

AKÜ FEMÜBİD 19 (2019) 031001 (496-507)

AKU J. Sci. Eng. 19 (2019) 031001 (496-507)

DOI: 10.35414/akufemubid.530493

Araştırma Makalesi / Research Article

## Organize Sanayi Bölgesi (Uşak) Atıklarından Kurşun (Pb) Biyobirikimi Yapabilen Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Ferruh AŞÇI<sup>1</sup>, Gülderen UYSAL AKKUŞ<sup>2</sup>, Safiye Elif KORCAN<sup>3</sup>, Büşra AYDIN<sup>1</sup>, Gamze Kübra ÇETİN<sup>1</sup>, Nazife ALPASLAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar.

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Afyonkarahisar.

<sup>3</sup>Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Uşak.

Sorumlu yazar e-posta: f\_asci@aku.edu.tr  
guakkus@aku.edu.tr  
elif.korcan@usak.edu.tr  
cnkaya21@hotmail.com  
gamzekubra.ctn@gmail.com  
alpaslannazifenaz@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9367-6477>

Geliş Tarihi: 21.02.2019; Kabul Tarihi: 01.10.2019

### Öz

#### Anahtar kelimeler

Biyobirikim;  
Kurşun (Pb);  
Bakteri;  
16S rRNA

Bu çalışmada Uşak ili sınırları içinde bulunan Seramik fabrikası atık örneklerinden dökme plak yöntemi kullanılarak 16 bakteri izolatu elde edildi ve kurşun (Pb) birikimi yapabilen 6 bakterinin identifikasyonu yapıldı. İzolatların 16S rRNA sekans analizi yapıldı ve ağır metal birikimi yapabilen bakteriler tespit edildi; SAB2: %99 Enterobacter cancerogenus; Pantoea agglomerans; Enterobacter cloacae, ŞÇB9: %100 Bacillus mycooides; Bacillus cereus; Bacillus weihenstephanensis, SAB4: %99 Acinetobacter haemolyticus, SAB6: %100 Pseudomonas aeruginosa, SAB7:%100 Bacillus subtilis; Bacillus halotolerans; Bacillus mojavensis, SAB9: %100 Bacillus aryabhatai; Bacillus meqaterium. ICP analiz sonuçlarına göre Bacillus mycooides (% 57) ve Bacillus aryabhatai'nin (% 46) kurşun biyosorpsiyonu yapabildiği, ilk kez bu çalışma ile tespit edildi. FTIR analiz sonuçları, amin gruplarının biyosorpsiyonda etkin olduğunu göstermektedir.

## Isolation and Identification of Bacteria Capable of Bioaccumulation of Lead (Pb) from Organized Industrial Zone (Usak) Wastes

### Abstract

#### Keywords

Bioaccumulation;  
Lead (Pb);  
Bacteria;  
16S rRNA

In this study, 16 bacterial isolates were obtained by using pour plate method from ceramic factory waste samples located in Uşak province. The identification of 6 bacteria capable of lead (Pb) accumulation was performed. 16S rRNA sequence analysis of the isolates were performed and bacteria capable of heavy metal accumulation were detected; SAB2: %99 Enterobacter cancerogenus; Pantoea agglomerans; Enterobacter cloacae, ŞÇB9: %100 Bacillus mycooides; Bacillus cereus; Bacillus weihenstephanensis, SAB4: %99 Acinetobacter haemolyticus, SAB6: %100 Pseudomonas aeruginosa, SAB7:%100 Bacillus subtilis; Bacillus halotolerans; Bacillus mojavensis, SAB9: %100 Bacillus aryabhatai, Bacillus meqaterium. According to ICP analysis results, for the first time, Bacillus mycooides (57%) and Bacillus aryabhatai (46%) were found to be capable of lead biosorption. FTIR analysis results show that amine groups are effective in biosorption.

## 1. Giriş

Ağır metaller içerisinde yer alan kurşun, özellikle endüstriyel atıklarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kurşun, yüksek toksisiteye sahiptir. Özellikle kurşun içeren endüstriyel atıkların kontrolsüz doğaya salınımı kurşunun ekosistemde birikimine ve yayılımına neden olarak ekosistemde var olan canlılar için büyük risk oluşturmaktadır. Ayrıca organizmada birçok enzim ile etkileşime girer. Eğer kanda belirli bir düzeye ulaşırsa karaciğer, böbrek özellikle de kemik ve dişlerde birikmekte ve kalsiyumun yerine apatitin yapısına girmektedir. Kurşunun kanda yarılanma ömrü 20-40, kemiklerde ise 10 yıldır. Yarı ömrünün uzun olması nedeniyle kurşun kirliliğinin yoğun olduğu yerlerde yaşayan insanlarda yaş ilerlemesine bağlı olarak vücuttaki kurşun miktarı da artmaktadır (Özbek vd. 1993). Kurşun (Pb) kontamine toprakta yetişen bitkilerde çeşitli klorozlar kök ve kök üstü organlarda büyüme zararları görülür. Topraktaki kurşun miktarı 1-200 µg/g arasında olup nehir, yağmur ve kar sularıyla yeryüzü sularına ya da topraktan sızma suretiyle yer altı sularına karışabilmektedir. Ayrıca bitkiler tarafından alınmak suretiyle gıdalarda da birikebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kloke vd. 1984; Blume and Hellriegel 1981).

