



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Mecanismos de resistencia a metales pesados en bacterias,
hongos, plantas y algas y sus posibles aplicaciones como
estrategias para biorremediación”**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA



JESSICA RUIZ VIVAR

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Vocal: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

Secretario: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

1er suplente: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

2do suplente: EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio de Microbiología Molecular, anexo Laboratorio 1A, Edificio A,
Facultad de Química, UNAM**

Asesor

Dr. Fernando Montiel Aguirre

Supervisor técnico

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

Sustentante

Jessica Ruiz Vivar

A Sergio Bernal González

1970-2009

*Que este trabajo sea el inicio de una vida llena de logros en
tu nombre*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme acompañado en cada paso de este camino.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre, por haberme “adoptado” y apoyado en todo momento, por sus valiosos consejos, por su amistad y sobretodo por su confianza en mi.

A Abel Gutiérrez Ramos, por su invaluable apoyo a lo largo de este proceso, por sus divertidas anécdotas y su gran amabilidad conmigo.

A Raquel Ortega Muñoz, por su apoyo y contribuciones a este trabajo.

A Luciano Hernández Gómez, por sus valiosas opiniones que permitieron enriquecer este trabajo.

A toda mi familia, por ser un ejemplo de fortaleza en los momentos más difíciles.

A los buenos profesores de la Universidad que durante mi breve caminar por aquí me enseñaron ciencia y virtudes que ahora son parte de mi.

A la UNAM, mi *Alma Mater*, por ser la Institución académica que hoy es...Nada me enorgullece más que pertenecer a ella...

DEDICATORIAS

A Sergio Bernal González...siempre estás con nosotros...

A Patricia, Eduardo, Melissa y Axel, simplemente sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible, gracias por apoyarme, escucharme y muchas veces aguantarme...gracias por existir y ser el perfecto ejemplo de la perseverancia y el arduo trabajo, los amo.

A Angélica, Sergito, Luz, Susana, Karla, Socorro, ustedes me han enseñado muchísimas cosas y me han dado mil más, siempre estaré infinitamente agradecida con ustedes por todo lo que son, el perfecto ejemplo de fortaleza, generosidad y bondad, los amo.

A Osvaldo, innumerables veces has sido luz en mi oscuridad, no hay forma de agradecértelo, te amo.

A Enrique, Rodrigo, Juan y Justo, por enriquecer mi vida y estar al pendiente de mi, los amo.

A Alejandrina y María, pues su apoyo y amistad han sido los mejores desde que las conozco, las amo.

A Diego y Paulina, valiosísimas personas que conocí en este caminar, su compañía y apoyo fueron cruciales para perseverar, los amo.

A todos los que alguna vez pensamos que esto era imposible... no lo es, NADA lo es...

ÍNDICE	PÁGINAS
Abreviaturas	1
Glosario	3
Objetivo	6
Justificación	8
Introducción	13
Marco teórico	16
o La toxicidad de los metales pesados	17
o Mecanismos involucrados en el daño oxidativo producido por metales	20
o El proceso de captación de metales	21
Acumulación/precipitación extracelular	21
Acumulación/precipitación intracelular	22
o Mecanismos de resistencia de algunos organismos a metales pesados	23
En bacterias, las ATPasas de tipo P constituyen la defensa básica contra metales pesados catiónicos	26
Las proteínas de tipo CHR detoxifican cromato	26
o La vía de asimilación de azufre como precursora de compuestos antioxidantes	27
La captación de sulfato	28
La activación del sulfato (ATP sulfurilasa)	29

La reducción de sulfato a sulfito	29
Biosíntesis de cisteína	30
Biosíntesis de GSH	32
Biosíntesis de PCs	33
Regulación de SAP y síntesis de Cys y GSH	34
o Mecanismos de resistencia a Cd ²⁺ mediados por GSH y PC	35
Incremento en la síntesis de GSH y PCs	36
Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos como biorremediadores	39
o Utilización de bacterias provenientes de suelos serpentinos para la biorremediación de metales	40
Caracterización de las bacterias de suelos serpentinos	42
o El uso de algas para remover los iones de metales pesados de aguas residuales	45
o El potencial de las especies de <i>Penicillium</i> en el campo de la biorremediación	57
o La fitorremediación de arsénico	65
Captación, transporte y detoxificación de As en <i>Pteris vittata</i>	69
Incremento de la capacidad antioxidante de la planta	71
El uso de la simbiosis planta-microorganismo como ayuda para remover As del suelo	72

Análisis de la información	74
o Bacterias	75
o Algas	77
o Hongos	79
o Plantas	80
Conclusiones	82
Bibliografía	86

ABREVIATURAS

APS	Adenosina 5'-fosfosulfato
APSK	APS cinasa
ATPS	ATP sulfurilasa
BSO	L-butionina sulfoximina
CCA	arsenato de cobre cromado
CHR	cromato reductasa
CT	cistationina
Cys	cisteína
DMSO	dimetilsulfóxido
γ -EC	γ -glutamilcisteína
γ -ECS	γ -glutamilcisteína sintetasa
EPS	sustancias poliméricas extracelulares
GS	glutación sintetasa
GSH	glutación
GSH-Px	glutación peroxidasa
hCys	homocisteína
HAT	homoserina O-acetiltransferasa
HAST	transportadores de sulfato de alta afinidad
HMWC	complejos de alto peso molecular
LAST	transportadores de sulfato de baja afinidad
OAH	O-acetilhomoserina
OAS	O-acetilserina
OAS TL	O-acetilserina tiol liasa

PAPS	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
PAPSR	PAPS reductasa
PCs	Fitoquelatinas
PCS	Fitoquelatina sintasa
PPi	Pirofosfato
ROS	especies reactivas de oxígeno
SAP	vía de asimilación de azufre
SAT	serina acetil transferasa
SiR	sulfito reductasa
SOD	superóxido dismutasa
TDS	sólidos totales disueltos en una disolución

GLOSARIO

Apoplasto: En las plantas es el espacio en el que circula el agua y los solutos, constituido por las paredes celulares y los espacios entre las células.

Bioacumulación: Mecanismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía.

Biosorbente: microorganismo utilizado para retener determinado metal en su superficie

Biosorción: fenómeno que se caracteriza por la retención de un determinado metal por un microorganismo mediante una interacción físicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo.

Cometabolismo: Se da en casos de sustratos complejos donde los microorganismos consumen un compuesto y producen enzimas para transformar otro compuesto, sobre el que no pueden crecer, en uno asimilable por su metabolismo.

Compartimentalización: guardar determinada sustancia o compuesto en diversos organelos celulares.

Fitoextracción: capacidad de las plantas para extraer metales pesados del suelo.

Fitorremediación: recuperación de un área natural por medio del uso de plantas.

Hiperacumulador: Organismo capaz de almacenar grandes cantidades de metales pesados.

Mesofítico: Plantas y comunidades vegetales que viven en condiciones ambientales intermedias entre el medio seco y el medio acuático.

Micorrizas arbusculares: asociaciones ecológicamente mutualistas entre hongos del Phylum *Glomeromycota* y la inmensa mayoría de las plantas.

Rizósfera: zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas y microorganismos del suelo.

Sorción: Retención de una sustancia por otra cuando están en contacto; incluye las operaciones de absorción, adsorción, intercambio iónico.

Xilema: tejido vegetal leñoso de conducción que transporta líquidos de una parte a otra de las plantas vasculares

OBJETIVO

En virtud de que en la actualidad sólo se cuenta, para fines prácticos, con tecnologías costosas y no necesariamente sustentables para la remoción de metales pesados en terrenos y aguas contaminadas, es fundamental conocer y estudiar a los mecanismos de resistencia que diversos organismos presentan frente a ecosistemas contaminados con este tipo de sustancias en función de su posible aplicación como estrategias biotecnológicas de biorremediación de dichos suelos y aguas.

JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental con metales pesados es un problema de salud pública a nivel mundial. Se sabe que enfermedades como el cáncer son multifactoriales y muchas veces el factor ambiental es determinante²⁰, como en el caso de exposiciones crónicas a altas concentraciones de determinado metal.

La principal fuente de este tipo de contaminación es la industria¹⁶ (de acero, de pinturas y recubrimientos, de cuero, de concreto y textil, entre otras). Hasta hace algunos años, no se ejercía un adecuado control sobre los desechos ni emanaciones de estas industrias, lo que ocasionó que durante mucho tiempo las personas que vivían en los alrededores de dichas industrias estuvieran expuestas a concentraciones elevadas de metales.

Uno de los ejemplos de esta situación es el tristemente célebre caso de la empresa “Cromatos de México”, unidad perteneciente a la empresa alemana Bayer que operó de 1958 a 1978 y que, de acuerdo con la documentación que maneja el gobierno del municipio de Tultitlán, Estado de México, generaba por día 12 toneladas de cromato de sodio, una tonelada de cromato de potasio, ocho toneladas de sulfato de sodio y seis toneladas de hidróxido de aluminio.¹²⁶ La producción se realizaba a cielo abierto, sin ningún control de las emisiones a la atmósfera, a las aguas residuales, ni en la disposición final de los residuos; estos últimos, generalmente eran donados al municipio para relleno y aplanado de calles, el resto del material era confinado en el predio sin ningún tipo de control. En el 2005 la SEMARNAT dio a conocer que “Cromatos de México” sepultó en 1983 75, 000 toneladas de cromo hexavalente en sus instalaciones en la colonia Lechería, municipio de Tultitlán, Estado de México.¹²⁶ Sin embargo, desde 1999 el encapsulado registró cuarteaduras y

filtraciones de agua de lluvia. Actualmente, las instalaciones de la empresa, enclavada en la zona industrial de Lechería, presentan restos visibles de cromo en muros y patios. Esta situación provoca que con el agua de lluvia el material se disuelva y se filtre directamente a los mantos acuíferos, con graves consecuencias para la población en esa área del Estado de México.¹²⁶

Actualmente el reto más importante en este caso es la limpieza de los acuíferos, los cuales se calcula que están contaminados a una profundidad de 200 metros en un espacio de cinco kilómetros de radio alrededor de la planta.¹²⁶

Esta gran contingencia ambiental demandará importantes recursos económicos y técnicos. Obviamente, una de las acciones obligadas para resolver esta problemática que sigue y seguirá vigente por muchos años y muchas generaciones, es tratar el agua contaminada y devolverla a los acuíferos. Esto representa una tarea difícil y extremadamente costosa. Por ello podrían comenzar a utilizarse técnicas y procedimientos alternativos de remoción de metales, como el uso de organismos que sean capaces de tolerar la exposición y al mismo tiempo lo remuevan del agua. Estos métodos son objeto de estudio por diversos investigadores alrededor del mundo y a simple vista ofrecen numerosas ventajas frente a las costosas tecnologías de remoción actualmente utilizadas (principalmente cromatografía de intercambio iónico) tales como: ser amigables con el ambiente (no se produce contaminación secundaria durante el proceso de remoción), son biotecnologías de bajo costo, los microorganismos pueden ser producidos en grandes escalas y sobretodo, se

da el aprovechamiento de las características innatas de dichos organismos que naturalmente se enfrentan a exposiciones a metales.

Otra de las razones por las que debe considerarse a los microorganismos como la alternativa más sustentable y viable a futuro para la remoción de metales del suelo, es precisamente esta capacidad que tienen de crecer y desarrollarse de manera natural en los suelos, lo que los sitúa por delante de cualquier otra tecnología artificial cuando se piensa en la remoción de metales de suelos destinados al cultivo de alimentos.

