

## LITERATURE REVIEW: *ME TALLOTHIONEIN* SEBAGAI PROTEIN PENGIKAT LOGAM UNTUK BIOREMEDIASI LOGAM BERAT

Amriyah Ummi Ma'rifah<sup>1\*</sup>, Yustinus Ulung Anggraito<sup>2</sup>, Ning Setiati<sup>3</sup>

Program Studi Magister Ilmu Pengetahuan Alam, Pascasarjana, Universitas Negeri Semarang

Corresponding: [amriyah59@students.unnes.ac.id](mailto:amriyah59@students.unnes.ac.id)

### Abstract

**Background:** The purpose of bioremediation is to remove or reduce dangerous compounds to improve environmental quality, one of which is heavy metals. Metal-binding proteins can minimize the impact of heavy metal pollution from the environment. This metal binding protein can accumulate metals by microorganisms. One of the known metal-binding proteins is metallothioneins (MTs). This protein can minimize the effects of heavy metals in the environment by creating protein-metal ion complex bonds. This review article provides a comprehensive insight into the role of metallothionein as a metal-binding protein for heavy metal accumulation, and the mechanisms involved in heavy metal bioremediation

**Methods:** The method used is a literature review using reputable national and international journals.

**Results:** Based on the results of a literature review, metallothionein can be found in many organisms such as bacteria, humans, plants, invertebrates, and mammals. Metallothionein can accumulate heavy metals that contain highly conserved cysteine residues. These residues allow MTs to bind, transport, and store various essential (Zn and Cu) and non-essential (Cd and Hg) heavy metals via thiolate bonding.

**Conclusion:** Heavy metals are dangerous for the survival of living things and can cause damage to vital functions. One of the metal-binding proteins is metallothionein, which is involved in the organism's tolerance to heavy metal content and can accumulate it, so that the effects of heavy metals can be minimized.

**Keywords:** *Bioremediation, Protein, Heavy metal, Metallothionein*

### Abstrak

**Latar Belakang:** Tujuan bioremediasi adalah menghilangkan atau mengurangi senyawa berbahaya untuk meningkatkan kualitas lingkungan, salah satu bahan berbahaya adalah logam berat. Protein pengikat logam dapat meminimalkan dampak pencemaran logam berat dari lingkungan. Protein pengikat logam ini dapat mengakumulasi logam oleh mikroorganisme. Salah satu protein pengikat logam yang diketahui adalah *metallothionein* (MT). Protein ini dapat meminimalisir efek logam berat pada lingkungan dengan membuat ikatan kompleks protein-ion logam. Tinjauan artikel ini memberikan wawasan komprehensif mengenai peran *metallothionein* sebagai protein pengikat logam untuk akumulasi logam berat, dan mekanisme yang terlibat dalam bioremediasi logam berat.

**Metode:** Metode yang digunakan yaitu literatur review menggunakan jurnal nasional dan internasional bereputasi.

**Hasil:** Berdasarkan hasil tinjauan literatur, metallothionein dapat ditemukan pada banyak organisme seperti bakteri, manusia, tumbuhan, hewan invertebrata dan mamalia. Metallothionein dapat mengakumulasi logam berat yang mengandung residu sisteinil yang sangat terkonservasi. Residu ini memungkinkan MT untuk mengikat, mengangkut, dan menyimpan berbagai logam berat esensial (Zn dan Cu) dan non-esensial (Cd dan Hg) melalui ikatan tiolat.

**Kesimpulan:** Logam berat berbahaya bagi kelangsungan hidup makhluk hidup dan dapat menyebabkan kerusakan fungsi vital. Protein pengikat logam salah satunya ialah methallothionein yang terlibat dalam toleransi organisme terhadap kandungan logam berat dan dapat mengakumulasi, sehingga efek logam berat dapat diminimalisir.