Son yıllarda Pb'nin yol açtığı toprak kirliliği tüm dünyanın ortak problemi haline gelmiştir (Başkaya ve Kocaer 2003; Heil vd. 1999). Kirlenmiş toprakların temizlenmesi amacıyla kimyasal arıtım, toprak yıkama, elektrokinetik arıtım, biyoremediasyon ve fitoremediasyon gibi bazı iyileştirme teknikleri geliştirilmiştir (Moutsatsou vd. 2006). Bu nedenle Pb'un biyoremediasyonu için büyük çaba harcanmaktadır.

Biyoremediasyon, kirleticileri ortadan kaldırmak için mikroorganizma metabolizmasının kullanılmasıdır. Bakterileri de içeren doğal mikrobik suşlar, gelişimleri ve metabolizmaları üzerinde herhangi bir etki yaratmadan çok yüksek düzeylerde korunmaya devam etmek için çeşitli koruyucu mekanizmalar kullanırlar. Yüksek konsantrasyonlarda kurşuna direnmek için effluks mekanizmaları, hücre dışı sekretasyon, biyosorpsiyon, çökeltme, hücre morfolojisindeki değişiklik, gelişmiş siderofor

üretimi ve hücre içi biyoakümüasyonu gibi çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir (Nies 1999; Naik and Dubey 2013). Bu durum, benzersiz özelliklere sahip olan bakteri suşlarının kurşunla kirlenmiş çevresel alanların biyoremediasyonunda ideal bir teknik olduğunu kanıtlamaktadır.

Biyobirikim, bir ortamda çözünmüş bileşenlerin canlı hücrelerin içinde kontrollü bir şekilde hücre zarından geçmek suretiyle birikmesidir (Açikel 2003). Mikroorganizmalarda metal taşıma mekanizması hücre zarı üzerindeki elektrokimyasal gradientlerle ilişkilidir (Garnham vd. 1992). Mikrobiyal biyobirikimde metaller ilk aşamada iyon değişimi veya fiziksel adsorpsiyon ile hızlı bir şekilde hücre yüzeyinde toplanmaktadır. Daha sonra hücre zarından metabolizmaya bağlı olarak hücre içerisine alınmaktadır. Membranda bulunan tiyollerin, metallerin aktif taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir. Hücre içinde bulunan metallothionein proteinleri, metalleri şelatlanarak detoksifiye eder (Srinath vd. 2002; Mejare and Bulow 2001).

*Streptomyces*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi mikroorganizmalar kontamine sulardaki metalleri akümüle edebilirler. Günümüzde bu amaçla *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Rhodococcus* ve *Sphingomonas* aktif olarak kullanılan türlerdir (Roychowdhury vd. 2019). Toksik metallerle dirençli mikroorganizmalar kontamine sularda biyotoplayıcı olarak kullanılabilir. Bu nedenle bu tür izolatların belirlenmesi hem ekolojik hem de ekonomik açıdan büyük önem taşır. Bu çalışmada Organize Sanayi Bölgesi (Uşak) seramik çamuru (SÇ) ve seramik atıklarından (SA) Pb biyobirikimi yapabilen metal dirençli bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonun yapılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1 Organize Sanayi Bölgesi (Uşak) Atık Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve Kurşun Tuzlarına Dirençli İzolatların Belirlenmesi

Seramik fabrikası atık örneklerinden Dökme Plak Yöntemi kullanılarak mikroorganizma izolasyonu yapıldı. Besiyeri olarak Nutrient Agar (NA) ve Plate Count Agar (PCA) kullanıldı. İnokülasyon sonrası 37°C 48 saat, inkübasyona bırakılarak plaklarda oluşan kolonilerin saf kültürleri metal direnci deneylerinde kullanıldı. İzolatlar Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'ın 0.0125-10 ppm konsantrasyon aralığında agar ortama eklenerek (nişasta 3 g L<sup>-1</sup>, malt ektrat 15 g L<sup>-1</sup> ve agar 20 g L<sup>-1</sup>) 37±2°C'de, 2 gün inkübasyonun ardından ağır metal içermeyen ve farklı konsantrasyonlarda ağır metal tuzları içeren plaklardaki bakteriyel gelişim değerlendirilmiştir.