Se ha calculado que para el 2050 la población mundial habrá llegado a los 9 mil millones de habitantes¹²⁷, por lo que es urgente y necesario idear una estrategia global que garantice la seguridad de los alimentos que hoy en día se consumen. Junto con el crecimiento poblacional, vienen aspectos como el incremento en el consumo y la demanda de alimentos procesados, lo que trae consigo mayor presión sobre el sistema de suministro de alimentos.¹²⁷

Una de las posibles alternativas que los agricultores han explorado con el fin de evitar la carencia de alimentos, es la de comenzar a utilizar nuevos suelos con fines agrícolas,¹²⁷ lo cual implica la necesidad absoluta de remover los metales pesados que pudieran estar ahí contenidos. Para ello, podría sugerirse como solución alternativa sustentable la siembra de plantas hiperacumuladoras en esos terrenos.

A manera de ejemplo, considérese la siguiente situación. Godfray *et al.*¹²⁷ reportan que los cultivos más productivos, como el de caña de azúcar, transforman la energía solar en biomasa con una eficiencia del 2% bajo condiciones de crecimiento “óptimas”, las cuales, obviamente, no incluyen la

presencia de metales pesados en el suelo. Dicha eficiencia podría verse drásticamente disminuida si existieran elevadas concentraciones de uno o más metales en el suelo, lo cual afectaría severamente al sector agricultor y por lo tanto a la economía, sin dejar de lado las graves consecuencias que tendría este tipo de alimentos en el consumidor que tuviera acceso a ellos. Por estas razones se considera que la adición de organismos resistentes a metales y que sean capaces de removerlos del suelo podrá ser una gran herramienta para garantizar la seguridad de los cultivos de alimentos en un futuro cercano.

INTRODUCCIÓN

La industrialización ha sido un sello de progreso de la civilización a pesar de que se ha comprobado que los desechos industriales son, con frecuencia, altamente tóxicos para el medio ambiente. Efluentes industriales contaminados con sustancias tóxicas y metales pesados son descargados en ríos que posteriormente pueden ser utilizados para abastecer de agua potable a algún poblado cercano. Las plantas de tratamiento de aguas en países en desarrollo no están lo suficientemente equipadas para remover trazas de metales pesados, por lo que cada consumidor se encuentra expuesto a cantidades desconocidas de contaminantes en el agua que consume.

Las principales fuentes de contaminación por metales pesados son la industria minera, las curtidoras de cuero y las industrias de tratamiento de superficies (como la del acero inoxidable y las de pinturas o recubrimientos). Estas industrias descargan gran cantidad de metales tóxicos como el Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn y Pb al medio ambiente. En las últimas décadas se ha demostrado la presencia de estos contaminantes en sedimentos de ríos; la acumulación de los mismos en vegetales crecidos en suelos contaminados resulta alarmante dado que estos metales producen efectos nocivos en la salud. Es bien sabido que los metales pueden ser extremadamente tóxicos para los seres vivos, particularmente los mamíferos, ya que causan daños en el sistema nervioso, hígado, huesos y también bloquean grupos funcionales de algunas enzimas vitales. Diversos grupos de investigación han estudiado la utilización de microorganismos con el propósito de biorremediar los sitios contaminados con metales. Es de notable interés la capacidad que poseen algunas bacterias, algas, plantas y hongos de lidiar con el metal mediante diversos mecanismos

que les permiten sobrevivir a la exposición y al mismo tiempo les dan la capacidad de remover el contaminante del medio. Dichos mecanismos podrían utilizarse a futuro como alternativas a las costosas tecnologías actuales de remoción de metales.

MARCO TEÓRICO

La toxicidad de los metales pesados

Los metales pesados como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} son micronutrientes esenciales para el metabolismo celular, pero cuando su concentración sobrepasa la ideal, éstos o cantidades traza de los no esenciales como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ y Pb^{2+} resultan extremadamente tóxicos. Por esta razón el problema de contaminación ambiental con metales pesados se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial. La actividad industrial y el desecho inapropiado de residuos son las principales causas del incremento en estos contaminantes. Se ha estimado que la contaminación mundial anual por metales excede la suma de la contaminación por desechos radioactivos y orgánicos.¹⁶ Hoy en día es posible detectar niveles altamente tóxicos de metales en los alrededores de los efluentes industriales, así como en los diversos tipos de suelo. La minería también genera todo tipo de desechos con metales pesados contaminando así las áreas próximas y los sistemas de aguas. A pesar de que la industria es la principal contaminante del ambiente con metales, no debe perderse de vista que la actividad personal y del hogar son también responsables en cierta medida. La contaminación por actividades del hogar se origina gracias al uso de productos de lavandería, como detergentes y blanqueadores. El elemento más abundante (metaloide) que se encuentra en estos productos es el arsénico, seguido del zinc y cromo. El mercurio es el menos abundante pero también se encuentra presente siempre (tabla1). El fumar también representa otra fuente de contaminación con metales. Cada cigarrillo tiene 1-2 μg Cd, 1.4 μg Cr, 2-6 μg Ni y 21-84 μg Pb, de

los cuales el 0.3-10% es liberado en el humo y es posteriormente inhalado.

Cuando se fuma un cigarrillo, se incorpora en el organismo hasta 0.2µg de Cd,

0.14µg de Cr, 0.6µg de Ni y 5µg de Pb.¹⁷

Tabla 1. Contenido de metales pesados en productos de lavandería caseros^{18[a]}

Producto	Consumo (Kg/año/ per capita)	As (total)	Zn	Cr (total)	Cu	Ag	Ni	Cd	Pb	Hg
Detergen- tes	14.2	7.8	5.2	<1	0.7	<0.5	0.5	0.4	0.2	0.025
Blanquea- dores	5.1	10	3.9	<1	0.25	<0.5	<0.5	<0.45	<0.2	<0.025
Suavizan- tes	2.2	0.01	0.5	<1	<0.2	<0.5	<0.5	<0.2	<0.2	<0.025

a Datos recopilados en el área de la bahía en San Francisco, California. Se muestran los valores promedio de cada metal en mg metal/ Kg producto o ppm. Se han incluido detergentes líquidos y en polvo utilizados para ropa y para platos. Los blanqueadores también son líquidos y sólidos. En general los productos de lavado en polvo poseen una mayor cantidad de metales que los productos líquidos.

En México, la NOM-127 SSA I-1994 establece las concentraciones máximas de metales permisibles en el agua potable:

Tabla 2. Concentraciones máximas permisibles de metales en el agua de México

Metal	Límite permisible (mg/L o ppm)
Zinc	5.0
Cobre	2.0
Aluminio	0.2
Cromo Total	0.05
Arsénico	0.05
Plomo	0.025
Cadmio	0.005
Mercurio	0.001

Para la mayoría de los organismos vivos, la exposición a altas concentraciones de metales como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr(VI) , Ni^{2+} y Pb^{2+} resulta extremadamente tóxica. Algunos metales, en particular el Cr(VI) , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y As(III) son potencialmente cancerígenos y resultan ser muy dañinos para humanos y otros mamíferos pero no lo son para bacterias, debido a que los organismos procariontes han desarrollado mecanismos muy eficientes de resistencia a metales.

La toxicidad de los metales a nivel molecular y celular se debe principalmente a su interacción con los grupos tioles y carboxilatos de las proteínas¹⁹ y también a su capacidad de generar radicales libres²⁰. La genotoxicidad de los metales está asociada a la inducción de daño oxidativo al DNA. El orden de toxicidad

de los metales más comunes en algas, levaduras, plantas y animales es $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, donde la posición del Cu^{2+} y el Cd^{2+} depende principalmente del organismo. A pesar de esto, en sistemas terrestres y de aguas contaminadas existe el desarrollo de gran variedad de plantas, hongos y protistas, lo cual nos indica que estos organismos poseen la capacidad de lidiar con los efectos tóxicos producidos por la mezcla de metales.¹⁷

Mecanismos involucrados en el daño oxidativo producido por metales.

Se sabe que los metales de transición actúan como catalizadores en algunas reacciones biológicas oxidativas, por lo que la toxicidad asociada a estos puede deberse principalmente al daño oxidativo que causan en los tejidos. Metales como el hierro, cobre y cromo sufren reacciones de óxido-reducción (redox), mientras que metales como el plomo, cadmio y mercurio, agotan a los antioxidantes más importantes de la célula, principalmente aquellos que contienen grupos tioles.

Ya sea que se trate de metales que llevan a cabo reacciones redox o no, ambos tipos incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁴⁸. Cuando la producción de ROS se encuentra exacerbada y la producción intrínseca de antioxidantes no es suficiente, se genera una condición denominada “estrés oxidativo”⁴⁸. Cuando las células se encuentran en esta condición presentan algunas disfunciones que se atribuyen a lesiones

en los lípidos, proteínas y en el DNA causadas por las ROS. Parte de la toxicidad de los metales pesados está asociada a esta generación de ROS²⁰.

El proceso de captación de metales

En general, el proceso de biosorción de metales mediante células vivas se lleva a cabo en dos pasos. Primero los iones metálicos son adsorbidos en la superficie de las células por medio de interacciones con grupos funcionales como carboxilo, fosfato, hidroxilo, amino, sulfuro presentes en la superficie celular. El primer paso, también denominado como “biosorción pasiva” es independiente del metabolismo y ocurre rápidamente a través de uno o la combinación de cualquiera de los siguientes mecanismos de quelación de metales: coordinación, complejación, intercambio iónico y adsorción física (electrostática). La biosorción pasiva es un equilibrio dinámico de adsorción-desorción reversible. Los iones metálicos unidos a la superficie pueden ser eluidos por otros iones, ácidos o agentes quelantes.

En el segundo paso, los iones metálicos penetran la membrana celular e ingresan a la célula, este proceso recibe también el nombre de “biosorción activa”⁴

Acumulación/precipitación extracelular

Algunos microorganismos procariontes (bacterias, Archaeas) y eucariontes (algas y hongos) pueden producir o excretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como polisacáridos, glicoproteína, lipopolisacáridos,

péptidos solubles, etc. Estas sustancias poseen una cantidad sustancial de grupos funcionales aniónicos capaces de adsorber los iones metálicos. Existen algunos trabajos publicados de biosorción de metales mediante EPS enfocados principalmente en organismos bacterianos como *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias reductoras de sulfato⁵ entre otras, mientras que los estudios de EPS en hongos o algas son escasos.

Acumulación/precipitación intracelular

Cuando la concentración extracelular de iones metálicos es más alta que la intracelular, los iones metálicos pueden penetrar en la célula a través de la pared celular y membrana por medio de difusión libre. Los iones metálicos también pueden ingresar a la célula cuando ésta se encuentra dañada ya sea por causas naturales (autólisis) o algún factor externo (una fuerza mecánica o tratamiento con álcali). El proceso anterior es independiente del metabolismo⁴.

Por otra parte, el proceso de acumulación intracelular que se persigue con fines biorremediadores, está relacionado con células vivas, consume energía y es dependiente del metabolismo activo. Los iones metálicos transportados a través de la membrana celular son transformados en otras especies o precipitados dentro de la célula por células metabólicamente activas.

