilmesi için potansiyel olarak bir ajan olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Yine aynı çalışmada, *Anoxybacillus* sp'nin, 200-800 mg/L Al<sup>+3</sup> içeren bir besiyerinde %100 - %77 arasında değişen nispi büyüme oranlarıyla büyüebildiği gözlemlenmiştir [52]. Abo-Amer ve arkadaşları [53], endüstriyel atıksulardan izole ettikleri *Providencia rettgeri* MAM-4 suşunun Al<sup>+3</sup> direncini 500 mg/L olarak, ticari olarak satın aldıkları *B. cereus*'un direncini yine 500 mg/L olarak belirlemişlerdir. Bu konudaki diğer çalışmalarda, *Acidiphilium cryptum*'un Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>'a olan direncinin 100 mg/L olduğu [54], *Flavobacterium* sp'nin 2000 mg/L'ye kadar Al toleranslı olduğu, buna karşın *Arthrobacter* sp'nin maksimum Al tolerans konsantrasyonunun yaklaşık 300 mg/L olduğu rapor edilmiştir [55]. Bu çalışmalardaki Al MİK değerleri ile bizim çalışmamızdaki rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun Al MİK değeri karşılaştırıldığında, rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun MİK değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, rekombinant *E. coli* hMT1 suşunun sulardan Al gideriminde etkili olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, rekombinant suşun yabancı suşa göre Ni ve Al toleransının daha yüksek olduğu, rekombinant suşun ise Ni'ye göre Al'ye daha toleranslı olduğu ancak yine de düşük konsantrasyonlarda bile bu metalleri adsorbe etmesinin çevrede kullanılabilirliği açısından yabancı suşa göre daha yararlı olduğu söylenebilir. Bu sonuçlara göre, Ni ve Al içeren sular, belirtilen MİK değerlerinin üstüne ulaşmadıkça biyolojik olarak arıtılabilir. Ancak belirtilen MİK değerlerinin üstüne çıktığında bir ön arıtma işlemi uygulanabilir. Bu bilgiler ışığında, insan MT1 geninin Ni ve Al metallerinin alımını ve biyoremediasyon kabiliyetini de arttıracığı sonucuna varılabilir. Aynı zamanda bu çalışmanın sonuçları, bu rekombinant suşun pelletlerinin Ni ve Al iyonlarının sudan biyolojik olarak uzaklaştırılmasında kullanılacak biyosorbent olarak geliştirilmesi için umut vericidir.

## Kaynakça

- [1] Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., Batista, B. L. 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813-825.
- [2] Abbas, S. H., Ali, W. H. 2018. Evaluation of biomass type blue Cyanophyta algae for the sorption of Cr (III), Zn (II) and Ni (II) from aqueous solution using batch operation system: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Global Nest Journal*, 20(1), 69-82.



