

METALLOTİYONEİN GENİ KLONLANMIŞ REKOMBİNANT *Escherichia coli* SUŞLARIYLA SULU ÇÖZELTİLERDEN ARSENİK BİYOGİDERİMİ

Aysel ALKAN UÇKUN^{1*}, Miraç UÇKUN², Şeyma AKKURT³

¹⁻³Adiyaman Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Adiyaman, 02040, Türkiye

²Adiyaman Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adiyaman, 02040, Türkiye

Geliş tarihi: 02.06.2021 Kabul tarihi: 13.06.2021

ÖZET

Bu çalışmada, insan metalloproteinlerinden hMT2 ve hMT3'ün sulu çözeltilerden arsenik (As) giderme kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu genler konakçı *Escherichia coli* Jm109 suşuna klonlanmış, elde edilen rekombinant suşlarla yabancıl suşun sulu çözeltilerden As biyogiderim oranları kıyaslanmıştır. 24 saat boyunca suşlara 0,01 ppm, 0,1 ppm ve 1 ppm konsantrasyonlarında As uygulanmıştır. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICP-MS) sonuçlarından, hücrelerinde en fazla As biriktiren suşun *E. coli* MT3 olduğu ve en fazla 0,01 ppm As konsantrasyonunda birikim yaptığı (%82 oranında) saptanmıştır. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntülerinden, As ile muamele edilmiş suşların hücre yüzeylerinin kontrol suşuna kıyasla daha fazla zarar gördüğü belirlenmiş, enerji dağılımı spektrumlarından (EDS) da As varlığı kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, *E. coli* MT3 suşunun hem *E. coli* Jm109 hem de *E. coli* MT2 suşuna göre daha fazla As absorbe ettiği, dolayısıyla MT3 geninin/proteinin sulardan As giderilmesinde etkili bir biyoremediyal araç olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Biyosorpsiyon, E.coli Jm109, Genetiği değiştirilmiş bakteri, Metallothionein, Sulardan Arsenik giderimi*

BIOREMOVAL of ARSENIC from AQUEOUS SOLUTIONS with METALLOTHIONEIN GENE CLONED RECOMBINANT *Escherichia coli* STRAINS

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the arsenic (As) removal capacity of human metalloproteins hMT2 and hMT3 from aqueous solutions. These genes were cloned into the host *Escherichia coli* Jm109 strain, and the bioremoval rates of As from aqueous solutions of the obtained recombinant strains and the wild strain were compared. As concentrations of 0,01 ppm, 0,1 ppm and 1 ppm were applied to the strains for 24 hours. From the inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) results, it was determined that the strain which accumulated the most As in its cells was *E. coli* MT3, and it accumulated the most at 0,01 ppm As concentration (82%). From the scanning electron microscope (SEM) images, it was determined that the cell surfaces of the As-treated strains were more damaged than the control strain, and the presence of As was proven from the energy distribution spectra (EDS). In conclusion, it can be said that the *E. coli* MT3 strain absorbs more As compared to both *E. coli* Jm109 and *E. coli* MT2 strains, so the MT3 gene/protein can be used as an effective bioremedial tool for As removal from water.

Keywords: *Biosorption, E.coli Jm109, Genetical engineering bacteria, Metallothionein, Arsenic removal from water*

e-posta¹: ayseluckun@gmail.com ORCID ID: <https://orcid.org/0000-00028957-7476> (Sorumlu Yazar)

e-posta²: miracuckun@gmail.com ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9018-8515>

e-posta³: sakkurt@adiyaman.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0135-1975>

1. Giriş

Arsenik (As), havada, suda ve torakta yaygın olarak bulunan doğal bir metaloiddir [1]. As, yerkürede en çok bulunan 20. elementtir ve periyodik tablonun V. grubunda yer almaktadır [2]. İçme suyu ve tarım arazilerinde As kontaminasyonu küresel bir sorundur. Jeojenik ve antropojenik kaynaklardan As doğaya yayılmaktadır. Ayrıca As, pestisitler, ahşap koruyucular, madencilik ve eritme işlemleri gibi insan faaliyetleri sonucunda oluşmaktadır [3]. As, kirlenmiş toprakta ve suda genel olarak arsenit As(III) ve arsenat As(V) formlarında bulunmaktadır. Arsenik formlarının toksisitesi oksidasyon durumlarına ve kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca, As(III)'in toksisitesi As(V)'tan 60 kat daha yüksektir ve kanserlere, kardiyovasküler ve solunum yolu hastalıklarına neden olmaktadır [4]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından içme suyunda izin verilen As sınır değeri 10 µg/L olarak belirlenmiştir [5]. Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği'nde ise, içme suyunda izin verilen arsenik sınır değeri 10 µg/L'dir. Bu yönetmelikte arseniğin kıta içi su kaynaklarına göre sınır değerleri, 1. kalite suda 20 µg/L, 2. kalite suda 50 µg/L, 3. kalite suda 100 µg/L ve ve 4. kalite suda > 100 µg/L olarak belirlenmiştir [6].