Después de su entrada en la célula, los iones metálicos son compartimentalizados en diferentes organelos (mitocondria, vacuola, etc.)⁴

Mecanismos de resistencia de algunos organismos a metales pesados

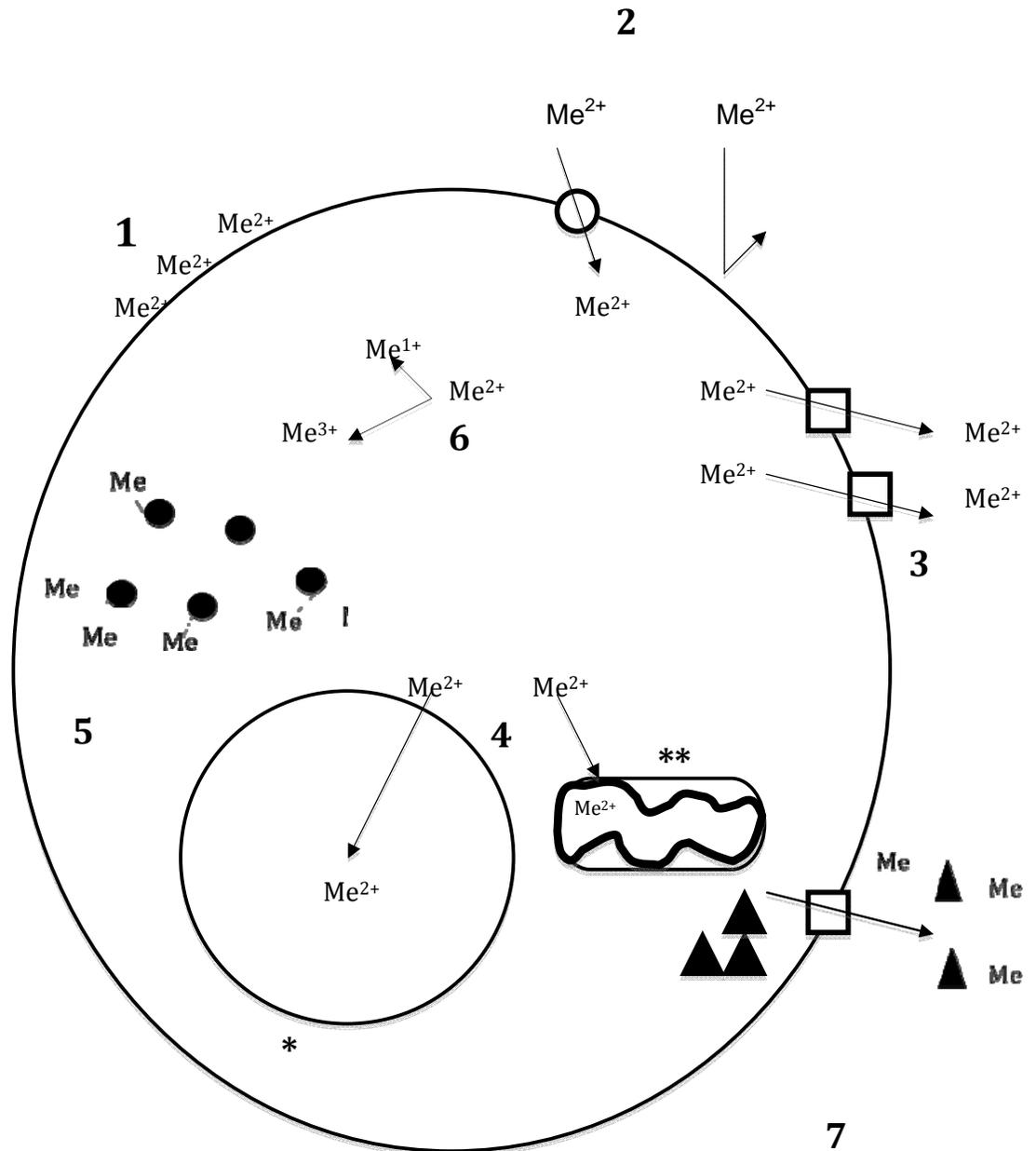
Se ha observado que la tolerancia de los seres vivos a los metales pesados se debe a diversos mecanismos; entre ellos [Fig. 1 mecanismo 1] la unión del metal a la pared celular y a la cara externa de la membrana plasmática, con lo cual se impide el paso de éste hacia el interior celular; [Fig. 1 mecanismo 2] reducción del transporte a través de la membrana celular, como en el caso de *Brassica juncea* en exposiciones frente a cromo donde se ha observado que cuando el medio es rico en sulfato, la acumulación intracelular de cromo disminuye y cuando se priva a la célula de sulfato, el cromo intracelular aumenta, lo cual se atribuye a que el anión cromato posee similitud estructural con el anión sulfato y por esta razón es capaz de entrar a la célula utilizando los transportadores que existen para éste, y por lo tanto cuando se encuentran los dos en el medio existe una competencia por la afinidad del transportador y disminuye así el ingreso de cromato a la célula¹², [Fig. 1 mecanismo 3] expulsión activa, por medio de la cual sale mayor cantidad de metal que la que entra. Cervantes *et al.*¹³ demostraron que la acumulación de cromato por cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* es cuatro veces mayor que la de cepas sensibles, hecho que respalda la existencia de un sistema de expulsión de cromato dado por un determinado plásmido presente en la cepa resistente. También existen otros mecanismos como [Fig. 1 mecanismo 4] la compartimentalización del metal en vacuolas y otros organelos intracelulares; junto con la formación de complejos con agentes quelantes como [Fig. 1

mecanismo 5] las metalotioneínas y las fitoquelatinas (proteínas), compuestos orgánicos como citrato, malato o por compuestos inorgánicos como sulfuro, fosfatos, etc¹⁷. La exposición del protista *Euglena gracilis* a cadmio induce un incremento en la síntesis de tioles solubles como cisteína, glutatión y fitoquelatinas.^{14,15} Estos tioles poseen uno o varios residuos de cisteína que son capaces de inactivar al metal quelándolo. [Fig. 1 mecanismo 6] La biotransformación se da por reducción u oxidación del metal o por alquilación del mismo; y [Fig. 1 mecanismo 7] la precipitación y atrapamiento por secreción de compuestos en el medio extracelular¹⁷.

En las bacterias los mecanismos de resistencia predominantes son aquellos relacionados con la expulsión activa de los metales del citosol a través de ATPasas y sistemas de eflujo de iones. Por otra parte, en algunas levaduras, plantas superiores y algunos protistas, la resistencia está asociada con la acumulación interna del ión tóxico, ya sea en vacuolas o en organelos tan importantes como la mitocondria y el cloroplasto¹⁷. Este último mecanismo puede ser útil a futuro en el diseño de estrategias de biorremediación.

Figura 1. Mecanismos celulares de protección contra los Metales pesados.
 Tomado de Rodriguez-Zavala et al.

El esquema muestra los diferentes mecanismos utilizados por los organismos para contender contra metales. * vacuola, ** mitocondria. Las moléculas quelantes como malato y citrato se representan con triángulos, mientras que los monotoles o fitoquelatinas se muestran con círculos.



- En bacterias, las ATPasas de tipo P constituyen la defensa básica contra metales pesados catiónicos.

Las ATPasas de tipo P constituyen una superfamilia de proteínas de transporte que funcionan gracias a la hidrólisis de ATP. Sus sustratos son cationes inorgánicos como H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} y Cd^{2+} . Una ATPasa de tipo P puede importar su sustrato desde el exterior o periplasma hacia el citoplasma (ATPasa importadora) o bien, exportarlo del citoplasma al exterior (ATPasa exportadora). Dentro de la homeostasis de metales pesados, las ATPasas de tipo P son importantes por dos grandes razones: primero, porque los sistemas importadores de macroelementos como el Mg^{2+} podrían contribuir en la importación de metales pesados¹ y porque las ATPasas de tipo P exportadoras pueden detoxificar metales pesados a través de mecanismos de expulsión.

Otros sistemas exportadores de metales pesados es la familia de proteínas CHR (cromato reductasa)^{2,3}

- Las proteínas de tipo CHR detoxifican cromato

La familia de CHR contiene proteínas que están unidas a la membrana citosólica por 10 dominios transmembranales y son probablemente bombas de eflujo del anión cromato^{2,3} dirigidas por el gradiente quimiosmótico. Dado que la exportación del anión es en dirección del campo eléctrico de la fuerza protón

motriz, la diferencia transmembranal en el potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) por sí misma es suficiente para conducir la expulsión del cromato.

La vía de asimilación de azufre como precursora de compuestos antioxidantes

Uno de los mecanismos de protección contra la toxicidad de metales que mejor se ha descrito para algunas levaduras, algas, protistas fotosintéticos y plantas es el de quelación intracelular ya sea por glutatión (GSH) o fitoquelatinas (PCs). Estos péptidos son capaces de unirse a gran variedad de metales en el citosol y dependiendo del organismo, estos complejos formados por metal-PC o metal-(GSH)₂ pueden ser transportados activamente hacia el interior de la vacuola.²²

El GSH se encuentra presente en todos los organismos y participa en múltiples procesos metabólicos, por ejemplo, en la regulación intracelular del estado redox, inactivación de ROS, transporte de aminoácidos GSH-conjugados y almacenamiento de azufre y cisteína proveyendo así hasta el 90% del azufre no protéico a la célula.²³ La síntesis de GSH, comenzando desde sulfato inorgánico, requiere de la vía de asimilación de azufre (SAP) y la vía de biosíntesis de cisteína. La regulación genética y bioquímica de estas vías es compleja y se ve afectada por diversas condiciones de estrés como exposición a metales pesados, estrés oxidativo y deficiencias en azufre o nitrógeno.

La captación de sulfato

El sulfato proveniente del medio es co-transportado hacia el interior de las células junto con $3H^+$ mediante un proceso dependiente de energía y que es catalizado por permeasas de membrana específicas [Fig 2. reacción 1]. Se han descrito en diversos organismos, transportadores de sulfato de alta (HAST) y baja afinidad (LAST). En plantas, una vez que ha sido tomado por las raíces, el sulfato es distribuido en los diferentes órganos y para poder ser asimilado tiene que ser reducido mediante un proceso que se lleva a cabo en los cloroplastos. En *Arabidopsis sp.* los HASTs están principalmente involucrados en el transporte del sulfato del medio a las raíces, mientras que los LASTs (los cuales se expresan en raíces y hojas) son los responsables de la distribución del sulfato del apoplasto a los diferentes tejidos dentro de la célula²⁴. La expresión de los genes que codifican los transportadores de sulfato en plantas está regulada por la disponibilidad de sulfato en el medio externo, por los requerimientos intracelulares y el GSH.²⁵

En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se han identificado dos transportadores de sulfato; uno que se expresa en células que crecen en un medio deficiente de azufre y otro que lo hace en células que crecen en medio con azufre. Después de realizar los análisis cinéticos se encontró que LAST es el que se encuentra presente en células crecidas con medio completo, mientras que HAST se induce cuando la célula es privada de azufre.²⁶

La activación del sulfato (ATP sulfurilasa)

El segundo paso en la vía es catalizado por la enzima ATP sulfurilasa (ATPS) [Fig. 2 reacción 2]. Esta enzima activa al SO_4^{2-} por medio de una reacción dependiente de ATP que conlleva a la formación de APS y pirofosfato (PPi). Esta reacción no está favorecida termodinámicamente, por lo que se le puede considerar como paso limitante de la vía.