**Kata Kunci:** *Bioremediasi, Protein, Metallothionein, Heavy metal*

## PENDAHULUAN

Saat ini aktivitas manusia semakin meningkat sejalan dengan kebutuhan yang diperlukan dari masa ke masa karena peningkatan populasi penduduk dunia yang menyebabkan lingkungan menjadi semakin tercemar dengan sejumlah besar kontaminan berbahaya dari berbagai sumber (Raghunandan *et al.*, 2018). Kontaminan dan polutan yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan ini tidak hanya berasal dari bahan alami namun juga bahan berbahaya seperti logam, dan zat kimia berbahaya lainnya. Terdapat beberapa konsekuensi industrialisasi di setiap wilayah global yang mempengaruhi lingkungan tempat tinggal manusia sehingga berpengaruh terhadap kesehatan dan dapat membahayakan, akibat yang ditimbulkan ialah sumber daya alam yang berkurang, peningkatan emisi karbon dan polusi (Ahuti, 2015). Pencemaran lingkungan ialah terdapatnya zat yang berbahaya pada lingkungan dan dapat menyebabkan kerusakan dan gangguan pada organisme hidup dan ekosistem (Bala *et al.*, 2022).

Pencemaran ini biasanya terjadi karena adanya industri manufaktur (misalnya deterjen dan pewarna), sektor pertanian (misalnya pupuk dan pestisida), industri pertambangan (misalnya sianida dan asam sulfat) dan perusahaan konstruksi (misalnya semen dan logam). Polutan ini mempunyai dampak buruk terhadap kesehatan tumbuhan, hewan, dan manusia (Ayilara & babalola, 2023).

Bioremediasi adalah teknik yang menggunakan organisme hidup, seperti mikroba, bakteri, jamur, dan tanaman, untuk menghilangkan kontaminan, polutan, dan zat yang bersifat toksik dari tanah, air, dan lingkungan lainnya (Megharaj *at al.*, 2014). Logam berat dan radionuklida merupakan unsur yang tidak dapat terbiodegradasi, namun dapat diubah secara biologis menjadi bentuk yang tidak terlalu aktif. Bioremediasi adalah teknik pembersihan efektif untuk menghilangkan limbah beracun dari lingkungan tercemar yang kini semakin populer (Gogoi *et al.*, 2021).

Bioremediasi dengan teknologi biologi molekuler adalah teknik yang menggunakan pendekatan dan alat-alat biologi molekuler untuk mempelajari mikroorganisme yang terlibat dalam perbaikan lingkungan dengan bioremediasi. Teknik biologi molekuler dapat digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang terlibat dalam bioremediasi dan mengevaluasi peran serta

fisiologinya menggunakan kombinasi teknik eksperimental dan pemodelan genom (Hou *et al.*, 2020). Salah satu cara dari teknologi biomelekuler yang dapat diterapkan ialah dengan mengamati ekspresi gen dan penggunaan protein-protein hasil sintesis pada DNA.

## MATERI DAN METODE

Kajian secara sistematis studi literatur dilakukan pada bulan September sampai dengan November 2023. Sumber pustaka pada artikel ini diambil berdasarkan artikel yang berhubungan dengan judul studi literatur yang akan diulas. Sumber pustaka tersebut berupa artikel-artikel hasil penelitian sebelumnya dari jurnal nasional dan internasional. Sumber pustaka tersebut berupa artikel yang diambil dari jurnal nasional dan internasional yang bereputasi. Pencarian artikel ini menggunakan Google scholar, Harzing Publish or Perish, dan ProQuest.

Pembuatan literature review ini diawali dengan melihat trend penelitian berbasis biologi molekuler pada bidang lingkungan, lalu dilanjutkan dengan pembuatan resume dan kerangka studi literatur secara umum yang memuat latar belakang, metode, dan hal-hal penting lain yang akan mendukung terkumpulnya informasi secara komprehensif untuk studi literatur ini. Tahap berikutnya adalah mulai menyusun studi literatur sesuai dengan

kerangka yang telah disusun berdasarkan informasi-informasi yang telah diperoleh dari berbagai sumber pustaka yang kemudian dianalisis secara deskriptif dan dievaluasi serta dilanjutkan dengan pembuatan kesimpulan (Mudaningrat, *et al.*, 2023).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sejarah Bioremediasi

Bioremediasi bukan merupakan konsep baru, melainkan telah mengalami perkembangan dari masa ke masa, terutama setelah dapat dikaitkan dengan peran mikrobiologi dan biologi molekuler, bioremediasi telah mengalami perkembangan pesat. Bioremediasi telah ada dan digunakan sejak sekitar 600 SM oleh orang Romawi kuno untuk mengolah air limbah mereka menggunakan mikroorganisme. Sejarah bioremediasi dimulai pada tahun 1940-an ketika para ilmuwan memahami bahwa hidrokarbon minyak bumi dapat didegradasi oleh bakteri pendegradasi minyak.