## 2.2 İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

### DNA izolasyonu

DNA izolasyonu (High Pure PCR Template Preparation) kiti ile gerçekleştirildi. 1,5 ml'lik ependorf tüplere 200 µl su ya da fosfat tamponu (PBS) içine koloniden pipet ucu ile örnek alındı. 500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve 200 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek örnekler çalışma için hazırlandı. Üzerine 5 µl litikaz eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 200 µl bağlama tamponu ve 40 µl proteinaz K eklenerek 10 dk 72°C'de inkübasyona bırakıldı. DNA'yı çöktürmek için karışıma 100 µl isopropanol ilave edildi. Karışım tüplere aktarıldı ve 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamanın ardından filtrelili tüpler değiştirilerek tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu (IRB) eklenerek 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Filtrelili tüp tekrar yeni bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu (WB) eklendi ve 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşama 500 µl WB ilavesi ile tekrarlandı. Ardından tüpteki sıvı dökülüp 13000x g'de 10 saniye santrifüj yapılarak filtrelili tüpler 72oC'de bekleyen elüsyon tamponu (EB) dan 200 µl eklenerek 1,5 ml'lik ependorflara alındı. 8000x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

### DNA Saflık Kontrolü

Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak Thermo

Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla 1,5 µl DNA örneğinin A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> oranı hesaplandı.

### PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

16S rRNA gen fragmentinin amplifikasyonu evrensel primerler kullanılarak Taq DNA Polimeraz Kiti (HelixAmp™) ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon tüpüne eklenecek bileşenler ve reaksiyon basamakları kit içeriğine göre düzenlenmiş olup (Çizelge 1)'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 1. PZR bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktarı
Kalıp DNA	5µl
10X TaqBuffer	5µl
D9NTP	1µl
Primer – F	1µl
Primer – R	1µl
5X TuneUpBuffer	10µl
TaqPolimeraz	1,25 unit
Su	50µl'ye tamamlandı

Tüm moleküler analizler boyunca Internal Transcribed Spacer (ITS) geninin çoğaltılması için kullanılan koşullar (Çizelge 2)'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 16S rRNAgeninin PZR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk denatürasyon	1	2dk	95°C
Denatürasyon		20sn	95°C
Annealing	35	40sn	55 °C
Elongasyon		1dk 30sn	72°C
Son Uzama	1	5dk	72°C
Soğutma		Sınırsız	4°C

### Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, 2,5 µl GelRed'li %1 agaroz (Sigma) içeren mini jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1xTBE tamponu kullanıldı. 2 µl DNA solüsyonu, 1 µl yükleme boya solüsyonu ve 3 µl su ile karışımı hazırlanarak 90 V'da 60 dk süreyle yürütüldü. Elektroforezde, DNA markerı olarak fermentas DNA Ladder kullanıldı.

### İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) ile Pb Biyosorpsiyonunun Belirlenmesi

Biyosorpsiyon çalışması için kullanılacak bütün cam malzemeler %5' lik nitrik asitle yaklaşık 5 saat

bekletilerek ardından distile suda ile bir gece boyunca bekletildi. Kullanmadan önce etüvde kurutuldu (Moore 2007). İzolatlar biyosorpsiyon çalışmasında kullanılmadan önce 100 ml NB besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere ekimleri yapıldı ve gelişmeleri için çalkalamalı inkübatörde (125rpm) 27°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra biyomas steril filtre kağıtlarından süzülerek. Süzülen biyomas steril distile suyla besiyeri kalıntısı olmaması için yıkandı. Biyomaslar 2,5 g tartılarak erlenlere konularak. Biyomas ve 100 ppm konsantrasyonda Pb bulunan erlenler 25 °C' de 125 rpm' de çalkalamalı etüvde biyosorpsiyon için bırakıldı. Belirli zaman aralıklarında analiz için ağır metal solüsyonları alındı. Metal solüsyonunun biyomastan ayrılması için 8000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Ayrılan ağır metal kısmı (sıvı kısım) falkonlara konularak ICP-OES cihazında analiz edildi.

Ağır metal konsantrasyon verilerine göre (ICP analizi sonuçları) yüzde (%) olarak biyosorpsiyon verilen formüle göre hesaplandı;

$$R = (P_0 - P_e / P_0) \times 100$$

R = Yüzde (%) biyosorpsiyon

P<sub>0</sub> = Metal iyonları başlangıç konsantrasyonu (mg/lt)

P<sub>e</sub> = Metal iyonlarının kalan konsantrasyonu (mg/lt) (Amini et al. 2008)

### Fourier Transform Infrared spektroskopisi (FTIR) Analizi

Biyokütle oda sıcaklığında vakumla buharlaştırıcı ile kurutulduktan sonra. 100 mg KBr içinde yaklaşık 1 mg biyokütle kapsüllendi ve Fourier Transform Infrared spektroskopisi (Perkin Elmer Spektrum 100) ile analiz edildi.