Reducción de sulfato a sulfito (APSK, PAPS, APSR, SiR)

Para completar la incorporación de azufre en las biomoléculas, específicamente en los aminoácidos, el sulfato de APS es transformado en sulfito y éste a su vez en sulfuro. Este proceso puede ocurrir a través de dos diferentes vías dependiendo del organismo. Una de estas vías involucra la fosforilación de APS por una APS cinasa (APSK) [Fig. 2 reacción 3] y el uso de ATP para dar origen a PAPS y ADP. En la siguiente reacción la PAPS reductasa (PAPSR) reacciona primero con la tiorredoxina reducida y posteriormente con PAPS para producir SO_3^{2-} libre [Fig. 2 reacción 4]. La otra vía involucra la reducción directa de APS por la APS reductasa, la cual usa GSH como donador de electrones para así producir SO_3^{2-} [Fig. 2 reacción 5]. En algas y algunas bacterias, el SO_3^{2-} es sintetizado mediante APSK, mientras que en plantas, algas verdes y bacterias fototrópicas el sulfato es transformado a sulfito por APSR.

Una vez que el sulfato ha sido reducido a sulfito, el siguiente paso es idéntico en bacterias, hongos y plantas. El sulfito es reducido a sulfuro a expensas de la

oxidación de tres moléculas de NADPH por acción de la enzima sulfito reductasa (SiR) [Fig. 2 reacción 6], la cual cataliza dicha reducción usando los electrones donados por la ferredoxina.

Biosíntesis de Cisteína (SAT, HAT, OAS/OAH TL, β -CTS y γ -CTL)

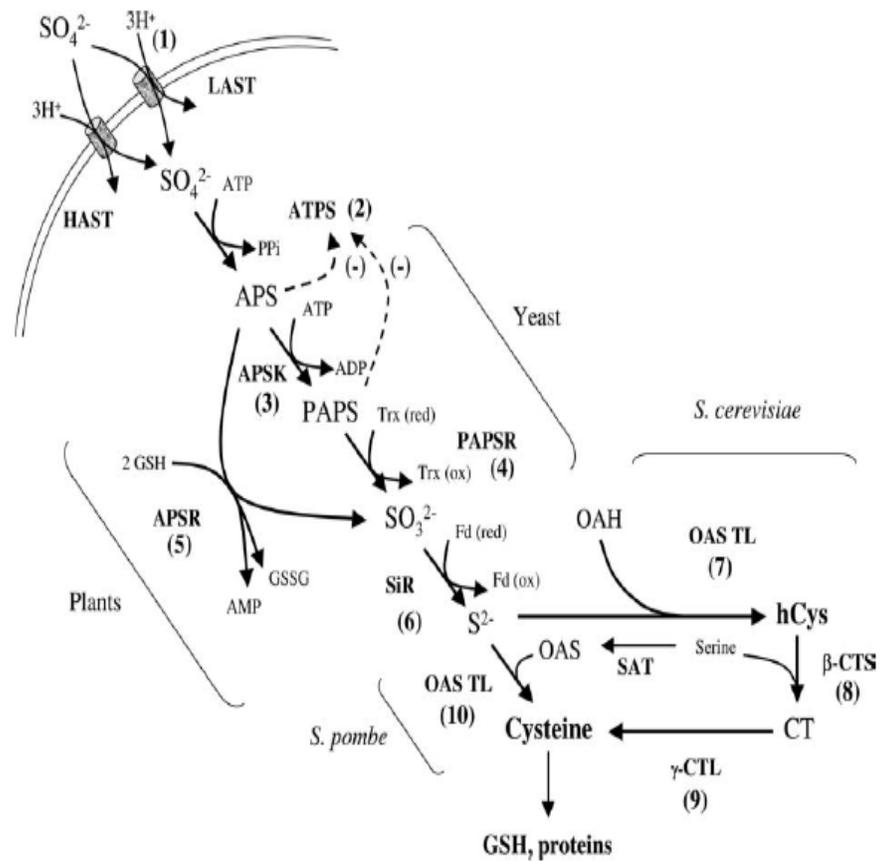
Dependiendo del organismo del que se trate, existen dos diferentes formas de incorporar el sulfuro a un esqueleto de carbono para producir cisteína:

1. El sulfuro es condensado con O-acetilserina (OAS) por la OAS tiol liasa (OAS TL) para formar así la cisteína directamente²⁸ [Fig. 2 reacción 10]. En esta ruta la OAS es sintetizada por la serina acetil transferasa (SAT).
2. La OAS tiol liasa también cataliza la condensación de sulfuro con O-acetilhomoserina (OAH) para formar homocisteína (hCys) [Fig. 2. reacción 7]. La OAH es sintetizada por la homoserina O-acetiltransferasa (HAT). Posteriormente, la hCys es transformada en cisteína mediante trans-sulfuración [Fig. 2 reacción 8][Fig. 2 reacción 9]. En otras palabras, la hCys se asocia con serina para formar cistationina (CT) por acción de la cistationina β -sintasa (β -CTS). La CT es disociada en cisteína (Cys), α -cetobutirato y amonio por la acción de la cistationina γ -liasa (γ -CTL)

La vía de SAT es utilizada por bacterias entéricas y por plantas. Los hongos utilizan diferentes rutas biosintéticas de cisteína dependiendo de la especie. *S. cerevisiae* utiliza la vía de CT³⁰, mientras que *S. pombe*

carece de enzimas para la transulfuración pero posee las de la vía de SAT.^{29b}

Figura 2. Vía de asimilación de azufre (SAP) tomado de Mendoza-Cózatl *et al.*⁴⁷



Representación de la vía de asimilación de azufre (SAP) y biosíntesis de cisteína. Las reacciones numeradas fueron previamente descritas en el texto.

Biosíntesis de Glutación (γ -ECS, GS)

La biosíntesis de GSH es similar en plantas, levaduras y protistas. El glutación es un tripéptido constituido por (γ -GluCys)Gly que se sintetiza intracelularmente y es exportado al exterior de la célula donde ejerce su función antioxidante.

La síntesis del glutación se lleva a cabo a partir de cisteína y ocurre mediante dos reacciones consecutivas dependientes de ATP. En el primer paso, la γ -glutamilcisteína (γ -EC) es formada a partir de L-glutamato y L-cisteína por medio de la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS). El segundo paso es catalizado por la glutación sintetasa (GS), la cual adhiere glicina al carbono terminal de la γ -EC formando así el glutación (GSH)³¹

La L- γ -glutamilcisteína sintetasa es inhibida por glutación y es el paso limitante en la síntesis de éste. El glutación funciona como antioxidante al interactuar directamente con radicales libres, también es el sustrato de las glutación peroxidasas y las glutación transhidrogenasas.

Una gran cantidad de reacciones que ocurren dentro de la célula dependen del glutación. Estas reacciones incluyen aquellas que dan origen a los desoxirribonucleótidos y ascorbato, así como aquellas reacciones que implican la conversión de disulfuros a sus correspondientes tioles.

Biosíntesis de fitoquelatinas

Las fitoquelatinas (PCs) son péptidos cuya fórmula general es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_{2-11}\text{-Gly}$ y son sintetizados a partir de moléculas de GSH por la fitoquelatina sintasa (PCS). Se ha identificado PCS en algunas levaduras³², plantas superiores³³, algas³⁴ y protistas.³⁵ Los metales pesados como el Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} son activadores de la enzima, siendo el Cd^{2+} su más potente activador.³⁶ Los genes que codifican para la PCS han sido clonados a partir de *S.pombe*, *A. thaliana*, *Triticum aestivum*, *Brassica juncea*, *Thlaspi caerulescens* e inclusive del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, entre otros.³⁶

Las fitoquelatinas tienden a coordinarse con metales pesados; están implicadas en la homeostasis y respuesta celular a intoxicación con éstos. Su función es análoga a la de las metalotioneínas en los animales y algunos hongos.

Al tener varias cisteínas en su estructura, las PCs poseen grupos tioles disponibles para quelar ROS y metales pesados que son responsables del estrés oxidativo y daños a la célula.

Regulación de la SAP y síntesis de Cys y GSH

Regulación metabólica

No se ha realizado un análisis de control sistemático sobre la SAP y las rutas biosintéticas de Cys, GSH y PCS todavía. Sin embargo, se han sugerido las siguientes observaciones acerca de los posibles mecanismos responsables del control.

En *S. cerevisiae*, el transporte de sulfato es inhibido por el sulfato interno y por metabolitos derivados de la reducción del mismo, como APS y cisteína³⁷. La OAS incrementa la actividad de todas las enzimas de la vía de asimilación de azufre, mientras que la cisteína disminuye algunas de ellas. La acetil serina transferasa (SAT) está fuertemente inhibida por la cisteína. Por consiguiente, si los niveles de cisteína disminuyen, se activa la SAT, incrementando consigo los niveles de OAS y activando así la asimilación de sulfato. Cuando se restablecen los niveles de cisteína, las enzimas de la SAP y la acetil serina transferasa se inhiben de nuevo.³⁸

Para la síntesis de GSH, se ha establecido que la inhibición por retroalimentación de la γ -ECS por glutatión es el principal mecanismo de regulación. El GSH debe de ser consumido y no sólo oxidado para poder revertir la inhibición de la γ -ECS y de esta manera activar la vía. La PCS y las Glutatión S-transferasas catalizan reacciones que consumen GSH y como consecuencia, su activación es capaz de revertir la inhibición de la γ -ECS por GSH promoviendo el flujo de la vía. Por esta razón, deben considerarse las

enzimas consumidoras de GSH cuando se esté analizando la síntesis del mismo.

Mecanismos de resistencia a Cd²⁺ mediados por GSH y PC

Levaduras y plantas

El mecanismo más importante para la resistencia a Cd²⁺ en levaduras como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Candida glabrata* y en plantas, es la compartimentalización en la vacuola.³⁹ El cadmio puede ser transportado hacia el interior de la vacuola en forma de ión libre o asociado a compuestos tiolados (GSH o PCs).⁴⁰ En *S. pombe*, *C. glabrata*, algunas algas y plantas, los complejos PC-Cd, el Cd²⁺ libre y el sulfuro forman complejos de alto peso molecular (HMWC) en el interior de la vacuola, que es el almacén más estable para el cadmio en el interior de la célula.⁴¹

Algas verdes unicelulares y *Euglena gracilis*

Euglena gracilis es un protista fotosintético con alta tolerancia al Cd²⁺ y gran capacidad de acumulación del mismo. Debido a que este organismo no posee vacuola, las células que han sido expuestas a concentraciones de Cd²⁺ almacenan alrededor del 60% del metal en el cloroplasto¹⁷. Diversos reportes indican que la SAP, incluidos el GSH y la síntesis de fitoquelatinas, están directamente relacionados con el mecanismo de resistencia que este protista posee frente al Cd²⁺³⁵. Cuando células de *E. gracilis* se exponen a CdCl₂, sus

niveles intracelulares de cisteína, GSH y PCs se incrementan alrededor de 12 veces más que las células que no han sido expuestas. Se ha observado que estas diferencias metabólicas ocurren en el citosol y sobretodo en el cloroplasto.⁴²

Las fitoquelatinas han sido descritas en diversos grupos de algas, incluyendo clorofitas, xantofitas, diatomeas, feofitas y rodofitas,³⁴ pero no hay información detallada acerca de la función que estos péptidos desempeñan o si están involucrados en el transporte de cadmio hacia el interior de organelos celulares.

El incremento en la síntesis de fitoquelatinas está asociado con una mayor resistencia al estrés oxidativo. En el alga verde *Dunaliella tertiolecta*, el incremento en las PCs inducido por el Zn^{2+} resulta en una mayor resistencia a ROS producidas por H_2O_2 y Paraquat.⁴³ Dicha protección es el resultado de una reacción más fuerte entre el H_2O_2 y la PC_3 que aquella con GSH o ascorbato.