Arsenik insan sağlığı üzerinde ciddi bir tehdittir ve kontamine su ve toprak ortamlarından uzaklaştırılması büyük önem arz etmektedir [7]. Günümüzde, As gideriminde koagülasyon/filtrasyon, iyon değişimi, kireç ile yumuşatma, adsorpsiyon ve ters ozmoz gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır [8]. Ancak bu yöntemlerin pahalı olması, düşük arıtma verimliliğine sahip olmaları, ikincil kirlilik oluşumu gibi bazı olumsuz özellikleri bulunmaktadır [9]. Mikroorganizmalar kullanılarak yapılan biyoremediasyon çalışmalarında umut verici sonuçlar elde edilmektedir [10]. Biyoremediasyon prosesinin çevre dostu olması, uygulama kolaylığı ve maliyeti düşürmesi açısından konvansiyonel yöntemlere göre birçok avantajı vardır [11]. Biyoremediasyon teknolojileri, sudan As çöktürmek/adsorbe etmek için kimyasallar yerine mikroorganizmaları kullanan araştırmaların odak noktası olmuştur ve atıksulardan As arıtımı için daha fazla ilgi görmeye başlamıştır [12]. Ayrıca, bu proseste kullanılan mikroorganizmaların metallerle karşı yüksek affinitesinin olması nedeniyle ağır metal iyonlarının neden olduğu çevre sorunlarını çözmek için biyoremediasyon konvansiyonel metotlara önemli bir alternatiftir [13]. As çoğu organizma için toksik olmasına rağmen, mikroorganizmalar As'nin biyojeokimyasal döngüsünde çok önemli bir rol oynar ve daha az zehirli formuna dönüştürebilir. Adsorpsiyon, demetilasyon, biyometilasyon, kompleksleşme, kopresipitasyon ve oksidasyon-redüksiyon işlemleri gibi çeşitli mikrobiyal mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar sayesinde mikroorganizmalar As gidermektedir [14]. Yabancıl suşlarla yapılan biyoremediasyon işlemlerinde, suşların metalleri bağlama kapasitelerinin sınırlı olması ve yüksek konsantrasyonlarda metal içeren ortamlarda metabolik aktivitelerinin durması nedeniyle arıtım olumsuz yönde etkilenir [15]. Ağır metallerin atıksulardan uzaklaştırılmasını hedefleyen araştırmalar, hedef metaller için artan afinite, kapasite ve seçiciliğe sahip yeni türlerin tespit edilmesine odaklanmıştır [16]. Son yıllarda, genetik modifikasyon teknikleri kullanılarak bakterilerin metal bağlama kapasitelerinin artırılması büyük önem kazanmıştır [17]. Yüksek konsantrasyondaki ağır metaller ile kirlenmiş bölgelerde yaşayan mikroorganizmalar çeşitli genetik mekanizmalar geliştirerek metallerin zararlı etkilerine karşı direnç gösterirler. Genellikle, kirli bölgelerde hayatta kalma yetenekleri olan suşlar ortamdan izole edilerek, biyoremediasyon uygulaması için kullanılırlar. Bu suşlara ait genler izole edilerek plazmidlere aktarılır ve bakteriye tek bir gen veya gen kümesinin eksprese edilerek biyoremediasyon uygulamalarında daha dirençli hale gelen suşlar elde edilir [18]. Bakterilerin metal bağlama kapasitelerini artırmak için polihistidin, polisistein ve metalloitiyonein (MT) gibi metal bağlayıcı proteinler veya peptitler aşırı eksprese edilerek bakterilerin metal bağlama kapasiteleri artırılmaktadır [19]. Son zamanlarda araştırmacılar, metal biyogideriminde, yüksek oranda sistein ve tiol (-SH) gruplarını içermesi nedeniyle ağır metalleri bağlama afinitesi yüksek proteinler olan metallothioneinlere (MT) odaklanmıştır. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar göstermiştir ki, MT genini ifade eden rekombinant *E. coli* hücrelerinin, Cd, As ve Cu gibi metal biyoakümüülasyonunu arttırdığı görülmüştür [20, 21, 22]. MT'ler bakterilerden memelilere kadar çok çeşitli hücrelerde bulunmaktadır [23]. Memelilerde MT'ler, moleküler ağırlık, kodlanmış genler, amino asit içeriği ve metal bağlama yeteneği bakımından çeşitlilik gösteren dört farklı