- [3] Duong, H. C., Duke, M., Gray, S., Nelemans, B., Nghiem, L. D. 2016. Membrane distillation and membrane electrolysis of coal seam gas reverse osmosis brine for clean water extraction and NaOH production. *Desalination*, 397, 108-115.
- [4] Wang, J., Chen, C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195-226.
- [5] Shirdam, R., Khanafari, A., Tabatabaei, A. 2006. Cadmium, nickel and vanadium accumulation by three strains of marine bacteria. 4(3),180-187.
- [6] Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., Kim, K. H. 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365-385.
- [7] Igwe, J., Abia, A. A. 2006. A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbents. *African journal of Biotechnology*, 5(11), 1167-1179.
- [8] Kulkarni, R. M., Vidya Shetty, K., & Srinikethan, G. 2019. Kinetic and equilibrium modeling of biosorption of nickel (II) and cadmium (II) on brewery sludge. *Water Science and Technology*, 79(5), 888-894.
- [9] National Toxicology Program. 2011. NTP 12th report on carcinogens. Report on carcinogens: carcinogen profiles, 12. <https://ntp.niehs.nih.gov/go/roc14> (Erişim Tarihi: 20.08.2022).
- [10] World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations (fourth ed.) 2011. p. 541 Geneva, Switzerland, vol. 1. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf) (Erişim Tarihi: 10.07.2022).
- [11] Sarkar, B., Sharma, U., Adhikari, K., Lahiri, S. K., Baltrėnaitė, E., Baltrėnas, P., Dutta, S. 2021. Application of Artificial Neural Network and Particle Swarm Optimization for modelling and optimization of biosorption of Lead (II) and Nickel (II) from wastewater using dead cyanobacterial biomass. *Journal of the Indian Chemical Society*, 98(3), 100039.
- [12] Merian, E., Anke, M., Ichnat, M. 2004. Elements and their compounds in the environment edited by related titles Joachim Nölte Bernhard Welz, Michael Sperling Handbook of Elemental Speciation Markus Stoeppler, Wayne R. Reference Materials for Chemical Analysis. 64s.
- [13] Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Rondeau, V. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(S1), 1-269.
- [14] Gustafsson, J.P. Visual MINTEQ 3.1 User Guide. 2020. <https://vminteq.lwr.kth.se/download/> (Erişim Tarihi: 10.07.2022).
- [15] Lydersen, E., Löfgren, S., Arnesen, R. T. 2002. Metals in Scandinavian surface waters: effects of acidification, liming, and potential reacidification. *Critical reviews in Environmental Science and Technology*, 32(2-3)(2002), 73-295.
- [16] Hem, J. D. 1985. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water (Vol. 2254). Department of the Interior, US Geological Survey. 359s.
- [17] Brown, D. J. A. 1989. Fish survival in acid waters. *Acid toxicity and Aquatic Animals*, (1989), 31-44.
- [18] Earle, J., Callaghan, T. 1989. Impacts of mine drainage on aquatic life, water uses, and man-made structures. *Coal mine drainage prediction and pollution prevention in Pennsylvania*, chapter 4, 1-10.
- [19] Reiber, S. H., Kukull, W., Standish-Lee, P. 1995. Drinking water aluminum and bioavailability. *Journal of the American Water Works Association*, 87(5), 86-100.
- [20] Fawell, M.J.K., Guidel, *Drinking Quality*, 8 - 23.
- [21] Bondy, S. C. 2014. Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration. *Toxicology*, 315, 1-7.
- [22] Auger, C., Han, S., Appanna, V. P., Thomas, S. C., Ulibarri, G., Appanna, V. D. 2013. Metabolic reengineering invoked by microbial systems to decontaminate aluminum: implications for bioremediation technologies. *Biotechnology Advances*, 31(2), 266-273.
- [23] Amonette, J. E., Russell, C. K., Carosino, K. A., Robinson, N. L., Ho, J. T. 2003. Toxicity of Al to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4057-4066.
- [24] Ahluwalia, S. S., Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource technology*, 98(12), 2243-2257.
- [25] Martins, M., Taborda, R., Silva, G., Assunção, A., Matos, A. P., Costa, M. C. 2012. Aluminum and sulphate removal by a highly Al-resistant dissimilatory sulphate-reducing bacteria community. *Biodegradation*, 23(5), 693-703.
- [26] Varınca, K., Uçkun, M., Akkurt, Ş., Uçkun, A. A. 2021. *Ralstonia eutropha* H16 suşuyla sulu çözeltilerden kurşun ve bor biyogiderimi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 37(2), 314-322.
- [27] Boeris, P. S., del Rosario Agustín, M., Acevedo, D. F., Lucchesi, G. I. 2016. Biosorption of aluminum through the use of non-viable biomass of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology*, 236, 57-63.
- [28] Van der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A. J., Lyklema, J. 1997. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 9(1-2), 81-100.
- [29] Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., El Ghachtouli, N. 2013. Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-Life of Science*, 1, 289-320.