Chlorella vulgaris y algunas plantas acumulan prolina cuando han sido expuestas a metales, ya que este aminoácido es capaz de reaccionar de manera directa con los radicales libres disminuyendo así el daño por estrés oxidativo.⁴⁴

Incremento en la síntesis de glutatión y fitoquelatinas

Cuando se piensa en organismos destinados con fines de biorremediación o en aquellos que sean capaces de incrementar el contenido de metales esenciales

en los cultivos agrícolas, se busca que tengan si no todas, algunas de las siguientes características:

1. Rapidez para la captación del metal
2. Un mecanismo eficiente para la inactivación o secuestro del metal
3. Almacenamiento adecuado del metal
4. Gran producción de biomasa
5. En el caso de las plantas, un adecuado sistema de transporte del metal de las raíces a los tallos.

La clonación de los genes involucrados en la vía de asimilación de azufre, la síntesis de GSH-PCs y el transporte intracelular de los complejos metálicos, ha contribuido a que diversos grupos de trabajo mejoren la capacidad de las células para resistir-acumular cantidades de metales mediante la sobreexpresión de algunas de las enzimas involucradas en dichos procesos.

A pesar de que muchos grupos han obtenido resultados prometedores en cuanto al incremento de la biosíntesis de GSH y resistencia a metales⁴⁵, otros no han tenido éxito. Ello probablemente se deba a que muchos de estos experimentos de sobreexpresión se basan en el incremento de una sola enzima, la supuesta “enzima limitante” sin considerar factores como la disponibilidad del sustrato, la posible inhibición por producto de la enzima sobreexpresada, o la acumulación de intermediarios tóxicos para la célula.⁴⁶

Es evidente que la sobreexpresión simultánea de varias enzimas es técnicamente muy difícil, por lo que un adecuado análisis de control de la síntesis de Cys, GSH y PCs en condiciones de estrés y normales puede guiar

en la identificación de un conjunto de enzimas que necesitarían ser moduladas para lograr el incremento de los flujos o la propia concentración de metabolitos⁴⁷.

**APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS
MICROORGANISMOS COMO BIORREMEDADORES**

Utilización de bacterias provenientes de suelos serpentinos para la biorremediación de metales pesados.

Los suelos serpentinos o ultramáficos se producen por el desgaste de rocas ígneas ultramáficas que se caracterizan por tener altos niveles de Ni, Cr y Co, así como bajos niveles de calcio y magnesio. Existen plantas endémicas de estos suelos que son capaces de acumular concentraciones muy elevadas de Ni, Zn y Co, las cuales son conocidas como “hiperacumuladores”, ejemplos de ellas son *Thlaspi caerulescens* y *Alyssum murale*¹¹. Cuando estas plantas alcanzan la madurez, se cosecha la biomasa enriquecida con metales y una fracción de la contaminación en el suelo habrá sido removida. Desafortunadamente todos los hiperacumuladores hasta ahora identificados son pequeños y de crecimiento lento. Más aún, la alta concentración que pueden alcanzar los metales resulta ser tóxica para la mayoría de las plantas, limitando así su crecimiento y dañando su metabolismo. Estas características tienen un efecto negativo en el potencial de fitoextracción de metales de las plantas y restringen por tanto el uso de esta tecnología. Cabe mencionar que existen interacciones entre los metales, microorganismos de la rizósfera y las plantas que son de interés debido al potencial biotecnológico que poseen estos microorganismos de remover el metal directamente de suelos contaminados o la posibilidad de que exista una transferencia de lo acumulado hacia las plantas superiores. La rizósfera provee un microambiente dinámico y complejo donde los microorganismos, en conjunto con las raíces, forman comunidades únicas que poseen un potencial importante para la detoxificación de materiales nocivos. Las bacterias de la rizósfera juegan un papel importante en el

crecimiento de las plantas en los suelos serpentinos por medio de mecanismos como fijación del nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos o producción de reguladores del crecimiento (hormonas), participan en la solubilización de minerales que contienen metales pesados haciéndolos más asimilables. También poseen mecanismos de tolerancia frente a exposiciones a metales pesados tales como exclusión activa, biosorción, precipitación o bioacumulación en espacios extra e intracelulares. Estos procesos pueden influenciar la solubilidad y la biodisponibilidad del metal en la planta, modificando así los efectos tóxicos de éste. Zaidi *et al.* (2006)^{6b} y Jiang *et al.* (2008)^{6a} reportaron haber obtenido concentraciones más altas de metales pesados en plantas gracias a la inoculación previa con bacterias provenientes de la rizósfera. La inoculación de plantas con aislados serpentinos puede contribuir reduciendo los efectos fitotóxicos del metal ya que los microorganismos comparten la cantidad de metal con las plantas gracias a su habilidad de biosorción y bioacumulación. Las bacterias poseen superficies que interactúan fuertemente con iones metálicos en solución, pueden adsorber una mayor cantidad de metales pesados que cualquiera de los componentes inorgánicos del suelo como montmorillonita, caolinita o vermiculita, ya que la célula (de aproximadamente $1.0-1.5 \mu\text{m}^3$) posee una relación área/volumen muy grande, lo que le permite una gran capacidad de adsorción e inmovilización de los iones tóxicos. Además es capaz de acumular una mayor cantidad de metal gracias a procesos que pueden o no ser dependientes del metabolismo, tanto pasivo como activo.²¹

Los microorganismos que son aislados de ambientes naturales que se encuentran contaminados con metales pesados exhiben tolerancia a múltiples

contaminantes puesto que se han adaptado a éstos. La selección apropiada de aislados resistentes a metales que provengan de suelos contaminados puede llegar a utilizarse como una estrategia de biorremediación. Actualmente, las áreas serpentinas son consideradas como un interesante modelo para la evolución de los microorganismos resistentes a metales y que son promotores del crecimiento de plantas. Este modelo resulta totalmente diferente de aquél que se ha evaluado para suelos artificialmente contaminados.²¹

Por lo tanto, el aislamiento de bacterias benéficas y adaptadas al estrés figura como una potencial herramienta biotecnológica para posteriormente inocular plantas y así poder restaurar exitosamente ecosistemas contaminados con metales pesados.

Caracterización de las bacterias de suelos serpentinos

La contaminación por metales pesados no sólo afecta aspectos relativos a las plantas, también provoca cambios en el tamaño, composición y actividad de la comunidad microbiana⁷. El estrés abiótico causado por los metales afecta el crecimiento, morfología y metabolismo de los microorganismos que habitan el suelo.

La diversidad microbiana en los suelos serpentinos depende de características como temperatura, humedad, cantidad total de metales y la disponibilidad del carbono orgánico.

La flora bacteriana asociada a las plantas hiperacumuladoras tales como *Sebertia acuminata*, *Thlaspi goesingense*, *A. bertolonii* y *A. murale* ha sido

aislada y caracterizada de diferentes suelos serpentinos^{8,9,10,11} y se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Plantas hiperacumuladoras y sus bacterias asociadas en suelos serpentinos²¹

Lugar de aislamiento	Origen	Método	Organismo/cepa	Referencia
Islas Andaman, India	Sedimento	Dilución y placa	<i>Bacillus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	Pal et al. (2004)
Chidyatapu, India	Rizósfera de <i>Rinorea bengalensis</i> y <i>Dichapetalum gelonioides</i> ssp. <i>andamanicum</i>	Dilución y placa	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. y <i>Cupriavidus</i> sp.	Pal, Wauters y Paul (2007)
Braganca, Portugal	Sedimento	Dilución y placa	<i>Bacillus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	Rajkumar y Freitas (2008a)
Cave Junction, Oregon	Sedimento y Rizósfera de <i>Alyssum murale</i>	Dilución y placa	<i>Acidovorax avenae</i> , <i>Arthrobacter ramosus</i> , <i>Pseudomonas riboflavina</i> , <i>Rhizobium etli</i> , <i>R. galegae</i> , <i>R. gallicum</i> , <i>R. mongolense</i> , <i>Sphingomonas asaccharolytica</i> , <i>S. macrogoltabidus</i> , <i>S. alaskensis</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>B. niacini</i> , <i>Mesorhizobium loti</i> , <i>M. oxydans</i> , <i>Nocardioides simplex</i> , <i>Paenibacillus amylolyticus</i> , <i>Paenibacillus lautus</i> , <i>Sinorhizobium fredii</i> y <i>Stenotrophomonas minatitlanensis</i>	Abou-Shanab et al. (2003a); Abou-Shanab, van Berkum, y Angle (2007)
Toscana, Italia	Rizósfera de <i>Alyssum bertolonii</i>	Dilución y placa	<i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Streptomyces</i> sp.	Mengoni et al. (2001)
Redschlag, Austria	Rizósfera y tejidos de tallo de <i>Thlaspi goesingense</i>	Técnicas de cultivo independiente	<i>Acidobacterium</i> , <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>	Idris et al. (2004)

El uso de algas para remover los iones de metales pesados de aguas residuales.

Las algas poseen muchas características que las hacen posibles candidatas en el terreno de la biorremediación de suelos y aguas contaminadas. A pesar de esto, se han hecho pocos esfuerzos para utilizar su biomasa con el fin de remover iones metálicos de soluciones acuosas.⁹³ Se conocen miles de especies de algas y sólo algunas han sido investigadas por su capacidad de sorción de metales y su potencial uso en el tratamiento de aguas residuales. Los experimentos de biosorción de metales se han realizado con algas verdes de agua dulce como *Chlorella spp.*, *Cladophora spp.*, *Scenedesmus spp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* entre otras; algas cafés como *Sargassum natans*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, etc., y en algas verde azules como *Microcystis aeruginosa* y *Oscillatoria spp.*⁹³

La capacidad de sorción de las algas a determinado metal varía ampliamente de especie a especie e incluso entre cepas de una misma especie, aunque esto puede ser causa de condiciones experimentales variables en diferentes estudios.⁹³ Chojnacka *et al.*⁹⁴ han sugerido que cuando las células crecen bajo diferentes condiciones, se presentarán variaciones en la composición de sus paredes celulares y por lo tanto exhibirán diferentes características de biosorción.

Algunas algas muestran gran afinidad por un ion metálico en particular, mientras que otras no muestran dicha especificidad y son capaces de unir diversos iones metálicos. En general, los iones metálicos más electronegativos

y con el menor radio iónico son los que biosorben preferencialmente las algas.⁹³

Las algas cafés como *Ascophyllum spp.* y *Sargassum spp.*, pueden biosorber una mayor cantidad de determinado metal que otras algas gracias a su alto contenido de alginato (polisacárido), el cual es capaz de quelar una mayor cantidad de metales libres.

Lee *et al.*⁹⁵ evaluaron la capacidad de adsorción de Cr(VI) de 48 especies de algas rojas, cafés y verdes marinas y hallaron que existe una extraordinaria selectividad de biosorción de Cr(VI) en el alga *Pachymeniopsis sp.* (rodofita). También se encontró que esta alga es pobre al biosorber otros iones metálicos del agua.