izoformdan (MT1-MT4) oluşmaktadır [24]. MT'lerin; çinko (Zn), kadmiyum (Cd) ve bakır (Cu) gibi metallerin detoksifikasyonu, homeostazı ve serbest radikallerin temizlenmesi gibi çeşitli biyolojik işlemlere katıldıkları bilinmektedir [25]. MT1 ve MT2 neredeyse tüm dokularda bulunan izoform proteinlerdir, MT3 ve MT4 ise sadece özelleşmiş hücrelerde bulunan küçük izoformlardır [26]. MT2 olarak da bilinen yüksek oranda eksprese edilen insan metallothioneini MT2A, metalotionein ailesinin önemli bir alt tipidir [27]. Bu protein, çeşitli hücre işlemlerine katılır ve metal iyonları ile şelatlar oluşturduğu, kapsamlı reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlediği ve antioksidan enzimleri aktive ettiği bilinmektedir [28]. Ayrıca, yüksek ağır metal bağlama kabiliyetleri nedeniyle, hem MT'lerin hem de MT'yi aşırı eksprese eden rekombinant bakterilerin, biyogiderim çalışmalarında biyomateryal olarak büyük potansiyele sahip olduğu da ileri sürülmüştür [28]. MT3 beyinde bulunur ve metal bağlayıcı özelliklere sahiptir [29]. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda, MT3'ün MT1 ve MT2'den daha yüksek metal bağlama kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [29].

Bu çalışmada, insan metalloproteinlerden MT2 ve MT3'ün sulu çözeltilerden As giderme kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bu genler konakçı *E. coli* Jm109 suşuna klonlanmış ve elde edilen rekombinant suşların As biyoremediasyonundaki etkinliği yabancı *E. coli* Jm109 suşuyla karşılaştırılmıştır. Bunun için hücrelerin As biyobirikim kapasitesi ve morfolojik yapılarındaki değişim belirlenmiştir. Böylece, As biyogideriminde hangi suşun daha etkili olduğu ve As'nin hücrelerle nasıl etkileştiği tespit edilmiştir.

2. Materyal ve Metod

2.1. Plazmitler ve suşlar

MT2 ve MT3 CDS gen fragmanları ticari olarak Twist Bioscience firması tarafından sentezlenmiştir. Bu fragmanlar ve pET21 plazmidi daha sonra çift sindirilmiş ve EcoRI ve NotI kısıtlama enzimleri kullanılarak bağlanmıştır. Dönüştürmeden önce, *E. coli* Jm109 ATCC 53323 bakteri hücreleri, CaCl₂ yöntemi kullanılarak yetkin hale getirilmiştir. Ardından hücreler, seçim için LB agar ve ampisilin, mavi/beyaz tarama için X-gal ve hücre büyümesinin uyarılması için IPTG içeren plakalara yayılmıştır. Ardından, kit protokolüne göre Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kiti (Cat no: 27104) kullanılarak seçilen kolonilerden plazmitler izole edilmiştir. Genlerin klonlandığını doğrulamak için, izole edilmiş plazmitler için dizileme kitaplıkları hazırlanmış ve Miseq platformu kullanılarak dizilenmiştir.

2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), bir mikroorganizmanın büyümesini inhibe eden en az metal konsantrasyonudur [30]. MİK'i belirlemek için suşlar 10-1000 ppm aralığında değişen arsenik trioksit (As₂O₃) konsantrasyonlarına sahip ortamda, çalkalamalı bir inkübatörde 120 rpm çalkalama hızında, 37 °C'de 96 saat boyunca inkübe edildi. 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonda suşların besiyerlerinden örnekler alındıktan sonra, örneklerin biyokütle yoğunlukları bir mikropilaya okuyucu (Thermo Flash 2000) ile 600 nm'de ölçüldü. Aynı zamanda, Nutrient Agar kullanılarak üç kopya halinde canlı hücreler sayıldı ve biyokütle yoğunlukları desteklendi. Bu sonuçlara dayanarak, Andrews (2001)'in yöntemine göre MİK değerleri belirlendi [31].

2.3. Biyogiderim deneyleri

Biyogiderim deneylerinde, 0,01 ppm, 0,1 ppm ve 1 ppm As içeren solüsyonlar *E. coli* Jm109, *E. coli* MT3 ve *E. coli* MT2 hücrelerine uygulandı ve 24 saat inkübe edildi. Bu suşların kontrollerine As uygulaması yapılmadı. Besiyerinde kalan As miktarını belirlemek için 24 saatlik inkübasyonun sonunda besiyerindeki kültürden örnekler alındı. Vorteksle homojenize edilen numunelerden 1 ml alınarak steril bir tüpe aktarıldı, 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, gözenek çapı 0.45 mikrometre olan bir

filtreden süzüldü, süzüntüde kalan örnek 1/100 oranında seyreltildi ve As miktarı Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS; Perkin Elmer & Nexion 350X) kullanılarak belirlendi. Hücre içi birikimi belirlemek için bir önceki aşamada santrifüjden sonra çökmüş hücrelere 1 ml 10 mM EDTA (Merck) solüsyonu ilave edildi. Çöken hücrelerin üstüne 1M HNO₃'den 1 ml ilave edildi, 2500 rpm'de 3 dakika vortekslendi ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süzüntülerdeki As miktarı, 1/100 oranında seyreltmeden sonra ICP-MS'de ölçüldü.