### 3. Bulgular

Seramik fabrikası; Seramik Çamuru (SÇ) ve Seramik Atıkları (SA) örneklerindeki toplam mezofilik bakteri

sayısı (Çizelge 3)' de verilmiştir. SA ve SÇ'den yapılan ekimlerde en fazla mikroorganizma NA besiyerinde elde edilmiştir. Besiyerindeki koloni morfolojisine bakılarak birbirine benzemeyen koloniler seçilmiş ve bundan sonraki denemelerde kullanılmıştır. 18 izolatin 0.0125 ila 10mM konsantrasyon aralığında kurşun içeren ortamda üreyebildiği saptanmıştır (Çizelge 4). Bazı izolatların

(SÇB3,5 ve SAB2) yüksek Pb konsantrasyonunda üremesi ancak düşük Pb konsantrasyonlarında ürememiş olması ekim hatalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Çizelge 3.** Seramik fabrikası; Seramik Çamuru (SÇ) ve Seramik Atıkları (SA) örneklerinin 1ml'sinde bulunan mikroorganizma sayısı

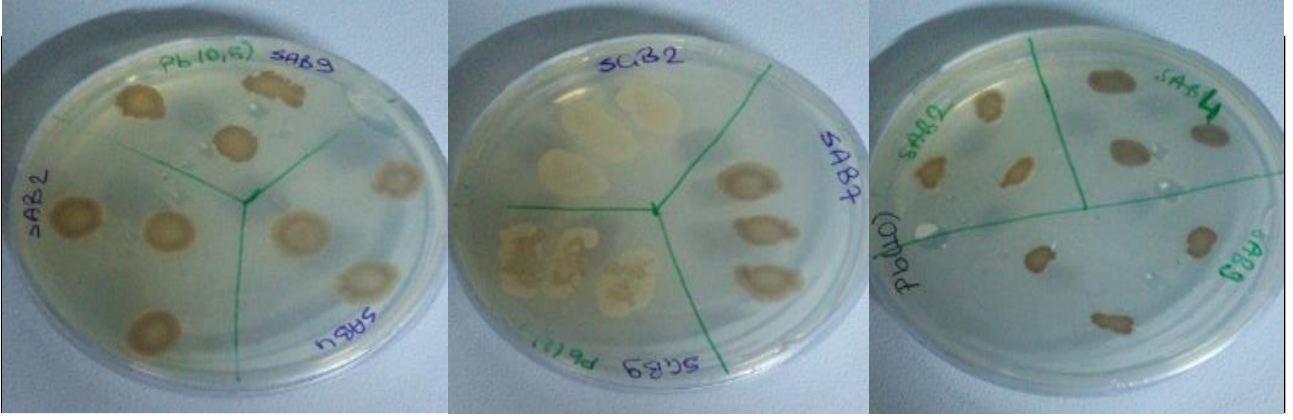
Besiyeri	CFU/ml	
	SÇ	SA
PCA	8.0x10 <sup>3</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>
NA	8.0x10 <sup>4</sup>	2.9x10 <sup>7</sup>

**Çizelge 4.** 0.0125 ile 10mM konsantrasyon aralığında kurşun içeren ortamda üreyebilen izolatlar.

	Kontrol	Pb(10)	Pb(5)	Pb(2,5)	Pb(2)	Pb(1,5)	Pb(1)	Pb(0,5)	Pb(0,0125)
SAB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB2	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SAB3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAB9	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SÇB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SÇB2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SÇB3	+	-	+	+	-	+	+	-	-
SÇB4	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SÇB5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SÇB6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SÇB7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SÇB8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SÇB9	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SÇB: Seramik çamurundan izole edilen bakteri

SAB: Seramik atığından izole edilen bakteri



Şekil 1. Biyosorbant izolatların makroskobik morfolojileri

Pb içeren ortamda koloni renginin kahverengiye dönmesi kurşunun biyosorbsiyonunun yapıldığını göstermektedir. Bu çalışmada 6 izolatın (SAB2, SAB4, SAB6, SAB7, SAB9 ve SÇB9) biyosorbsiyon yapabildiği kültür ortamında koloni renk değişimi ile saptanmıştır (Şekil 1). 16S rRNA dizi analizi sonucunda; SAB2: %99 *Enterobacter cancerogenus*; *Pantoea agglomerans*;