La capacidad de remoción de metales que poseen las algas es comparable y muchas veces mayor que la de otros sorbentes inorgánicos como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Avances recientes en la eficiencia de remoción de metales pesados por algas y otros materiales. Modificado de Mehta et al.⁹³

Sorbente del metal	Metal	Concentración inicial del metal (mg/L)	% de eficiencia de remoción del metal
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Cd	500	98
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cu	10	72
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd	500	84
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ni	2.5	69
<i>Fucus vesiculosus</i>	Cd	500	98
<i>Pachymeniopsis sp.</i>	Cr	200	57
<i>Sargassum sp.</i>	Zn	98	99
<i>Scenedesmus abundans</i>	Cu	10	99
<i>Tetraselmis suecica</i>	Cd	45	60
Alginato	Ni	10	20
Alginato	Cu	10	40
Quitina	Cd	500	31
Pulpa seca de manzana	Cd	500	62
Polvo seco de madera	Cd	500	37
<i>Aspergillus terreus</i>	Cd	10	70
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cd	10	63
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cd	500	36

La eficiencia de remoción de metales de las resinas e intercambiadores iónicos más comúnmente usados es muy baja: de 10 mg/L de la concentración del metal en solución.⁹³ Sin embargo, las algas son capaces de remover casi en su totalidad los iones metálicos de soluciones que tienen baja concentración de los mismos.⁹⁶

Axtell, Sternberg y Claussen⁹⁷ reportaron haber obtenido la remoción del 97% de Pb de una solución que inicialmente tenía 39.4 mg/L del metal, mediante el

uso de la macroalga *Macrospora sp.* Muchas veces se da el caso de que las algas superan a otros biosorbentes en su capacidad de remover metales de soluciones acuosas. Esta característica nos permite pensar que la biomasa de las algas podría ser utilizada en forma de “biotrapa” para la remoción de metales provenientes de efluentes industriales.

Existe un producto comercial, “AlgaSORB®”, que está constituido por la pared celular de algas encapsulada en un gel y tiene alta afinidad por Hg, Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Zn, Ag, Au, etc.⁹⁸ Uno de los principales atributos de AlgaSORB® es que la presencia de altas concentraciones de iones comunes (Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , O^{2-}) no interfiere con la sorción de los iones metálicos a diferencia de las resinas sintéticas, las cuales son ineficientes en la remoción de metales cuando las aguas residuales tienen una alta concentración de sólidos totales disueltos (TDS).⁹⁸

La capacidad de biosorción de metales de las algas puede ser alterada por diversos factores como la concentración de metal, biomasa celular, pH, temperatura, la competencia de iones en el medio y la etapa metabólica en la que se encuentren.⁹³

1. La concentración inicial del metal:

La biosorción y remoción del metal dependen de la concentración inicial de los metales en solución. La biosorción generalmente aumenta cuando existe un incremento en la concentración del metal en solución y posteriormente se satura cuando se sobrepasa determinada concentración.⁹⁶

2. pH:

Muchos estudios han demostrado que la biosorción de metales se encuentra en función del pH de la solución. Diversos grupos de trabajo reportan que la biosorción parece aumentar cuando aumenta el pH de la solución.⁹³

Zhou *et al.*⁹⁹ reportaron que el pH óptimo para la biosorción de Cu y Cd por *Laminaria japonica* se encuentra en el intervalo de 4-5. Por otro lado, diversos estudios muestran que puede existir una sorción selectiva de determinados metales gracias a que tienen intervalos de pH óptimo de sorción que resultan ser muy amplios. Özer *et al.*¹⁰⁰ demostraron que la biosorción óptima de Pb y Cr(VI) por *Cladophora crispata*, ocurre a pH de 5 y 1, respectivamente. La diferencia en los valores de pH óptimos para la remoción de estos metales se encuentra en función de la naturaleza de la interacción química que sostienen con la célula. A pH de 5, las proteínas membranales de las células tienen una carga neta negativa en su superficie que favorece la unión de Pb(II) a sus ligandos.⁹³ Cuando el pH se encuentra por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas de superficie, las células tienen una carga neta positiva que inhibe la unión de los iones de Pb(II) que están positivamente cargados. Ocurre lo contrario en el caso del Cr(VI), el cual es aniónico por naturaleza y no va a unirse cuando el pH es alto, ya que de esta manera la superficie de las algas poseen carga neta negativa y existe repulsión. El Cr(VI) y otros aniones tienden a unirse a la superficie celular a pHs bajos cuando la superficie de la célula se encuentra

positivamente cargada.⁹³ En general, los pHs ácidos de 3-5 son los más favorables para la biosorción de los iones metálicos.⁹³

3. Concentración de biomasa

La cantidad de metal que puede ser recuperada de una solución es afectada por la concentración de biomasa. Roy *et al.*¹⁰¹ demostraron que un incremento en la biomasa de células disecadas y pulverizadas de *Chlorella sp.* disminuía la cantidad de Cd unida por unidad de masa celular. También reportaron una disminución del 91% de unión a Cd cuando se incrementó 12 veces la concentración de la biomasa de *C. minutissima*.

Mehta *et al.*⁹⁶ probaron el efecto de la concentración de biomasa en la biosorción de Cu y Ni (a diferentes concentraciones) por *C. vulgaris*. Sus resultados muestran que la biosorción (metal biosorbido por unidad de biomasa) de Cu y Ni resultó máxima a la concentración más baja de biomasa probada. Existen algunas posibles explicaciones a esta relación entre el aumento en la concentración de biomasa y biosorción del metal como disponibilidad limitada del ión metálico, un aumento en las interacciones electrostáticas e interferencia en los sitios de unión.¹⁰²

Itoh *et al.*¹⁰³ sugirieron que las interacciones electrostáticas entre células podrían jugar un papel primordial en la biosorción de metales, ya que una mayor cantidad de iones metálicos puede ser adsorbida cuando la distancia entre células se torna mayor.

Mientras que un aumento en la concentración de biomasa tiene un efecto negativo sobre la capacidad de biosorción (cantidad de metal

biosorbido por unidad de biomasa), la cantidad total de metal removido (% de la concentración inicial) por un biosorbente es mayor a mayores concentraciones de biomasa.⁹³

4. Temperatura

Se han obtenido resultados contrastantes en cuanto al efecto de la temperatura sobre la biosorción de metales. Aksu *et al.*¹⁰⁴ registraron haber obtenido aumento en la biosorción de Ni²⁺ por el alga verde *Chlorella vulgaris* cuando se aumentó la temperatura de 15° C (48.1 mg/g) a 45° C (60.2 mg/g). El aumento en la biosorción de metales debido a un incremento en la temperatura parece indicar que este proceso es endotérmico en las algas.⁹³ Contrario a esto, muchos estudios indican que el proceso es exotérmico. Tal es el caso de la biosorción de Cd²⁺ por *Sargassum sp.*, la cual disminuyó al aumentar la temperatura ambiente.¹⁰⁵

El incremento en la biosorción de los iones metálicos con el aumento de la temperatura ha sido adjudicado a la ruptura de enlaces que promueve la existencia de un mayor número de sitios activos capaces de unirse al metal.⁹³

5. La presencia de aniones y cationes en el medio

La presencia de otros cationes, incluidos otros iones metálicos, también afecta significativamente la biosorción de metales por las algas.⁹⁶

La reducción de la captación de metales pesados cuando se tiene la presencia de metales ligeros (Na, Li, Mg, Be) se atribuye principalmente

a la competencia que existe por los sitios celulares de unión, por precipitación o formación de complejos con carbonatos, bicarbonatos o hidróxidos de calcio.¹⁰⁶ La naturaleza de las impurezas difiere dependiendo del tipo de efluente a ser tratado. Las altas concentraciones de sales como NaCl en solución también disminuyen la velocidad de biosorción de las algas.⁹³ Corder y Reeves¹⁰⁷ demostraron que el Na disminuye la acumulación de Ni, Co y Cs en algunas algas y cianobacterias. Yun *et al.*¹⁰⁸ reportaron la supresión de biosorción de Cr(VI) y Va por la presencia de Na y Cl en el medio. Las altas concentraciones de cationes monovalentes como Na⁺ y K⁺ incrementan la fuerza iónica del agua residual. Dicho incremento es muchas veces el responsable de la disminución de la capacidad de biosorción de metal de la biomasa.¹⁰⁹ El efecto inhibitorio del Na es más pronunciado cuando se encuentra frente a metales cuya unión no es tan fuerte como es el caso del Zn o el Ni.⁹³

6. Otros factores

La cantidad de nutrientes, velocidad de crecimiento e iluminación son otros factores que influyen de manera importante en la biosorción de metales pesados por las algas vivas. Hall *et al.*¹¹⁰ reportaron haber obtenido una mayor acumulación de Cu en *Chlorella sp.* cuando el PO₄³⁻ del medio era limitado. El crecimiento de las algas aumenta cuando se aumenta la intensidad de la luz. La biosorción de metales también es modificada por la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo.⁹³

Mehta *et al.*⁹⁶ observaron que la adsorción de Ni en la superficie de *C. vulgaris* era mayor en los cultivos que se encontraban en la fase estacionaria que en aquellos cultivos que se encontraban en fase exponencial. Una explicación posible a este fenómeno es que existe una mejor exposición de los sitios de unión al metal o la creación de sitios adicionales en la superficie celular durante esta fase.⁹⁶

Cuando se busca biorremediar aguas contaminadas utilizando algas pero aprovechando otras de sus características y no sólo la absorción y/o adsorción (biosorción) se busca que el metal sea acumulado en el interior de la célula. *Euglena gracilis* es un modelo celular adecuado para el estudio de los mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en algas verdes. Este microorganismo pertenece al plancton de agua dulce y puede ser cultivado en el laboratorio bajo condiciones estrictamente controladas.¹⁷ Este protista unicelular flagelado y de vida libre posee la versatilidad genética y metabólica para crecer en medios con altas concentraciones de metales pesados, en particular de Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ y Cr⁶⁺ ^{17,111} bajo diferentes regímenes de ciclos de luz/oscuridad y en rangos de pH de 3-7.¹⁷

En condiciones heterotróficas, *Euglena sp.* es capaz de utilizar diversas fuentes de carbono como glucosa, lactato, acetato, glutamato, malato y etanol.¹¹² Estas características hacen que *Euglena sp.* sea un excelente modelo para estudiar los cambios en los mecanismos de resistencia a metales pesados como el Cd²⁺ bajo condiciones fototróficas y heterotróficas. Una de las principales consecuencias de esta diversidad metabólica es que cuando se crece a las células en condiciones fototróficas, el Cd²⁺ es acumulado principalmente en el

cloroplasto (> 60%), mientras que en células crecidas en la oscuridad se encuentra principalmente en la mitocondria (60-80%).¹¹³

Durante los procesos de purificación de agua es común observar el crecimiento espontáneo de especies de *Euglena*. En sondeos de cuerpos de agua que reciben efluentes ácidos provenientes de las minas, se han identificado de 24 a 76 especies diferentes de algas verdes y protistas; siendo *Euglena mutabilis* la especie más abundante y mayormente distribuída.¹¹⁴ En otros sondeos se ha identificado que la única especie fotosintética detectada es *E. gracilis*. La especie *Euglena mutabilis* es habitante natural de efluentes ácidos mineros que poseen un pH de 2.5-4.5, dicha característica es invaluable si se busca utilizarla con fines de biorremediación, ya que muchos de los efluentes contaminados son acídicos.¹¹⁵

Existen estudios que reportan altas concentraciones de Hg^{2+} acumulado en el alga verde *Chlorella sp.*¹¹⁶ La acumulación de mercurio en las células es posible gracias a que las bicapas lipídicas que conforman las membranas celulares son altamente permeables al $HgCl_2$ ¹¹⁷. Los efectos tóxicos que el mercurio tiene sobre *Euglena sp.* y otras microalgas son principalmente el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, inhibición de la fotosíntesis, estimulación de la respiración y pérdida del flagelo.¹¹⁸

Rodríguez-Zavala *et al.*¹⁷ reportan que la cantidad total de mercurio atrapada intracelularmente en *E. gracilis* después de incubaciones de 12-24 h (59-65 nmol) disminuye al noveno día de cultivo (35 nmol), mientras que la densidad celular incrementa alrededor de 13 veces. Esta observación sugiere que el Hg^{2+} internalizado permanece fuertemente unido pero se diluye por efectos de división celular y no ocurre acumulación posterior después de las 12 h de

incubación. Por lo tanto, la resistencia de *E. gracilis* al mercurio parece estar asociada a una disminución en la acumulación de este ión.