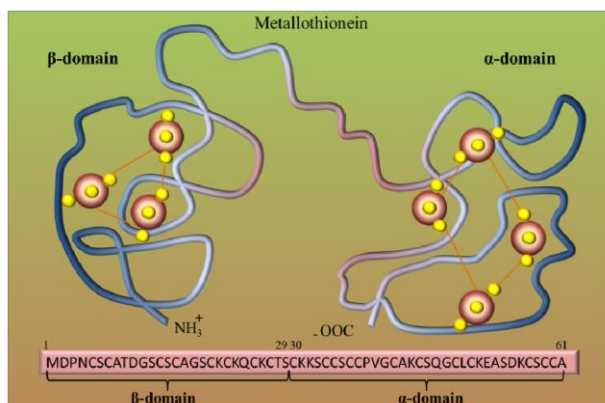
Bioremediasi dapat didefinisikan sebagai proses yang menggunakan entitas biologis apa pun untuk memulihkan polutan dengan bantuan bakteri, jamur, alga, tumbuhan atau bagian makhluk hidup apa pun seperti enzim, atau eksopolisakarida (Guo *et al.*, 2021) Di antara semua organisme hidup, bakteri dikenal luas karena kemanjuran bioremediasinya, fleksibilitas, dan kemampuan beradaptasi bakteri. Bakteri mampu tumbuh dalam kondisi buruk dengan mengembangkan kemampuan beradaptasi mekanisme (Barbato *et al.*, 2019).

### **Metallothionein sebagai protein pengikat logam berat**

Protein pengikat logam merupakan molekul protein yang dikodekan hasil dari proses biosintesis protein pada DNA tepatnya pada fase transkripsi yang memiliki kemampuan berikatan dengan ion logam berat seperti kadmium (Cd), nikel (Ni), arsen (As), dan timbal (Pb). Protein pengikat logam dapat meminimalisir logam berat dari lingkungan sehingga dampak berbahayanya dapat diminimalkan. Protein pengikat logam diteliti dan digunakan untuk meningkatkan aktivitas akumulasi logam oleh mikroorganisme. Beberapa jenis protein pengikat logam dan peptida yang dikenal seperti, metallothionein,

fitokelatin (PCs), CdBP, CP, dan HP. Molekul-molekul protein pengikat logam tersebut dapat menghilangkan logam berat dari lingkungan dengan membuat kompleks protein-ion logam (Khalid *et al.*, 2021). Kajian literatur ini akan berfokus pada protein pengikat logam jenis metallothionein.

Metallothionein adalah keluarga protein kaya sistein karena MT memiliki gugus s yang cukup banyak yakni 30%. MT memiliki berat molekul rendah dan dapat ditemukan pada berbagai kelompok taksonomi dengan heterogenitas tingkat tinggi (Krezel & Maret, 2021). Metallothionein disintesis terutama di organ hati dan ginjal manusia, namun juga ditemukan di sejumlah tempat lain (Jafarian, 2017). Protein pengikat logam jenis metallothionein dapat ditemukan pada bakteri, tumbuhan, invertebrata, dan mamalia dengan panjang masing-masing ialah 56 aa, 65 aa, 66 aa, dan 63 aa protein. Metallothionein memiliki peran penting dalam homeostasis logam dan perlindungan terhadap toksisitas logam berat. Metallothionein terlibat dalam detoksifikasi logam, yang dapat diinduksi oleh banyak logam berat termasuk kadmium (Si, 2018). Protein ini bahkan berperan penting dalam detoksifikasi, transportasi, dan penyimpanan logam dalam darah manusia (Rahman *et al.*, 2017).