*Enterobacter cloacae*, SÇB9: %100 *Bacillus mycoides*; *Bacillus cereus*; *Bacillus weihenstephanensis*, SAB4: %99 *Acinetobacter haemolyticus*, SAB6: %100 *Pseudomonas aeruginosa*, SAB7:%100 *Bacillus subtilis*; *Bacillus halotolerans*; *Bacillus mojavensis*, SAB9: %100 *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus megaterium* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 5. Blast (BLAST) analizi sonucunda izolatın türü

Blast Analizi sonucunda izolatin türü	Dizi
<p><b>SAB2: %99 <i>Enterobacter cancerogenus</i>;</b></p> <p><b><i>Pantoea agglomerans</i>;</b></p> <p><b><i>Enterobacter cloacae</i></b></p>	<p>TCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGAT  AACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCG  GGCCTTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAAACGGCTCACCT  AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTC  CAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC  CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTG  TTGTGGTTAATAACRCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCC  AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC  GCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGAACTGCATTCGAAA  CTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGGCGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGC  GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGGA  CTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCTGGG  GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGC  ATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAATTASC  AGAGATGSWTTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGT  GTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTY  MGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCA  AGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAG  CGACCTCGCGAGCAAGCGGACCTATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC  TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC  CGGGCCTTGATACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTA</p>
<p><b>SCB5: %100 <i>Bacillus mycoides</i>;</b></p> <p><b><i>Bacillus cereus</i>;</b></p> <p><b><i>Bacillus weihenstephanensis</i></b></p>	<p>GAAGTTAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCATAAGACTGGGATAACT  CCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAATTTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGCG  GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTGGTGAGGTAACGGCTC  ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  GGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAA  CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTACCGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTA  CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGTGTCAT  TGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTTGAAAT  GCGTAGAGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTG  AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGA  TGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCGGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCTAAGCACTCCG  CCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCG  GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTG  AAAACCTAGAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT  CAGCTCGTGTGATGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTAGTTGC  CATCATTAAAGTTGGGCACTAAGGTGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  ACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG  AGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGAGGCT  GCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATA  CGTTCCCGGCTTGTACACCCGCC</p>
<p><b>SAB4: %99 <i>Acinetobacter haemolyticus</i></b></p>	<p>AGTGTAGCTTGTACATTACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATT  AGTGGGGACAACATCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAG  GGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  AGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTG  AGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGSGGAASC  CTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAGACACTTAAAGCGAGG  AGGAGGCTACTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGAGAATAAGCACCAGGCT  AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCG  TAAAGCGTGCCTAGGCGGCTGATTAAGTGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACCTAGGAATT  GCATTCGATACTGGTACGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATT</p>

**SAB6: %100 *Pseudomonas aeruginosa***

AGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAT  
CTGCCTGGTAGTGGGGATAACGTCCGAAACGGGGCCTAATACCGCATACGCTCTGAGGG  
AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG  
GTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA  
CTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGAGTGGGGAATATTGGACAATG  
GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTT  
TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAG  
CACCGGTAACCTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATT  
ACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC  
CTGGGAACGATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGCTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACCCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTG  
ATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGG  
ATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGCCTT  
GACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACGAGACAGGTGCTGC  
ATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTT  
GTCCTTAGTTACCAGCACTCGGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG  
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTATCATGCCCCTTACGGCCAGGGTACACACGTGCTACAAT  
GGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTC  
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAT  
GTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTG  
CTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGC

**SAB7: %100 *Bacillus subtilis*;**

***Bacillus halotolerans*;**

***Bacillus mojavensis***

TTGCTCCCTGATGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG  
GGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACAT  
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC  
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAA  
GTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAG  
GGAAGAACAAGTACCCTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGG  
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG  
AGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA  
AGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTTGAC  
ATCCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATG  
GTTGTCGTGACTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGGAT  
TTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAGTGTACAAATGGACA  
GAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAATCTGTTCTCAGTTCCGGAT  
CGCAGTCTGCAACTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGCT

TGCAGTCGAGCGACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC  
 ACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAG  
 GATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCG  
 CGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGA  
 GAGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
 GGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTT  
 TCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTA ACTGCTCGTACCTTGA  
 CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGGAACTGGGAACTTGTAGTGCAGAAGAGA  
 AAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGA  
 AGGGCGCTTTTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT  
 AGATACCTGTTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTT  
 AGTGCTGCAGTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCA  
 AAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGA  
 AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGACA ACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTCCCTCGGGGG  
 ACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTGGCAGCATTTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGC  
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG  
 CTACACAGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGGAGTCAAGCAATCC  
 ATAAAACATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAG  
 TAATCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTAC  
 ACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGG

SAB9: %100 *Bacillus aryabhatai*;

*Bacillus megaterium*

16S rRNA dizi analizi sonucunda SAB2: %99 *Enterobacter cancerogenus*; *Pantoea agglomerans*; *Enterobacter cloacae*, SÇB9: %100 *Bacillus mycoides*; *Bacillus cereus*; *Bacillus weihenstephanensis*, SAB4: %99 *Acinetobacter haemolyticus*, SAB6: %100 *Pseudomonas aeruginosa*, SAB7: %100 *Bacillus subtilis*; *Bacillus halotolerans*; *Bacillus mojavensis*, SAB9: %100 *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus megaterium* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 5).