Ya se ha mencionado previamente que la acumulación de metales pesados en algunos organismos induce la síntesis de fitoquelatinas (PCs). El Hg^{2+} es un inductor pobre de la síntesis de las mismas, por lo que en este caso no ayudarían a la célula a aminorar los efectos producidos por la exposición al metal. En cambio, parece posible que la unión del Hg^{2+} a la pared celular y al GSH sean mecanismos protectores alternativos.¹⁷

En bacterias, la resistencia a Hg^{2+} se encuentra asociada a la reducción enzimática del mismo a mercurio volátil (Hg^0)¹¹⁹, operación que se lleva a cabo en minutos; mientras que la formación de mercurio volátil en algas requiere de varios días.¹¹⁶

Si se expone a *E. gracilis* fototrófica a Cd^{2+} se induce un incremento en los niveles celulares de tioles solubles en ácidos, tales como Cys, GSH y PCs.¹⁷

En *Euglena sp.* se ha observado un incremento significativo de Cys y GSH después de 3 días de exposición a Cd^{2+} , siendo 12 veces mayor que en células que no han sido expuestas.¹²⁰ El incremento en la concentración de Cys junto con el incremento en la expresión de las enzimas de la SAP (vía de asimilación de azufre): ATP sulfurilasa y adenililsulfato reductasa, también ha sido observado tras la exposición de *Brassica juncea*¹²¹ a Cd^{2+} . Esto indica que el flujo de la vía es estimulado por la presencia de Cd^{2+} .⁴⁷

La resistencia a Cd^{2+} en plantas superiores y algas se ha relacionado con la inducción de la síntesis de PCs, las cuales se unen al metal en el citosol y lo transportan a la vacuola.¹²² La compartimentalización de metales pesados también ha sido descrita en algas verdes. *Scenedesmus sp.* acumula

preferencialmente al cobre en el núcleo y la vacuola.¹²³ *Porphyra sp.* y *Fucus sp.* acumulan Cd^{2+} en el núcleo; mientras que *Chlamydomonas sp.* lo hace en el cloroplasto.¹²⁴

En resumen, las PCs son almacenadas en las vacuolas de plantas y en los cloroplastos de algas después de una exposición a Cd^{2+} .¹²⁴ Se ha reportado que las PCs también son almacenadas en las mitocondrias en el caso de *E. gracilis* heterotrófica¹²⁵. No se sabe aún si este mecanismo alternativo de almacenamiento es exclusivo de células no vacuolares o si las PCs pueden estar presentes también en la mitocondria y cloroplastos de algas y plantas.¹⁷

La compartimentalización de Cd^{2+} en las vacuolas y otros organelos ha sido propuesta como un mecanismo de protección contra los efectos dañinos de los metales.¹⁷

El potencial de las especies de *Penicillium* en el campo de la biorremediación.

El hombre ha utilizado a los hongos con diversos fines durante miles de años. Es bien sabido que éstos son capaces de degradar o causar deterioro a gran variedad de materiales y compuestos, procesos conocidos como micodegradación (como la degradación de polietileno) y micodeterioración, respectivamente.⁷⁶

Los hongos han desarrollado propiedades potenciales de biorremediación únicas que son resultado de su adaptación al ambiente.

Los hongos del género *Penicillium* poseen potencial de biorremediación para metales pesados y otros xenobióticos por lo que existen muchas razones por las cuales se debe considerar a estos organismos como candidatos a futuro para la biorremediación de suelos contaminados.⁷⁸ Las diversas especies de este género pueden colonizar diversos tipos de ambientes. Son comunes en el suelo, alimentos, bebidas y en el mismo aire.⁷⁷

Los hongos son de crecimiento lento y por lo general requieren de sustratos para llevar a cabo cometabolismo.⁷⁸ Por estas razones puede sugerirse que en general, los hongos son menos eficientes que las bacterias en la degradación de xenobióticos. Por otro lado, los hongos son más versátiles en cuanto a la variedad de sustratos que pueden utilizar, además de que la morfología y sus características de crecimiento son responsables de su rápida colonización.⁷⁸

La capacidad que posee la mayoría de los hongos para producir enzimas extracelulares que permiten la asimilación de carbohidratos complejos sin

hidrólisis previa hace posible la degradación de una gran variedad de contaminantes.⁷⁸ También tienen la ventaja de ser fácilmente cultivables en fermentadores, por lo que resultan completamente adecuados si se piensa en producciones a gran escala. Otra ventaja es que su estructura filamentosa permite la fácil separación de la biomasa fúngica por medio de filtración.⁷⁸ En comparación con las levaduras, los hongos filamentosos son menos sensibles a variaciones en nutrientes, aireación, pH, temperatura, etc. Además de que diversas cepas de *Penicillium* han demostrado ser capaces de sobrevivir en ambientes salinos, lo cual representa una ventaja sobre otros microorganismos en el campo de la biorremediación.⁷⁹

El proceso de biosorción y bioacumulación de metales por hongos no es un descubrimiento nuevo. Se sabe que estos organismos son capaces de detoxificar metales por medio de mecanismos como intercambio iónico, formación de complejos, adsorción, cristalización, biotransformación, precipitación intra y extracelular y transporte activo.⁸⁰ En otras palabras, la acumulación de metales por hongos puede dividirse en tres categorías:

- a) Biosorción de los iones metálicos en la superficie del hongo
- b) Acumulación intracelular de los iones metálicos
- c) Biotransformación.

La biosorción se ha definido como la capacidad que ciertas biomoléculas (polímeros o biomasa) tienen de unirse a determinados iones o moléculas de soluciones acuosas.⁸³ La biosorción puede utilizar biomasa viva o muerta. En el caso del uso de biomasa muerta, la biomasa fúngica no requiere de la

actividad metabólica necesaria para la acumulación intracelular, lo que implica que este proceso no depende del crecimiento, energía ni necesidades de transporte. El problema de la toxicidad de los metales no afecta a este tipo de biomasa, lo cual representa una ventaja enorme de este tipo de biosorción.⁷⁸ En el caso del uso de biomasa viva, se requiere de transporte activo con el fin de lograr la bioacumulación del metal y la biosorción se basa principalmente en la afinidad entre el biosorbente y el metal.⁸¹ La sorción y acumulación del metal depende de diversos factores como el pH, temperatura, materia orgánica y la presencia de otros iones en solución, los cuales podrían encontrarse en constante competencia.⁸²

Cuando los hongos se encuentran bajo estrés desarrollan mecanismos que les permiten tolerar las condiciones adversas. Logran la adaptación mediante alteraciones temporales en sus patrones de crecimiento o mediante modificaciones en sus características fisiológicas; todo esto dependiendo de la toxicidad del metal, lo cual se ve influenciado a su vez por la concentración y la sal en la que se encuentre éste.⁸⁴

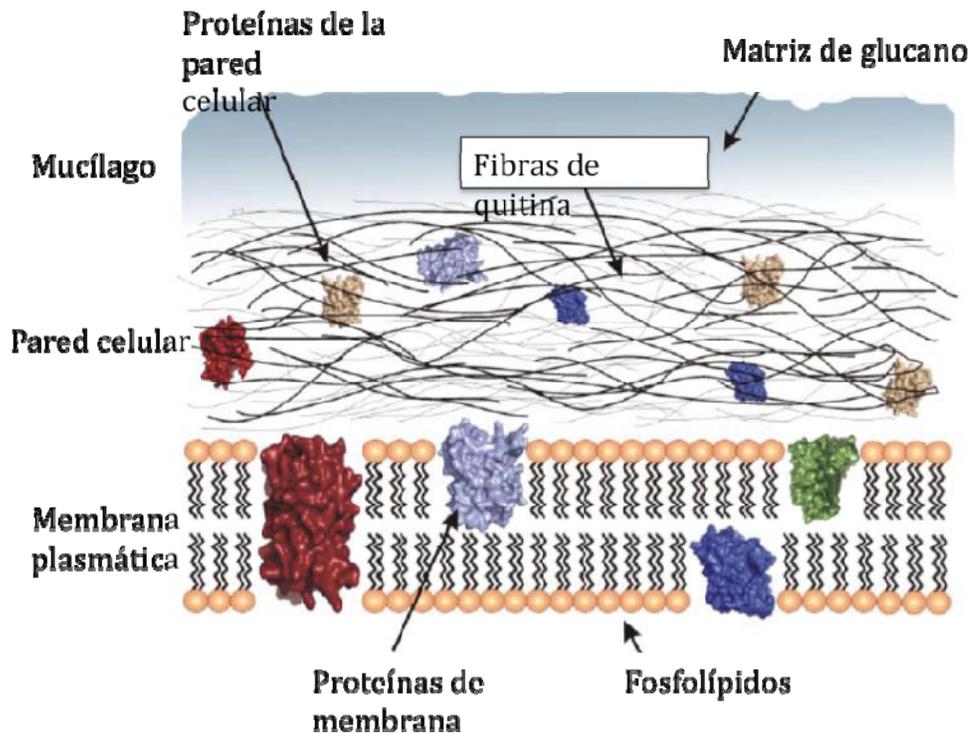
Recientemente se aislaron cuatro cepas halotolerantes de *Penicillium sp.* de manglares y salinas, las cuales mostraron resistencia a Pb(II) a concentraciones de 7.5 mM, sin disminución en el crecimiento hasta concentraciones de 5 mM y mínimos cambios en los patrones de crecimiento y morfología comparados con aquellos producidos por el Cu(II) y el Cd(II).⁸⁴ Tres de las cepas mostraron resistencia a concentraciones de al menos 2 mM de Cu(II). Las respuestas frente al estrés por cadmio fueron diferentes dependiendo de la cepa y sal evaluada. Los cultivos crecidos en presencia de metales mostraron marcadas variaciones en la apariencia de la colonia,

morfología, esporulación y producción de pigmento comparados con los controles; dichos cambios fueron más pronunciados conforme se aumentaba la concentración del metal.⁸⁴

Las paredes celulares de los hongos pueden actuar como intercambiadores catiónicos gracias a la carga negativa que se origina por la presencia de diferentes grupos funcionales como carboxilo, fosfato, amino o sulfhidrilo en los diferentes componentes de la pared (hemicelulosas, pectina, lignina, etc.).⁸⁵

Las paredes celulares de los hongos son ricas en polisacáridos y glicoproteínas como glucanos, quitina y mananos (figura 3). Estos polímeros proveen abundantes fuentes de ligandos para metales pesados.⁷⁸ Las paredes celulares de los hongos presentan una arquitectura multilaminada donde hasta el 90% de la masa seca consiste en polisacáridos.⁸⁶ En general, la pared celular fúngica puede ser considerada como un sistema de dos fases constituido por un esqueleto de quitina embebido en una matriz amorfa de polisacáridos.⁸⁶

Figura 3. Representación esquemática de las capas celulares externas de los hongos. Modificado de Leitao et al.⁷⁸



Se ha reportado que el micelio de *Penicillium digitatum* es capaz de acumular uranio a partir de soluciones acuosas de cloruro de uranilo. La quitina, la celulosa y sus derivados provenientes de la pared celular interfieren en el proceso de captación de iones metálicos. Dichos polímeros son activos en la remoción del U(VI).⁸⁷

El hongo *Penicillium janthinellum* F-13 puede tolerar la toxicidad del aluminio, pero el secuestro interno o externo parece no estar involucrado en su tolerancia a las altas concentraciones de éste.⁸⁸ En *Penicillium simplicissimum*

se ha observado que la adsorción de Zn(II) está asociada con la producción de ácido cítrico.⁸⁹

Recientemente Fan T. *et al.*⁹⁰ reportaron el potencial de *Penicillium simplicissimum* para remover Cd(II), Zn(II) y Pb(II) de soluciones acuosas. Se observó que el pH inicial influyó significativamente en la captación de estos metales y también que las capacidades de sorción de los iones metálicos aumentan cuando aumenta la temperatura. Cuando se tienen mezclas metálicas binarias o ternarias disminuye la capacidad de biosorción de la biomasa para cada metal.⁹⁰

La captación y unión selectiva a Ni(II), Zn(II), Cd(II) y Pb(II) por el micelio de *P. digitatum* ha demostrado ser altamente sensible al pH e inhibida a pHs menores a 3, mientras que la captación de Cu(II) es virtualmente insensible a modificaciones en el pH.⁹⁰ El efecto en la captación del metal por micelios matados con calor (la masa micelial fue precalentada a 100° C durante 5 minutos) fue comparable o superior a las preparaciones viables, exceptuando al Pb(II)⁹⁰. Otros activadores incluyen álcalis y pretratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido).