**Gambar 1. Struktur metallothionein**

Metallothionein juga terlibat dalam transportasi, penyimpanan dan detoksifikasi timbal (Benhalima *et al.*, 2020). Produksi metallothionein pada bakteri umumnya ditentukan oleh konsentrasi seberapa berat logam. Bakteri penghasil MT resisten terhadap konsentrasi timbal yang tinggi dan dapat berfungsi sebagai alat terbaik untuk bioremediasi. Satu molekul MT memiliki 20 residu sistein dan dapat mengikat tujuh atom timbal (Chen *et al.*, 2019). Residu ini

memungkinkan MT untuk mengikat, mengangkut, dan menyimpan berbagai logam berat esensial (Zn dan Cu) dan non-esensial (Cd dan Hg) melalui ikatan tiolat.

Produksi MT pada bakteri umumnya ditentukan oleh konsentrasi logam berat pada lingkungan tertentu. Bakteri penghasil MT resisten terhadap timbal konsentrasi tinggi dan dapat berfungsi sebagai alat terbaik untuk bioremediasi (Pooja, 2021).

Terdapat beberapa jenis logam berat yang dapat berikatan dengan protein MT antara lain: (1) Logam berat fisiologis: Metallothionein dapat berikatan dengan logam berat fisiologis seperti seng, tembaga, dan selenium, (2) Logam berat xenobiotik: Metallothionein dapat mengikat logam berat xenobiotik seperti kadmium, merkuri, perak, arsenik, dan timbal, (3) Logam berat beracun: Metallothionein dapat mengikat logam berat beracun seperti kadmium, merkuri, dan arsenik.

**Mekanisme Pengikatan Logam oleh Protein MT**

Sebuah studi yang dilakukan oleh Jiang *et al.*(2019) dengan rancangan ikatan metallothionein dengan timbal menjelaskan bahwa situs aktif metallothionein mempunyai bentuk dan struktur mirip piramida dan ikatan dengan timbal menempati posisi teratas, sedangkan atom sulfur berasosiasi lemah dibandingkan timbal.

Pengikatan timbal ke situs aktif dari protein metallothionein mendistorsi seluruh struktur residu sistein yang terdapat pada dalam metallothionein. Metallothionein sebagian besar bertanggung jawab atas secara intraseluler dengan berikatan dengan timbal dimana reaksi setelah penyerapan timbal oleh protein ini ini bersifat ireversibel (Jiang *et al.*, 2019). Stabilitas ikatan tersebut berpengaruh negatif terhadap efisiensi hidrasi logam berat. Maka, timbal dapat diikat oleh metallothionein lebih efisien dibandingkan logam berat lainnya seperti seng, kobalt, dan kadmium (Peshkov & Khursan, 2017).

Penelitian lainnya menguji coba protein fusi metallothionein yang dirancang untuk menghilangkan timbal dari air dan makanan. Hasil penelitian ini terbukti bahwa metallothionein berkontribusi besar terhadap penghilangan timbal sesuai pada Tabel 1 (Xiao *et al.*, 2020). Dengan demikian, bakteri penghasil metallothionein atau metallothionein yang diekstrak dari bakteri dapat digunakan paling efektif untuk bioremediasi jenis timbal.

Singkatnya, pengikatan logam berat ke MT dipengaruhi toksisitas logam berat dengan cara mendetoksifikasi logam berat, melindungi sel dari toksisitas logam berat, mengatur ekspresi metallothionein, dan berfungsi sebagai biomarker pencemaran logam berat di ekosistem (Wong *et al.*, 2017). Metallothionein bertanggungjawab dan berfungsi dalam transportasi logam berat intraseluler dan akumulasinya dalam organel tertentu dikendalikan oleh MT serta molekul pengikat logam berat lainnya, seperti badan polifosfat (Balzano *et al.*, 2020). Meskipun tingkat biosorpsi logam berat dapat ditingkatkan dengan memanipulasi kondisi fisiko-kimia (suhu dan pH) yang terpapar pada logam berat dan substrat mikroalga, untuk meningkatkan bioakumulasi logam berat, para peneliti telah secara rekombinan menggunakan sistem penyimpanan-impor, yang meliputi saluran, pembawa sekunder, serta pengangkut aktif primer (Diep *et al.*, 2018). Beberapa penelitian yang relevan dengan topik ini disajikan secara ringkas pada Tabel 1.