2.4. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntü analizleri

Hücrelerin morfolojik yapılarının görüntülenmesi için hücreler, As'li ve As'siz 50 ml LB ortamına (50 ppm As) ekildi ve 24 saat boyunca 37°C'de 120 rpm'de inkübe edildi. Örnekler daha sonra 5000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüjlendi. Süpernatant atıldı, peletler üç kez bir fosfat tamponu ile yıkandı (PBS, pH 7.2) ve daha sonra %2.5 glutaraldehide 4 °C'de 4 saat boyunca maruz bırakılarak ön sabitleme yapıldı. Ardından hücreler, PBS ile iki kez daha yıkandı ve %1 osmiyum tetraoksit 1 saat boyunca maruz bırakılarak daha iyi sabitlendi. Sabitlenmiş hücreler, PBS tamponu ile iki kere daha yıkandıktan sonra sırasıyla %15, %30, %60, %90 ve %100 konsantrasyonlarındaki asetonla muamele edilerek suları uzaklaştırıldı. Son olarak, kritik olarak kurutulmuş numuneler altın-platin (Quorum) ile kaplandı ve SEM ve EDX (Zeiss & Evo LS 10, Almanya) analizleri yapıldı.

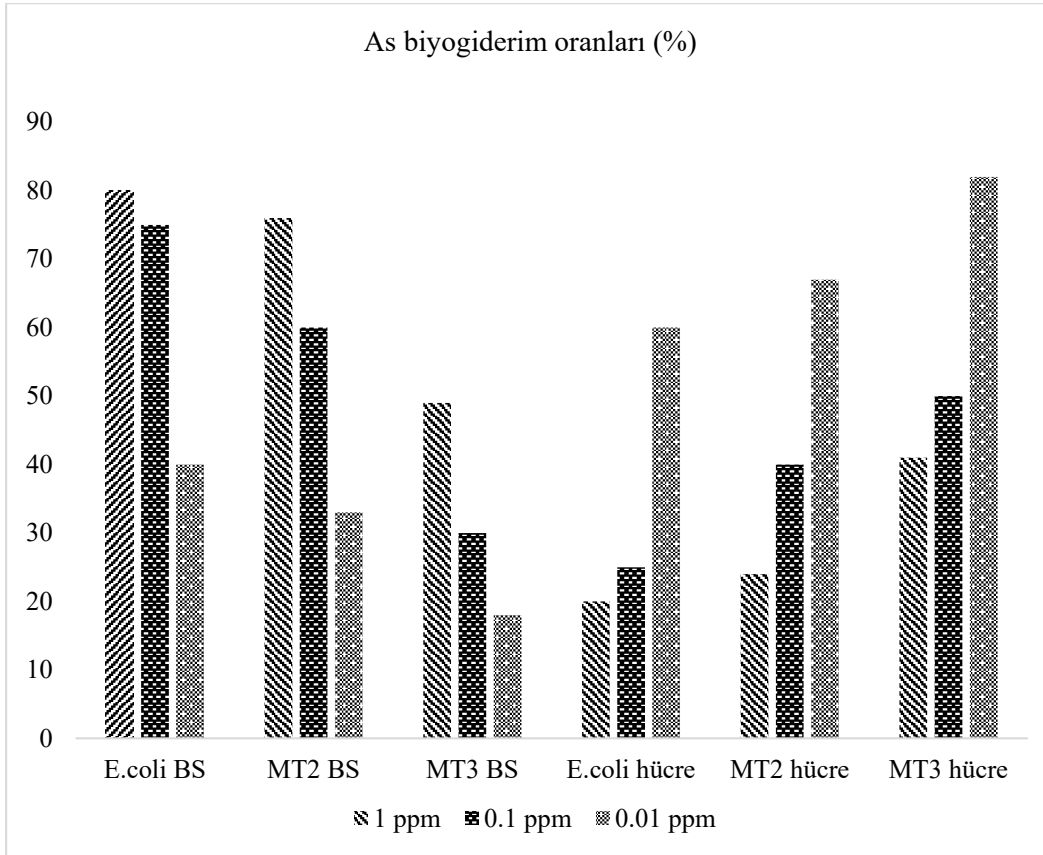
3. Sonuçlar ve Tartışma

MİK değerleri *E. coli* Jm109 için 20 ppm, *E. coli* MT2 için 48 ppm, *E. coli* MT3 için 60 ppm olarak belirlenmiştir. Buradan, MT3 geninin bakterinin As'ye direncini 3 kat arttırdığı, MT2 geninin ise 2,4 kat arttırdığı görülmektedir. Literatürde çeşitli suşların As MİK değerlerinin belirlenmesine dair çalışmalar bulunmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* LBA288, *Stenotrophomonas* sp. LM24R ve *Pseudomonas* sp. OS20R suşlarının As MİK değerlerinin sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM olduğu bulunmuştur [32]. Bizim çalışmamızda MT geni klonlanmış suşların yabancı suşa göre MİK değerlerinin daha yüksek bulunması, bu metalloproteinlerin As'yi şelatlamış olabileceğine yorulabilir [13].