ICP sonucuna göre, *Bacillus mycoides* 82. saatte (%57), *Bacillus aryabhatai* ise 72. saatte (%46) maksimum % biyosorpsiyon gerçekleştirmiştir (Çizelge 6).

Bu çalışmada FTIR analizi sonuçta, kurşunun biyosorpsiyonu ile ilgili olarak fonksiyonel gruplar arasındaki fark belirlenmiştir. Kurşun yüklü mikrobiyal biyokütlenin absorpsiyon spektrumu, kontrol biyokütle ile karşılaştırıldığında, amid gruplarında absorpsiyon bandı (1700-1500 m) değişikliği görülmüştür.

Çizelge 6. 100 ppm Kurşun konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları (%BS)

Zaman (saat)	<i>Bacillus mycoides</i>		<i>Bacillus aryabhatai</i>	
	ICP	% BS	ICP	%BS
2	97	3	93	7
5	93	7	95	5
10	82	18	78	22
15	88	12	73	27
20	79	21	68	32
25	72	28	72	28
30	66	34	62	38
35	65	35	65	35
40	65	35	52	48
45	58	42	53	47
50	52	48	55	45
55	47	53	54	46
60	47	53	58	42
65	55	45	53	48
70	42	58	54	46
75	45	55	54	46
80	43	57	-	-
85	43	57	-	-



#### 4. Tartışma ve Sonuç

Biyobirikimi sağlayan metalotiyoneinler, toksik ağır metallerin immobilizasyonunda önemli bir rol oynamakla birlikte ayrıca enzimler tarafından katalize edilen bakteriyel metabolik süreçleri korurlar. (Blindauer vd. 2002; Liu vd. 2003). Bazı siyanobakteriyel, *Synechococcus* PCC 7942 (SmtA), *Anabaena* PCC 7120 (SmtA), *Oscillatoria brevis* (BmtA), *Pseudomonas aeruginosa* (BmtA) ve *Pseudomonas putida* (BmtA) izolatlarının sitozolik metal homeostazisini muhafaza etmek için metalotiyoneinlerin kodladığı bildirilmiştir (Blindauer vd. 2002; Turner vd. 1996). Kurşuna maruz kalan *Pseudomonas fluorescens*'da (Sharma et al., 2006), *P. aeruginosa* (Naik vd. 2012), *Bacillus megaterium*'da kurşun direncinden sorumlu metalotiyonein (Roane 1999) gösterilmiştir. *Salmonella choleraesuis* suşu 4A ve *Proteus penneri* suşu GM10'da hücre içi biyoakümüülasyonunu sağlayan kurşun direncinden sorumlu metal bağlayıcı metalotiyonein smtAB genlerinin (507 bp) varlığını ortaya çıkardı (Naik vd. 2012). *B. megaterium*, *P. aeruginosa* suşu WI-1, *S. Choleraesuis* suşu 4A ve *P. penneri* suşu GM10, çok yüksek miktarda kurşunun biyolojik olarak biriktirilebilmesini mümkün kılan, kontamine çevre bölgelerinde bulunan kurşunun biyoremediasyonu için kullanılabilir (Roane 1999).

Biyoremediasyon süreçleri ekonomiktir, çevre dostu ve kontamine çevre bölgelerinden gelen ağır metallerin giderilmesi için fizikokimyasal yöntemlerle kıyaslandığında oldukça verimlidir. Son yıllarda araştırmacılar kurşun biyoremediasyonunda biyoteknolojik ajanlar olarak mikroorganizmaları kullanmaya odaklanmıştı. Bunun nedeni pahalı ve zahmetli kimyasal analiz yöntemlerinin aksine, genlerin füzyonu ile geliştirilen bakteriyel biyo-taşıyıcıların nispeten ucuz, kullanımı kolay, kurşuna özel ve kurşun nanomollerini algılayabilir olmalarıdır.