**Tabel 1. Penelitian Penggunaan Protein Pengikat Logam *Metallothionein* dalam Bioremediasi**

| Judul   | Nama dan Tahun                | Organisme yang tereksresi <i>Metallothionein</i> dan logam yang diikat       | Metode  |
|---|-------------------------------|--|---|
| In Silico Bioremediation Study to Identify Essential Residues of Metallothionein Enhancing the Bioaccumulation of Heavy Metals in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | Tasleem, <i>et al.</i> (2023) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> digunakan untuk bioremediasi cemaran Cd dan Pb | Sequence protein metallothionein dari <i>P. aeruginosa</i> . Docking model terbaik dengan logam berat dilakukan untuk memeriksa interaksi intramolekul. Protein target ditemukan termasuk dalam keluarga " <i>metallothionein_pro</i> " dan menunjukkan hubungan ortologis yang erat dengan bakteri resisten logam berat lainnya. |
| Cry Protein Crystal- Immobilized Metallothioneins   | Sun, <i>et al.</i> (2019)     | <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) bioremediasi terhadap cemaran cadmium and | Serangkaian konstruksi Cry3Aa-SmtA dihasilkan oleh fusi. Sel-sel tersebut diekspresikan berlebih pada suhu 25 °C selama 72 jam, setelah itu pellet dipanen dan sentrifugasi pada 8000 rpm   |