Hücrelere farklı konsantrasyonlarda (1 ppm, 0,1 ppm, 0,01 ppm) 24 saat boyunca As uygulanması sonucu besiyerinde kalan ve hücre yüzeyi ile hücre içinde biriken toplam As biyogideriminin % oranları Şekil 1'de gösterilmiştir. Besiyerinde kalan As miktarları suşlara göre kıyaslandığında, en fazla *E. coli* Jm109'da, daha sonra *E. coli* MT2'de ve en az *E. coli* MT3'de As kalıntısının olduğu gözlenmiştir. Hücre yüzeyi + Hücre içi toplam biyogiderim oranları değerlendirildiğinde, en fazla biyogiderimi *E. coli* MT3 suşunun yaptığı tespit edilmiştir. Uygulanan As konsantrasyonlarına göre biyogiderim oranları karşılaştırıldığında ise en fazla biyogiderimin en düşük As uygulama dozu olan 0,01 ppm'de olduğu (*E. coli* Jm109 için %60; *E. coli* MT2 için %67; *E. coli* MT3 için %82) ve doz miktarı arttıkça biyogiderim oranının düştüğü görülmüştür. 0,1 ppm konsantrasyonunda As uygulandığında, *E. coli* Jm109, *E. coli* MT2 ve *E. coli* MT3 hücrelerinde sırasıyla %25, %40, %50 oranlarında; 1 ppm As uygulandığında ise %20, %24, %41 oranlarında As giderildiği belirlenmiştir. 0,01 ppm As uygulamasında, *E. coli* MT3 suşunun sırasıyla *E. coli* MT2 ve *E. coli* Jm109 suşlarından 1,22 kat ve 1,36 kat; 0,1 ppm As uygulamasında 1,25 kat ve 2 kat; 1 ppm As uygulamasında ise 1,7 kat ve 2,05 kat daha fazla As bağladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan görüleceği üzere, rekombinant suşların As biyogiderim kapasitesi yabancı suşa göre daha fazladır.

Bulgularımıza benzer olarak, insan MT1A geninin klonlandığı *E. coli* rekombinant suşunun arsenit (As III) biyobirikim kapasitesinin, kontrole kıyasla 76,3 µg/g'dan 319,6 µg/g'a yükseldiği, yani 3 kattan fazla arttığı tespit edilmiştir [15]. Bir başka çalışmada, yine insan MT1A geninin klonlandığı *E. coli* hMT-1A suşunun As biriktirme kapasitesinin kontrole göre arttığı ve hücre içinde 7,59 mg /g oranında As biriktirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca MT geninin üç kat fazla ifade edildiği rekombinant