- [30] Ruiz, O. N., Alvarez, D., Gonzalez-Ruiz, G., & Torres, C. 2011. Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. *BMC biotechnology*, 11(1), 1-8.
- [31] Capdevila, M., & Atrian, S. 2011. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 977-989.
- [32] Palacios, Ö., Atrian, S., & Capdevila, M. 2011. Zn-and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins?. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 991-1009.
- [33] Richards, M. P., & Beattie, J. H. 1993. Characterization of metallothionein isoforms. Comparison of capillary zone electrophoresis with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 648(2), 459-468.
- [34] Minami, T., Ichida, S., Kubo, K. 2002. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 781(1-2), 303-311.
- [35] Kao, W. C., Chiu, Y. P., Chang, C. C., Chang, J. S. 2006. Localization effect on the metal biosorption capability of recombinant mammalian and fish metallothioneins in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 22(5), 1256-1264.
- [36] Anusha, P., Natarajan, D. 2020. Bioremediation potency of multi metal tolerant native bacteria *Bacillus cereus* isolated from bauxite mines, kolli hills, Tamilnadu-a lab to land approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101581.
- [37] Titah, H. S., Purwanti, I. F., Tangahu, B. V., Kurniawan, S. B., Imron, M. F., Abdullah, S. R. S., Ismail, N. I. 2019. Kinetics of aluminium removal by locally isolated *brochothrix thermosphacta* and *vibrio alginolyticus*. *Journal of Environmental Management*, 238, 194-200.
- [38] Uçkun, A. A., Uçkun, M., Akkurt, Ş. 2021. Efficiency of *Escherichia coli* Jm109 and genetical engineering strains (*E. coli* MT2, *E. coli* MT3) in cadmium removal from aqueous solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102024.
- [39] Akkurt, Ş., Oğuz, M., Alkan Uçkun, A. 2022. Bioreduction and bioremoval of hexavalent chromium by genetically engineered strains (*Escherichia coli* MT2A and *Escherichia coli* MT3). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 1-13.
- [40] Uçkun, A. A., Uçkun, M., Akkurt, Ş. 2021. Metallothionein Geni Klonlanmış Rekombinant *Escherichia Coli* Suşlarıyla Sulu Çözeltilerden Arsenik Biyogiderimi. *Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(14), 244-252.
- [41] Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., Farouk, A. 2013. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. *Journal of Mycology*, 2013, 1-8.
- [42] Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., de Oliveira Camargo, F. A., Gianello, C., Bento, F. M. 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 162-169.
- [43] Wu, X., Huang, P., Dong, C., Deng, X. 2021. Nickel bioaccumulation by a marine bacterium *Brevibacterium* sp.(X6) isolated from Shenzhen Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 170, 112656.
- [44] Ameen, F. A., Hamdan, A. M., El-Naggar, M. Y. 2020. Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- [45] Sharma, R., Jasrotia, T., Kumar, R., Kumar, R., Umar, A., Alharthi, F. A., Al-Zaqri, N. 2021. An insight into the mechanism of 'symbiotic-bioremoval' of heavy metal ions from synthetic and industrial samples using bacterial consortium. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101302.
- [46] Al-Gheethi, A. A. S. 2014. Screening of bacterial isolates from sewage treated effluent with potential to remove heavy metals and  $\beta$ -lactam antibiotics (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, Environmental Technology Division, School of Industrial Technology, University Science Malaysia. Penang, Malaysia).
- [47] Chaudhary, A., Shirodkar, S., Sharma, A. 2017. Characterization of nickel tolerant bacteria isolated from heavy metal polluted glass industry for its potential role in bioremediation. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26(2), 184-194.
- [48] Senoro, D. B., Godezano, J. B., Wan, M. W., Tayo, L. L., Sauli, Z., Aris, H. 2017. Effects of pH and concentration on the capability of *E. coli* and *S. epidermidis* with bentonite clay as biosorbent for the removal of Copper, Nickel and Lead from polluted water. *International Conference on Applied Photonics and Electronic*, August 9-10, Malaysia, 01081.
- [49] Deng, X., He, J., He, N. 2013. Comparative study on Ni<sup>2+</sup>-affinity transport of nickel/cobalt permeases (NiCoTs) and the potential of recombinant *Escherichia coli* for Ni<sup>2+</sup> bioaccumulation. *Bioresource technology*, 130, 69-74.
- [50] Kao, W. C., Huang, C. C., Chang, J. S. 2008. Biosorption of nickel, chromium and zinc by MerP-expressing recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 158(1), 100-106.
- [51] Sharma, B., Shukla, P. 2021. 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, 123285.
- [52] Huang, S., Xiaodong, W. A. N. G., Xu, L. I. U., Genhe, H. E., Jichun, W. U. 2018. Isolation, identification, and characterization of an aluminum-tolerant bacterium *Burkholderia* sp. SB1 from an acidic red soil. *Pedosphere*, 28(6), 905-912.

- [53] Abo-Amer, A. E., Ramadan, A. B., Abo-State, M., Abu-Gharbia, M. A., Ahmed, H. E. 2013. Biosorption of aluminum, cobalt, and copper ions by *Providencia rettgeri* isolated from wastewater. *Journal of Basic Microbiology*, 53(6), 477-488.
- [54] Fischer, J., Quentmeier, A., Gansel, S., Sabados, V., Friedrich, C. G. 2002. Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other acidophilic bacteria. *Archives of Microbiology*, 178(6), 554-558.
- [55] Illmer, P., Mutschlechner, W. 2004. Effect of temperature and pH on the toxicity of aluminium towards two new, soil born species of *Arthrobacter* sp. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(2), 98-105.