|  |                             |  |  |
|--|-----------------------------|--|--|
| for Bioremediation of Heavy Metals from Water  |                             | chromium   | selama 10 menit. Over expression Bt dalam produksi kristal fusi Cry3Aa-SmtA murni yang menunjukkan ukuran, kristalinitas, dan morfologinya mirip dengan kristal protein Cry3Aa asli. Ketiga konstruksi Cry3Aa-SmtA menunjukkan pengikatan yang efisien terhadap kadmium dan kromium.   |
| Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains  | Geva, et al. (2016)         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bioremediasi terhadap cemaran ion tembaga                    | Strain baru <i>S. cerevisiae</i> diproduksi melalui konstruksi dan integrasi gen MT2 rekombinan dan GFP-hMT2 ke dalam sel yeast. Strain yMNWTA01 tambahan diperoleh melalui adaptasi strain <i>S. cerevisiae</i> tipe liar BY4743 terhadap konsentrasi tembaga yang tinggi. Strain tersebut menunjukkan peningkatan kemampuan untuk bioremediasi ion tembaga.  |
| Cytosolic expression of synthetic phytochelatin and bacterial metallothionein genes in <i>Deinococcus radiodurans</i> R1 for enhanced tolerance and bioaccumulation of cadmium | Ruchi et al., (2014)        | <i>Deinococcus radiodurans</i> bioremediasi terhadap cemaran kadmium                         | Gen sintetik (EC20) yang mengkode analog fitochelatin dengan dua puluh unit glutamat dan sistein berulang dibuat dengan ekstensi yang tumpang tindih dan diekspresikan dalam DR1. Gen cyanobacterial metallothionein (MT), smtA diklon untuk ekspresi intraseluler pada DR1. Strain DR1 yang membawa EC20 rekombinan menunjukkan toleransi 2,5 kali lipat lebih tinggi terhadap Cd <sup>2+</sup> dan mengakumulasi Cd <sup>2+</sup> 1,21 kali lipat lebih besar  |
| Mercury resistance and accumulation in <i>Escherichia coli</i> with cell surface expression of fish metallothionein  | Lin, et al. (2010)          | Recombinant tilapia ( <i>Oreochromis mossambicus</i> ) bioremediasi terhadap cemaran merkuri | CDNA MT mamalia diklon dari plasmid dari tikus MT1 (mMT). CDNA diamplifikasi dengan pasangan primer spesifik. Setiap strain bakteri ditanam dalam broth Luria-Bertani (LB) dan nutrisi. Ketika Tilapia MT (tMT) digabungkan dengan protein membran luar, protein membran luar C (OmpC), ini memberikan peningkatan resistensi dibandingkan dengan tMT sitoplasma yang diekspresikan dalam sel inang yang sama. TMT yang diekspresikan secara sitoplasma menunjukkan adsorpsi merkuri yang tinggi.  |
| Isolation, molecular characterization and functional analysis of OeMT2, an olive metallothionein with a bioremediation potential   | Dundar, et al. (2014)       | <i>Olea europaea</i> (zaitun) bioremediasi terhadap cemaran tembaga dan kadmium              | CDNA yang mengkode metallothionein tipe 2 dari zaitun diisolasi dari daun, dikarakterisasi dan diberi nama OeMT2. OeMT2 diekspresikan dalam <i>Escherichia coli</i> , dan pita protein tunggal dikonfirmasi dengan analisis protein gel blot. Uji toleransi logam dan pengukuran ICP menunjukkan bahwa OeMT2 secara efektif mengikat Cu dan Cd. Analisis PCR menunjukkan bahwa OeMT2 diekspresikan di semua jaringan pohon zaitun.   |
| Bioremediation potential of Cd by transgenic yeast expressing a metallothionein gene from <i>Populus trichocarpa</i>   | De Oliveira, et al., (2020) | <i>Populus trichocarpa</i> bioremediasi terhadap cemaran kadmium, besi dan magnesium         | Menransformasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (WT) tipe liar dengan dua versi gen <i>Populus trichocarpa</i> (PtMT2b) yang mengkode metallothionein: satu dengan urutan asli (PtMT2b 'C') dan yang lainnya dengan urutan yang bermutasi, dengan substitusi asam amino (C3Y, dinamai: PtMT2b 'Y'). WT dan kedua yeast yang ditransformasi ditanam di bawah tekanan Cd, dalam agar dan media cair. Ragi mutan yang membawa PtMT2b 'Y' memiliki pertumbuhan yang sedikit lebih tinggi pada media yang Mn dan Fe dibandingkan ragi non-transgenik, hal ini menunjukkan bahwa protein transgenik dapat |

|   |                           |  |
|---|---------------------------|--|
| <p>Expression of metallothionein of freshwater crab (<i>Sinopotamon henanense</i>) in <i>Escherichia coli</i> enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium</p> | <p>He, et al., (2013)</p> | <p><i>Sinopotamon henanense</i> bioremediasi terhadap zinc</p> |
|---|---------------------------|--|

mengikat logam-logam ini. *S. cerevisiae* yang membawa perubahan gen potensi bioremediasi Cd dari air limbah atau cairan terkontaminasi lainnya.

Gen MT untuk kepiting dimasukkan ke dalam vektor PET-28a-6His-SUMO dan MT rekombinan diekspresikan secara berlebihan sebagai fusi dengan SUMO pada *Escherichia coli*. Berdasarkan konstruksi SUMO-MT, dua mutan, yaitu SUMO MTt1 dan SUMO-MTt2, dibangun untuk mengubah struktur primer SUMO-MT menggunakan teknik mutagenesis terarah. Sel *E. coli* yang mengekspresikan SUMO-MT dan protein mutan tunggal ini menunjukkan peningkatan toleransi logam dan akumulasi ion logam yang lebih tinggi dibandingkan sel kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *E. coli* memiliki toleransi yang rendah dan akumulasi yang tinggi terhadap kadmium dibandingkan dengan seng dan tembaga.

### Kelemahan Protein Metallothionein dalam Pengikatan Logam

Telah ditunjukkan pula bahwa MT yang berekspresi berlebihan pada suatu organisme mungkin tidak efektif untuk meningkatkan serapan logam, karena tingginya protein ini dapat memicu agregasi bentuk yang *misfolded forms* pada struktur protein sehingga mengarah pada pembentukan yang tidak efisien atau protein yang tidak stabil dan mengakibatkan tingkat serapan logam yang justru lebih rendah (Diep *et al.*, 2018).