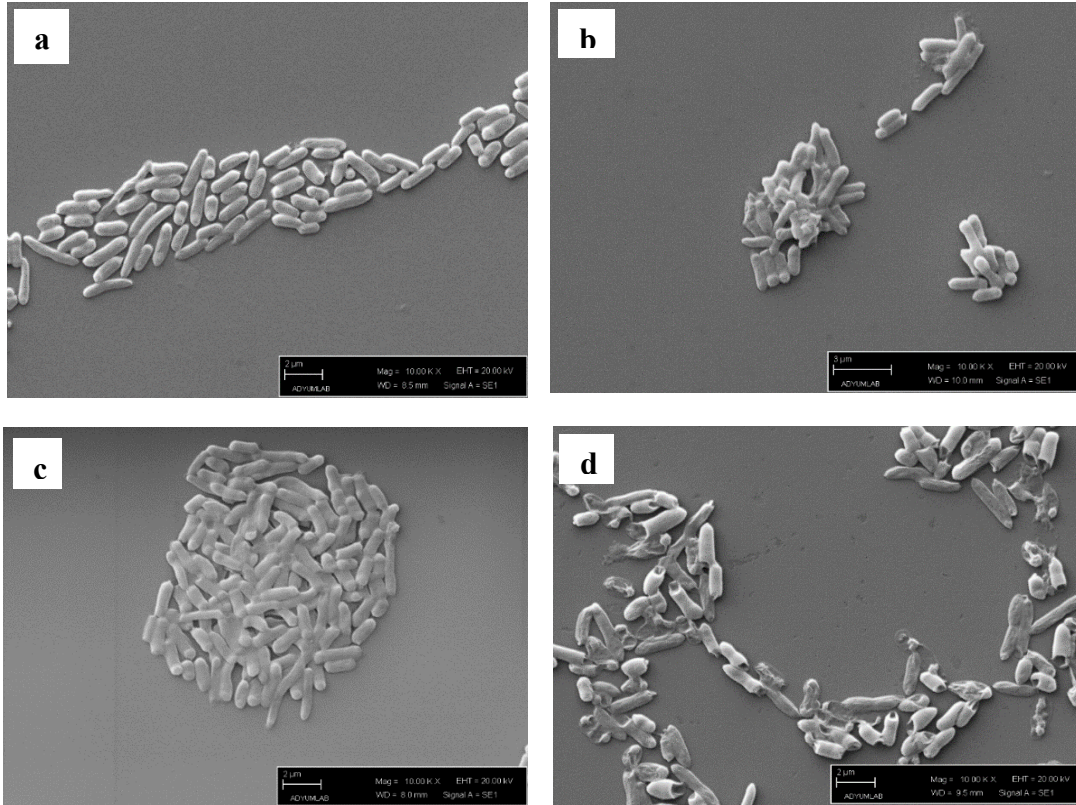
suşun MT genini bir kez ifade eden suşa göre besi ortamından 1,8 kat daha fazla As giderdiği de bulunmuştur [33]. Singh ve diğ. [34]'nin *Bacillus aryabhatai* bakterisinin As tolerans mekanizmasını araştırdıkları bir çalışmada, 25 mg/L arsenat (As V)'a 48 saat maruz kaldıktan sonra As'nin hücre içi birikiminin arttığını gözlemlemişlerdir ancak bu birikim bizim bulgularımızla kıyaslandığında çok düşük oranlarda (%10) kalmıştır. Bu farklılığın nedenini, uygulanan As formunun, uygulama süresinin ve kullanılan suşun farklı olmasına bağlayabiliriz. Aguilar ve diğ. [2] altın madenciliği alanındaki topraktan izole ettikleri *Bacillus cereus* ve *Lysinibacillus boronitolerans* yabancı suşlarının kültür ortamından %69,38 - %71,88 oranlarında arsenit ve %82,39 - %85,72 oranlarında arsenatı kültür ortamından uzaklaştırdığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda %60-%82 oranlarında tespit ettiğimiz biyogiderim oranları bu çalışmanın aralığına girmektedir ancak orada kullanılan türlerin As'ye doğal dirençli yabancı türler olduğunu göz önünde bulundurulmalıdır. As gideriminde rekombinant bakterilerin kullanıldığı bir çalışmada, arsenit oksidazın küçük ve büyük alt birimlerini kodlayan TTHB128 ve TTHB127 genleri, *Thermus thermophilus* HB8'e klonlanmış, elde edilen rekombinant bakteri ile 28 saat sonra arsenit içeren besiyerindeki arsenitin %87,6'sının oksitlendiği tespit edilmiştir [35]. *Agrobacterium tumefaciens* ve *Stenotrophomonas* sp. yabancı suşlarına plazmid pARS1'in klonlanması sonucu elde edilen rekombinant suşların As (III)'e toleranslarının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (*A. tumefaciens*'in direnci 1 mM'dan 20 mM'a; *Stenotrophomonas* sp.'nin direnci 5 mM'dan 20 mM'a yükselmiştir) [32]. Literatür araştırmalarından ve bizim sonuçlarımızdan görüleceği üzere, rekombinant suşların As biyogiderim kapasitesi yabancı suşlara göre daha fazladır. Giderim oranları, klonlanan genin tipine ve kullanılan bakteri türüne göre değişmektedir. Bizim bulgularımızda, MT genleri arasında bir kıyaslama yapılacak olursa, MT3 geninin MT2 geninden daha fazla As bağlama yeteneğine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 1. *E. coli* Jm109, *E. coli* MT2 ve *E. coli* MT3 suşlarının As biyogiderim oranları (%)

BS: Besiyeri; Hücre: Hücre yüzeyi ve hücre içinde biriken toplam As değerlerini ifade etmektedir.

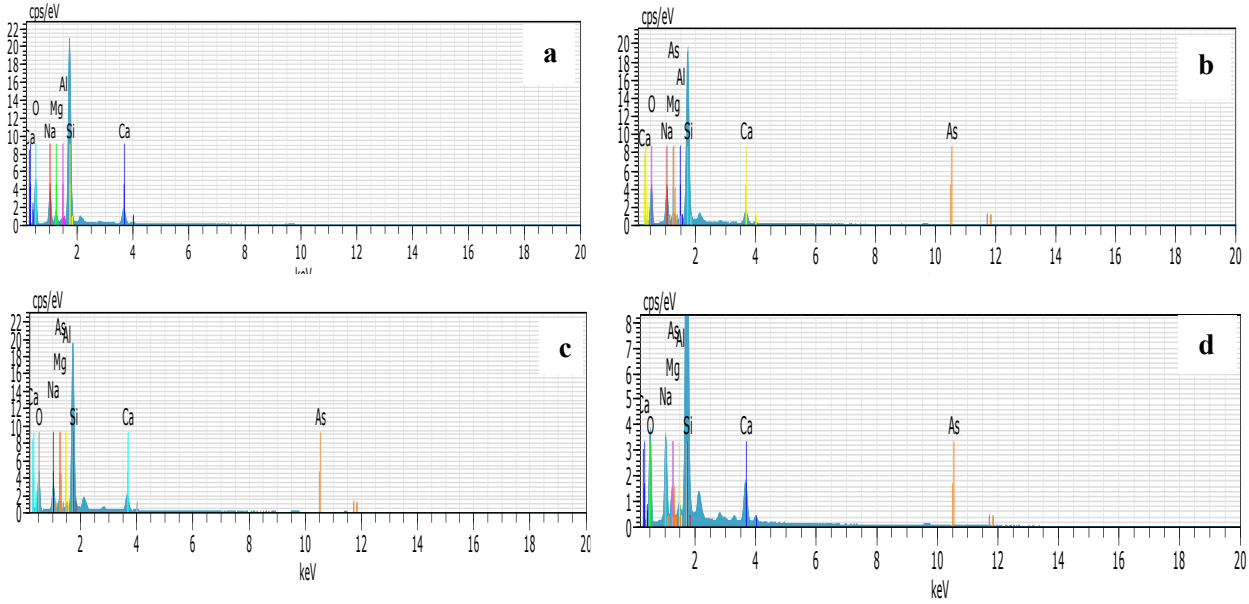
Hücrelerin SEM görüntüleri Şekil 2’de gösterilmiştir. As uygulanmamış *E. coli* Jm109 hücreleri (Şekil 2a) kontrol olarak kabul edilmiş, As uygulanmış diğer hücreler (Şekil 2b, 2c, 2d) bu kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, kontrol grubu hücrelerin yüzeyinin düzgün, tek tek ayrılmış ve oldukça pürüzsüz olduğu görülmüştür. As uygulanmış *E. coli* Jm109 hücrelerinin (Şekil 2b) üst üste bindiği ve yüzeylerinin dağılmış şekilde olduğu gözlenmiştir. As uygulanmış MT2 hücrelerinin (Şekil 2c) birbirine yapıştığı, kontrol grubuna göre biraz uzadığı ve hafif süngerleşmiş görünümde olduğu, As uygulanmış MT3 hücrelerinin ise uç kısımlarının kırıldığı, bazı hücrelerin yassılaştığı ve ezilmiş durumda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. Hücrelerin SEM görüntüsü **a)** Kontrol (As uygulanmamış) **b)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* Jm109 **c)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* MT2 **d)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* MT3