Bu çalışmada SAB2 izolatı *Enterobacter cancerogenus*; *Pantoea agglomerans*; *Enterobacter cloacae*, bir izolat (SAB4) *Acinetobacter haemolyticus*, bir izolat (SAB6)

*Pseudomonas aeruginosa*, üç izolat ise *Bacillus* sp. [(SÇB9) *Bacillus mycoides*; *Bacillus cereus*; *Bacillus weihenstephanensis*, (SAB7) *Bacillus subtilis*; *Bacillus halotolerans*; *Bacillus mojavensis*, (SAB9) *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus megaterium*] olarak identifiye edilmiştir (Çizelge 5).

Kurşun kirli atıksulardan *Pseudomonas* sp., *Chryseomonasluteola*, *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* gibi bakteri kullanarak kurşunun uzaklaştırılması birkaç yazar tarafından bildirilmiştir (Leung vd 2000, Azza vd 2009).Ancak yaptığımız literatür çalışmaları sonucu *Bacillus mycoides* ve *Bacillus aryabhatai* nın Pb biosorpsiyonu yaptığı üzerine hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle ICP ve FTIR çalışmaları bu iki *Bacillus* türünde yapılmıştır.

*Bacillus mycoides* 82. Saatte (%57), *Bacillus aryabhatai* 72. Saatte (%46) maksimum %biyosorpsiyon gerçekleştirdiği saptanmıştır. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Arifiyanto vd (2016) *Bacillus* izolatlarının (S1, S11) sırasıyla 53% ve 51%Pb biyosorpsiyon yapabildiklerini bildirmişlerdir.

Biyosorpsiyon, ayrıca ekzopolisakkaritlerin bakteri hücre yüzeyinde ağır metallerin şelatörü olarak da rol oynadığı bir mekanizmaydı. Bakteriyel hücrenin duvarında, fosforil (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), karboksil (COO<sup>-</sup>), sülfhidril, tiyol (-SH) ve hidroksil (-OH) gibi negatif yükü içeren grupları bol miktarda bulunur ve bu gruplar ile metal iyonlarını bağlayabilirler etkileşimleri oluşabilir (Murthy vd, 2011)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, karboksil, amin, hidroksil, fosfat ve sülfhidril grupları gibi bazı anyonik hücre yüzey ligandlarının biyosorbent olarak hem canlı hem de ölü bakteri biyokütlesini kullanarak Pb gibi katyonik metal iyonunun aktif veya pasif biyo-emiliminde kullanılabileceğine dikkat çekmektedir (Murthy vd. 2012).

Bu çalışmada FTIR analizi sonuçta kurşun yüklü mikrobiyal biyokütlenin absorpsiyon spektrumu, kontrol biyokütle ile karşılaştırıldığında, amid gruplarında absorpsiyon bandı değişikliği görülmüştür. Bu nedenle biyosorpsiyonda amin gruplarının etkin olduğu düşünülmektedir.

Çok yüksek oranda bakteriyel metalotiyonein (BmtA) eksprese eden genetik olarak modifiye edilmiş bakteriler (GMB), kurşunla yüksek oranda kirlenmiş olan çevre bölgelerini biyolojik iyileştirmede kullanılabilir. Bu hiper metal biriktirici bakteriler, metal biyoyararlanımını azaltarak metal homoestazisini korurlar. Hücre yüzey proteinleri ile füzyon, hücre yüzeyinde metalotiyoneinlerin ekspresyonu bakterilerin biyoakümülyasyon kapasitesini birkaç kat artırabilir. Bakteriyel suşlar, hücre yüzeyinde veya EPS ve biyosümfaktanlar gibi mikrobiyal ürünler üzerinde yüksek seviyelerde toksik kurşunun biyosorbsiyonu için yüksek seviyelerde metal bağlama ligandları, örneğin karboksil, hidroksil, sülfat, fosfat ve amin eksprese etmek üzere genetik olarak tasarlanabilir. Ağır metal biyoremediasyonunun etkinliği rekombinant mikroorganizmaların uygulanmasıyla üç ila altı kat arttırılabilir (Srivastava and Majumber 2008).

Bir başka yaklaşım, yüksek seviyelerde dirençlere direnç gösterebilen mikrobiyal konsorsiyum kullanılarak endüstriyel atıklardan kurşun çıkarmaya yönelik paketlenmiş yataklı reaktörlerin tasarlanması ve geliştirilmesi olabilir.

Bu çalışmada *Bacillus mycoides* ve *Bacillus aryabhatai* 'nın Pb biosorbsiyonu yapabildiği ICP ile ilk defa gösterilmiştir. Sonuç olarak kurşun akümüle ettiği saptanan bu izolatların bakteriyel metalotiyonein ekspresyon koşullarının optimizasyonu ile ilgili çalışmaların yapılması hem endüstriyel atıklardan kurşunun yeniden kazanımı için hem de biyoremediasyon uygulamalarında kullanımında büyük faydalar sağlayabilir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında yürütülen 17.Kariyer. 98 projesi ile desteklenmiştir.