### SIMPULAN

Protein metallothionein (MT) dalam kemampuannya dalam bioremediasi dipengaruhi tingkat toksisitas logam berat kemudian protein tersebut mendetoksifikasi logam berat, melindungi sel dari toksisitas logam berat, mengatur ekspresi metallothionein, dan berfungsi sebagai biomarker pencemaran logam berat di ekosistem Logam berat berbahaya bagi kelangsungan hidup makhluk hidup dan dapat menyebabkan kerusakan fungsi vital. Protein pengikat logam salah satunya ialah methallothionein yang terlibat dalam toleransi organisme terhadap kandungan logam berat dan dapat mengakumulasi, sehingga efek logam berat dapat diminimalisir. Logam berat jenis timbal sangat efektif diakumulasi dengan protein pengikat logam Metallothionein. Terlalu banyak ekspresi metallothionein dalam sel akan justru akan membuat penurunan efektifitas pengikatan logam dan membuat struktur protein kelainan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmigid, H.M., 2016. Expression analysis of Type 1 and 2 Metallothionein genes in Rapeseed (*Brassica napus* L.) during short-term stress using sqRT-PCR analysis.
- Ahuti, S., 2015. Industrial growth and environmental degradation. *Int. Educ. Res. J.* 1, 5–7. 413
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1183691.
- Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B. V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Tripathi, M. (2022). Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. *Toxics*, 10(8), 484.
- Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T. B., Dell'Anno, F., Sansone, C., & Brunet, C. (2020). Microalgal metallothioneins and phytochelatins and their potential use in bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 517.
- Barbato, M., Mapelli, F., Crotti, E., Daffonchio, D., & Borin, S. (2019). Cultivable hydrocarbon degrading bacteria have low phylogenetic diversity but highly versatile functional potential. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 43-51.
- Benhalima L, Amri S, Bensouilah M, Ouzrout R (2020) Heavy metal resistance and metallothionein induction in bacteria isolated from Seybouse river Algeria. *Appl Ecol Environ Res* 18(1):1721–1737.