Hücrelerin EDS spektrumları Şekil 3’de gösterilmiştir. As uygulanmamış hücrelerin EDS spektrumunda As zirvesi gözlenmemekle birlikte (Şekil 3a), As uygulanmış hücrelerin EDS spektrumunda (Şekil 3b, 3c, 3d) görülen As zirveleri, bu hücrelerin yüzeyine As’nin absorplandığını kanıtlamıştır. EDS piklerinin tablolarında, hücrelerin As bağlama kapasitelerinin sırasıyla MT3, MT2 ve *E. coli* Jm109 olduğu görülmüştür. Kawa ve diğ. [36], As uyguladıkları *Citrobacter* sp. A99 suşunun SEM görüntülerinde hücrelerin şekillerinin kontrol grubuna göre çok bozulmuş olduğunu, EDS piklerinin de yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Singh ve diğ. [34], *Bacillus aryabhatai*’ye 48 saat boyunca As(V) uygulamaları sonucu, As(V) uygulanmamış kontrol grubu hücrelerinin SEM mikrograflarında, pürüzsüz yüzeyli, dairesel ve çubuk şeklinde görüldüğünü, As(V) uygulanmış hücrelerin ise düzensiz, genişlemiş, pürüzlü ve buruşuk görünümler gösterdiğini ve bu hücrelerin ortalama çapının, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha küçük olduğunu belirtmişlerdir. Drewniak ve diğ. [32] As’nin *Stenotrophomonas* sp. bakterisinin hücre bütünlüğü üzerindeki etkisini ve As-sorpsiyon kapasitesini belirlemek için yaptıkları SEM/EDS analizlerinde, As uygulanmamış bakteri hücrelerinin nanotel benzeri yapılarla birbirine bağlı çubuk şekilli olduğunu, As

uygulanmış hücrelerin ise çubuk şeklinin dağıldığını, hücrelerin birbirinden uzaklaştığını ve nanotel benzeri yapının daha uzun olduğunu gözlemlemiştir. EDS piklerinin de As varlığını doğruladığını belirtmişlerdir. Literatür araştırmalarından da görüleceği üzere, As'yi absorbe etmiş bakteri hücrelerinin morfolojisi kontrol hücrelerine göre daha bozuk şekillidir ve As pikleri de bulunmaktadır.



Şekil 3. Hücrelerin EDS analizi **a)** Kontrol (As uygulanmamış) **b)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* Jm109 **c)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* MT2 **d)** 1 ppm As uygulanmış *E. coli* MT3

4. Sonuç

Çalışmanın sonuçlarından *E. coli* Jm109, *E. coli* MT2 ve *E. coli* MT3 suşlarının üçünün de As uzaklaştırma kapasitesine sahip olduğu ve en yüksek kapasiteye sahip suşun *E. coli* MT3 olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin As kalıntısı sonuçları ve mikroskopik görüntüleri, genetiği değiştirilmiş suşların yüksek As birikimi nedeniyle, gelecekte As uzaklaştırma ve geri kazanımı için uygulama potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın bulgularına dayanarak, özellikle *E. coli* MT3 suşu veya MT3 proteininin sulardan As'nin biyolojik olarak uzaklaştırılmasında bir araç olarak kullanılabileceği sonucuna varabiliriz.