### **5.KAYNAKÇA**

Açikel, U., 2003. Melas katılan ve ağır metal kirliliği içeren atıksularda çeşitli türdeki maya hücrelerinin büyüme kinetiğinin ve hücrelerdeki metal biyobirikiminin

irdelenmesi. Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara. 202.

Amini, M., Younesi ,H., Bahramifar, N., Lorestani, A.A.Z., Ghorbani, F., Daneshi, A., Sharifzadeh, M., 2008. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Lead Biosorption in An Aqueous Solution by *Aspergillus niger*, *Journal of Hazardous Materials*, **154**, 694-702.

Arifiyanto, A., Apriyanti, F. D., Purwaningsih, P., Kalqutny, S. H., 2016. Lead (Pb) bioaccumulation; genera *Bacillus* isolate S1 and SS19 as a case study. *Proceeding Of International Biology Conference Biodiversity and Biotechnology for Human Welfare* DOI: 10.1063/1.4985394

Azza, A. A., Wesam, A. H., Hedayat, M. S., Ghada, A. F., 2009. Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*, **5**, 372-383.

Başkaya, H. ve Kocaer, O. 2003. Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, **8**, 121-130.

Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W., Sadler, P. J. and Robinson, N. J., 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Molecular microbiology*, **45**, 1421-1432.

Blume, H. P., and Hellriegel, T., 1981. Blei-und Cadmium-Status Berliner Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **144**, 181-196.

Garnham, G. W., Codd, G. A. and Gadd, G. M., 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the

- estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**, 270-276.
- Heil, D. M., Samani, Z., Hanson, A. T. and Rudd, soil by EDTA. I. Batch and column studies. *Water, Air, and Soil Pollution*, **113**, 77-95.
- Kloke, A., Sauerbeck, D. R. and Vetter, H., 1984. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. *In Changing metal cycles and human health*, 113-141.
- Leung, W.C., Wong, M.F., Chua, H., Co, W., Yu, P.H.F., Leung, C.K., 2000. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water Science and Technology*, **41**, 233-240.
- Liu, T., Nakashima, S., Hirose, K., Uemura, Y., Shibasaki, M., Katsuhara, M. and Kasamo, K., 2003. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous Cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS letters*, **542**, 159-163.
- Mejáre, M. and Bülow, L., 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *TRENDS in Biotechnology*, **19**, 67-73.
- Moutsatsou, A., Gregou, M., Matsas, D. and Protonotarios, V., 2006. Washing as a remediation technology applicable in soils heavily polluted by mining–metallurgical activities. *Chemosphere*, **63**, 1632-1640.
- Moore, B.A., Duncan, J.R., Burgess, J.E., 2007, “Fungal Bioaccumulation of Copper, Nickel, Gold and Plantinum, *Minerals Engineering*, **21**, 1-6.
- Murthy, S., Geetha, B., Sarangi, SK., 2011. Effect of lead on metallothionein concentration in leadresistant bacteria *Bacillus cereus* isolated from industrial Effluent. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 15966-1597.
- Murthy, S., Geetha, B., and Sarangi, SK., 2012. Biosorption of lead by *Bacillus cereus* isolated from industrial effluents. *British Biotechnology Journal*, **2**, 73-84, 2012.
- Naik, M. M., Shamim, K. and Dubey, S. K., 2012. Biological characterization of lead-resistant bacteria to explore role of bacterial metallothionein in lead resistance. *Current Science*, 426-429.
- Naik, M. M. and Dubey, S. K., 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **98**, 1-7.
- Nies, D. H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, **51**, 730-750.
- Özbek H., Kaya Z., Gök M. ve Kaptan, H., 1993. Toprak Bilimi. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Genel Yayın, 585-592.
- Roane, T. M., 1999. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal–contaminated soils. *Microbial Ecology*, **37**, 218-224.
- Roychowdhury, R., Roy, M., Zaman, S., Mitra, A., 2019, Bioremediation potential of microbes towards heavy metal contamination, *IJRAR*, **6**, 1088-1092.
- Sharma, S., Sundaram, C. S., Luthra, P. M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R. and Gade, W. N., 2006. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology*, **126**, 374-382.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W. and Garg, S. K., 2002. Chromium (VI) biosorption and

bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, **48**, 427-435.

Srivastava, N. K. and Majumder, C. B., 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, **151**, 1-8.

Turner, J. S., Glands, P. D., Samson, A. C. and Robinson, N. J., 1996. Zn<sup>2+</sup>-sensing by the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: different motifs mediate metal-induced protein-DNA dissociation. *Nucleic Acids Research*, **24**, 3714-3721.