- [https://doi.org/10.15666/aeer/1801\\_17211737](https://doi.org/10.15666/aeer/1801_17211737)
- Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Priyadarshane, M., & Das, S. (2020). Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: Metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, 12(11), 1637-1655.
- Chaturvedi, R., & Archana, G. (2014). Cytosolic expression of synthetic phytochelatin and bacterial metallothionein genes in *Deinococcus radiodurans* R1 for enhanced tolerance and bioaccumulation of cadmium. *Biometals*, 27, 471-482.
- Chen B, Fang L, Yan X, Zhang A, Chen P, Luan T, Hu L, Jiang G (2019) A unique Pb-binding flagellin as an effective remediation tool for Pb contamination in aquatic environment. *J Hazard Mater* 363:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.004>
- Dash, D. M., & Osborne, W. J. (2022). A systematic review on the implementation of advanced and evolutionary biotechnological tools for efficient bioremediation of organophosphorus pesticides. *Chemosphere*, 137506.
- De Oliveira, V. H., Ullah, I., Dunwell, J. M., & Tibbett, M. (2020). Bioremediation potential of Cd by transgenic yeast expressing a metallothionein gene from *Populus trichocarpa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 202, 110917.
- Diep, P., Mahadevan, R., and Yakunin, A. F. (2018). Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6:157. doi: 10.3389/fbioe.2018.00157
- Dundar, E., Sonmez, G. D., & Unver, T. (2015). Isolation, molecular characterization and functional analysis of OeMT2, an olive metallothionein with a bioremediation potential. *Molecular genetics and genomics*, 290, 187-199.
- Geva, P., Kahta, R., Nakonechny, F., Aronov, S., & Nisnevitch, M. (2016). Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19613-19625.
- Gogoi, N. M., Baroowa, B., & Gogoi, N. (2021). Ecological tools for remediation of soil pollutants. In *Bioremediation Science* (pp. 57-78). *CRC Press*.
- Guo S, Xiao C, Zhou N, Chi R (2021) Speciation, toxicity, microbial remediation and phytoremediation of soil chromium contamination. *Environ Chem Lett* 19(2):1413-1431. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01114-6>
- He, Y., Ma, W., Li, Y., Liu, J., Jing, W., & Wang, L. (2014). Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium. *Ecotoxicology*, 23, 56-64.
- Hou, D., O'Connor, D., Igalavithana, A. D., Alessi, D. S., Luo, J., Tsang, D. C., ... & Ok, Y. S. (2020). Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(7), 366-381.
- Koch, N., Islam, N. F., Sonowal, S., Prasad, R., & Sarma, H. (2021). Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: methods of detection and bioremediation. *Current research in microbial sciences*, 2, 100027.
- Khalid, H. S., Akhtar, M. F., Ijaz, M., Iqbal, M., Bukhari, S. A., Mustafa, G., & Shaukat, K. (2021). Role of metal-binding proteins and peptides in bioremediation of toxic metals. In *Handbook of Bioremediation* (pp. 437-444). *Academic Press*.
- Krezel, A., & Maret, W. (2021). The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. *Chemical Reviews*, 121(23), 14594-14648.
- Li, X., Ren, Z., Crabbe, M. J. C., Wang, L., & Ma, W. (2021). Genetic modifications of metallothionein enhance the tolerance and bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112512.
- Lin, K. H., Chien, M. F., Hsieh, J. L., & Huang, C. C. (2010). Mercury resistance and accumulation in *Escherichia coli* with cell surface expression of fish metallothionein. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 561-569.
- M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu, *Bioremediation, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 2014, Pages 485-489, ISBN 9780123864550, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01001-0>.
- Mudaningrat, A., Umay, F., Syahriza, F. A. A., Anggraito, Y. U., & Setiati, N. (2023). Literature Review: LITERATURE REVIEW:

- APLIKASI PENANDA MOLEKULER UNTUK ANALISIS KEANEKARAGAMAN GENETIK HEWAN. BIOPENDIX: *Jurnal Biologi, Pendidikan dan Terapan*, 10(1), 11-25.
- Sun, Q., Cheng, S. W., Cheung, K., Lee, M. M., & Chan, M. K. (2019). Cry protein crystal-immobilized metallothioneins for bioremediation of heavy metals from water. *Crystals*, 9(6), 287.
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*. 2011. doi: 10.1186/1477-7819-9-54. PMID: 21599891; PMCID: PMC3114003.
- Osman, G. E., Abulreesh, H. H., Elbanna, K., Shaaban, M. R., & Ahmad, I. (2019). Recent Progress in Metal-Microbe Interactions: Prospects in Bioremediation. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 13(1).
- Raghunandan, K., Kumar, A., Kumar, S., Permaul, K., and Singh, S., 2018. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. *Biotech* 8:71. doi: 10.1007/s13205-018-1096-3
- Rahman, M. T., Haque, N., Abu Kasim, N. H., & De Ley, M. (2017). Origin, function, and fate of metallothionein in human blood. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 173, 41-62.
- Sevak, P. I., Pushkar, B. K., & Kapadne, P. N. (2021). Lead pollution and bacterial bioremediation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), 4463-4488.
- Si, M., & Lang, J. (2018). The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 1-20.
- Sun, Q., Cheng, S. W., Cheung, K., Lee, M. M., & Chan, M. K. (2019). Cry protein crystal-immobilized metallothioneins for bioremediation of heavy metals from water. *Crystals*, 9(6), 287.
- Tasleem, M., Hussein, W. M., El-Sayed, A. A. A., & Alrehaily, A. (2023). An In Silico Bioremediation Study to Identify Essential Residues of Metallothionein Enhancing the Bioaccumulation of Heavy Metals in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, 11(9), 2262.
- Verma, S., & Kula, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369.
- Wong, D. L., Merrifield-MacRae, M. E., & Stillman, M. J. (2017). Lead (II) binding in metallothioneins. *Lead: Its Effects on Environment and Health*, 17, 241.