Teşekkür

Bu çalışma; Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MUFMAP/2017-0002 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Oremland RS, Stolz JF, Arsenic, microbes and contaminated aquifers. Trends Microbiology 2005; 13: 45–49.
- [2] Aguilar NC, Faria MCS, Pedron T, Batista BL, Mesquita JP, Bomfeti CA, Rodrigues JL, Isolation

- and characterization of bacteria from a brazilian gold mining area with a capacity of arsenic bioaccumulation. *Chemosphere* 2020; 240: 124871.
- [3] Tripathi RD, et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnology* 2007; 25: 158–165.
- [4] Khanam R, et al. Metal(loid)s (As, Hg, Se, Pb and Cd) in paddy soil: Bioavailability and potential risk to human health. *Science of the Total Environment* 2020; 699: 134330.
- [5] Jebelli MA, et al. Isolation and identification of the native population bacteria for bioremediation of high levels of arsenic from water resources. *Journal of Environmental Management* 2018; 212: 39–45.
- [6] Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği. 2004.
- [7] Akinci G, Guven DE, Bioremediation of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Desalination* 2011; 268: 221–226.
- [8] Nicomel NR, et al. Technologies for Arsenic Removal from Water: Current Status and Future Perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016; 13(1): 62.
- [9] Akkoyun MB. et al. Resistance, removal, and bioaccumulation of Ni (II) and Co (II) and their impacts on antioxidant enzymes of *Anoxybacillus mongoliensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2020; 235:108790.
- [10] Sobariu DL, et al. Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology* 2017; 39: 125–134.
- [11] Vural A, et al. Biyoremediasyon ve Fungusların Biyoremediasyonda Kullanılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 2018; 28: 490–501.
- [12] Teclu D, et al. Bioremediation of arsenic species from contaminated waters by sulfate-reducing bacteria. *Water Research* 2008; 42: 4885–4893.
- [13] Sharma B, Shukla P, Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *Journal of Hazardous Materials* 2021; 401: 123285.
- [14] Singh R, et al. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 112: 247–270.
- [15] Su YJ, et al. Bioaccumulation of Arsenic in recombinant *Escherichia coli* expressing human metallothionein. *Biotechnology and Bioengineering* 2009; 14: 565–570.
- [16] Gupta S, Singh D, Role of Genetically Modified Microorganisms in Heavy Metal Bioremediation, in: *Advances in Environmental Biotechnology* 2017; 197–214.
- [17] Mejáre M, Bülow L, Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 2001; 19: 67–73.
- [18] Das S, et al. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016; 100: 2967–2984.
- [19] Kim SK, et al.. Selective cadmium accumulation using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005; 99:109–114.
- [20] Deng X, et al. Cadmium removal from aqueous solution by gene-modified *Escherichia coli* JM109. *Journal of Hazardous Materials* 2007; 139: 340–344.
- [21] Singh S, et al. Highly selective and rapid arsenic removal by metabolically engineered *Escherichia coli* cells expressing *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Applied and Environmental Microbiology* 2008b; 74: 2924–2927.
- [22] Sekhar K, et al. Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan*, L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 2011; 72: 131–139.
- [23] Ruttkay-Nedecky B, et al. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14(3): 6044–66.
- [24] Thirumoorthy N, et al. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology* 2011; 9: 54.

- [25] Sakulsak N, et al. Metallothionein: An Overview on its Metal Homeostatic Regulation in Mammals. *International Journal of Morphology* 2012; 30: 1007–1012.
- [26] Yang XY, et al. Metallothionein 2A genetic polymorphism and its correlation to coronary heart disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2014; 18: 3747–3753.
- [27] He Y, et al. Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium. *Ecotoxicology* 2014; 23: 56–64.
- [28] Toriumi S, et al. Metal Binding Ability of Metallothionein-3 Expressed in *Escherichia coli*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005; 96: 295–301.
- [29] Palumaa P, et al. Metal binding to brain-specific metallothionein-3 studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Cellular and Molecular Biology* 2003; 49: 763–768.
- [30] Manasi Rajesh V, et al. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent. *Chemical Engineering Journal* 2014; 235: 176-185.
- [31] Andrews JM, Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48: 5–16.
- [32] Drewniak L, Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *Journal of Biotechnology* 2015; 196–197: 42-51.
- [33] Ma Y, et al. Cd(II) and As(III) bioaccumulation by recombinant *Escherichia coli* expressing oligomeric human metallothioneins. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 185: 1605–1608.
- [34] Singh N, et al. Arsenic mediated modifications in *Bacillus aryabhattai* and their biotechnological applications for arsenic bioremediation. *Chemosphere* 2016; 164: 524-534.
- [35] Yang C, Construction of a genetically engineered microorganism with high tolerance to arsenite and strong arsenite oxidative ability. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 2010; 45: 740–745.
- [36] Kawa YK, et al. Reductive dissolution and release of arsenic from arsenopyrite by a novel arsenate respiring bacterium from the arsenic-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2019; 143: 1047122.