La inmovilización de *Penicillium italicum* en la resina Sephabeads SP 70 ha demostrado ser un método de biosorción útil para la determinación de Cd(II), Co(II), Cu(II), Fe(III), Pb(II), Mn(II) y Ni(II).⁹¹ Esta matriz puede ser reutilizada por lo menos 100 veces sin perder sus propiedades de adsorción. Se describió que el proceso de biosorción fue rápido, sencillo, seguro y barato para la preconcentración y separación de metales traza en soluciones acuosas.⁹¹ La tabla 5 muestra ejemplos del nivel de reducción en la concentración de metales pesados que se puede alcanzar mediante procesos de biosorción.

La capacidad de *Penicillium purpurogenum* de unir grandes cantidades de Cr(VI) fue reportada por Say et al.⁹² La capacidad de adsorción de Cr(VI) aumenta conforme aumenta el tiempo durante las primeras cuatro horas y posteriormente permanece constante. La adsorción de Cr(VI) depende del pH y la capacidad mejora cuando aumenta el pH. La biomasa fúngica puede ser reutilizada seis veces con una disminución de sus propiedades de biosorción que resulta ser prácticamente despreciable.⁹²

Tabla 5. Capacidades de adsorción de metales pesados por diversas especies de *Penicillium*. Modificado de Leitao et al.⁷⁸

La tabla muestra diferentes especies de *Penicillium* y la capacidad que tiene cada una de remover determinado metal del suelo. N/A : no determinado

Biosorbente	Ion	Capacidad de adsorción (mg/g)	pH	Concentración (mg/L)	Biomasa (g/L)
<i>P. simplicissimum</i>	Cd(II)	52.5	5	200	1
<i>P. chrysogenum</i>	Cd(II)	21.5	6	N/A	7.7
<i>P. digitatum</i>	Zn(II)	9.7	5.5	25	7
<i>P. simplicissimum</i>	Zn(II)	65.6	5	250	1
<i>P. simplicissimum</i>	Pb(II)	76.9	5	250	1
<i>P. cyclopium</i>	Cu(II)	50	4.5	150	1
<i>P. purpurogenum</i>	Cr(VI)	36.5	6	20	750
<i>P. chrysogenum</i>	U(VI)	70	4, 5	N/A	N/A

La fitorremediación de arsénico

La bioacumulación de arsénico involucra principalmente la biosorción de éste por la biomasa microbiana y sus productos secundarios (como algunos compuestos poliméricos secretados) y la captación por microorganismos mediante procesos metabólicamente activos o pasivos. La captación de As(V) por organismos vivos ocurre gracias al transportador de fosfatos, lo cual se debe a que el AsO_4^{3-} actúa como análogo del fosfato (PO_4^{3-}) en la vía glucolítica; mientras que el As(III) en agua predomina como la especie $\text{As}(\text{OH})_3$ y este compuesto se comporta como equivalente inorgánico del glicerol no ionizado y puede ser transportado a través de las membranas celulares por medio de las gliceroporinas.⁵⁰ Los microorganismos (bacterias, hongos y algas) y las plantas son capaces de acumular altas concentraciones de arsénico aun cuando los sustratos contengan una baja concentración,⁵¹ prueba de ello es que especies marinas como *Polychaeta* (anélidos) y bacterias del tipo *Marinomonas communis* son capaces de acumular casi en su totalidad la cantidad de arsénico a la que son expuestas en el medio.⁵¹ La acumulación de arsénico en plantas es un mecanismo de remoción de éste del suelo y aguas poco profundas.⁵⁰ El primer hiperacumulador de arsénico reportado en la literatura es el helecho *Pteris vittata* encontrado en Florida el cual es capaz de bioacumular cantidades de arsénico de hasta 15, 861 ppm,⁵²; este helecho es hasta ahora el organismo más eficiente que se conoce en la extracción del metaloide del suelo, por lo cual posee grandes atributos que pueden aprovecharse en la biorremediación de suelos contaminados con arsénico.

Figura 4. Helecho hallado en terrenos baldíos contaminados con arsenato de cobre cromado (CCA) en Florida central.⁵²



Ma. Lena *et al.*⁵² estudiaron la acumulación de arsénico en 14 especies de plantas encontradas en un terreno baldío contaminado con el pesticida CCA (arsenato de cobre cromado) en Florida Central y encontraron que solamente el helecho fue capaz de acumular grandes cantidades de arsénico (de 3,280-4,980 ppm). Adicionalmente se hicieron experimentos donde tomaron muestras tanto de la planta como del suelo provenientes del sitio contaminado (18.8-1,603 ppm) y se compararon con un suelo control no contaminado (0.47-7.56 ppm) donde encontraron que el helecho extrajo el arsénico del suelo hacia las hojas. Las plantas que habían crecido en el suelo contaminado contenían 1,442-7,526 ppm de arsénico, mientras que aquellas crecidas en el suelo control contenían apenas de 11.8-64 ppm.⁵² Estos valores reportados son mucho más altos que los típicos de plantas que crecen en suelos normales, los cuales contienen menos de 3.6 ppm de arsénico.^{52,53}

Además de ser capaz de tolerar suelos que contienen hasta 1,500 ppm de arsénico, el helecho puede acumular en sus hojas grandes cantidades de éste en periodos muy cortos de tiempo.⁵²

Tabla 6. Concentraciones de arsénico en el helecho *Pteris vittata*⁵²

Tratamiento	Arsénico en el suelo (ppm)	Arsénico en la planta (ppm) 2 semanas	Arsénico en la planta (ppm) 6 semanas
Control	6	755	438
Suelo contaminado con As*	400	3,525	6,805
Bajo nivel As**	50	5,131	3,215
Medio nivel As**	500	7,849	21,290
Alto nivel As**	1,500	15,861	22,630

Helechos (no disponibles comercialmente) recolectados de diversos lugares no contaminados los cuales fueron crecidos durante 6 semanas en recipientes de 2.5 litros con 1.5 kg de suelo (una planta por recipiente con cuatro réplicas).

*El suelo contaminado con arsénico proviene del sitio donde se descubrió el helecho hiperacumulador.

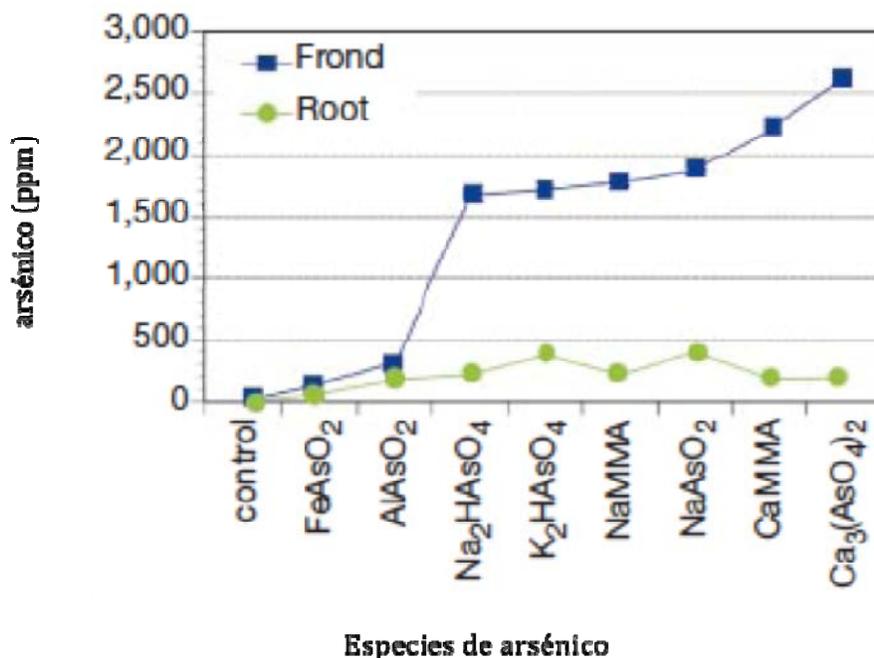
**Suelo artificialmente contaminado con tres niveles de arsenato de potasio soluble en agua.

La concentración de arsénico en hojas del helecho crecido en suelo contaminado artificialmente con 1,500 ppm se incrementó de 29.4 a 15, 861 ppm en dos semanas. En el mismo periodo, los helechos que crecieron con tan sólo 6 ppm de arsénico, acumularon 755 ppm en sus hojas, lo que representa un incremento de 126 veces.⁵²

Transcurridas 20 semanas se trató a la planta usando una solución 1:1 de metanol:agua con el fin de estudiar al arsénico mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas. Se encontró que casi todo el arsénico estaba presente como formas inorgánicas relativamente tóxicas y con pocas especies orgánicas. La concentración de As(III) fue mayor en las hojas (47-80%) que en las raíces (8.3%), lo cual nos indica que el As(V) fue convertido a As(III) durante la translocación de las raíces a las hojas.⁵²

Además de remover arsénico de suelos con diferentes concentraciones (tabla 3), el helecho también es capaz de remover diferentes especies de arsénico y acumular hasta el 93% en las hojas.⁵²

Figura 5. Concentraciones de arsénico en el helecho *Pteris vittata* después de 18 semanas de crecimiento en suelo previamente adicionado con 50 ppm de las respectivas especies. Se observa que el metaloide es acumulado preferentemente en las hojas. Tomado de Ma L. et al.



El helecho *Pteris vittata* es mesofítico y ampliamente cultivado en diversas áreas con clima cálido. Es una planta versátil y robusta que prefiere ambientes soleados (inusual en un helecho) y alcalinos (donde el arsénico se encuentra más disponible). Posee una biomasa considerable, es de crecimiento rápido, de fácil propagación y tiene la capacidad de vivir durante varios años.⁵⁴

Estas características, aunadas a la de hiperacumulación hacen que *Pteris vittata* posea un potencial biorremediador invaluable de suelos contaminados con arsénico.

Captación, transporte y detoxificación de arsénico en *Pteris vittata*

El arsenato [As(V)] y arsenito [As(III)] son las formas más comunes de arsénico en el ambiente. Estas formas son interconvertibles entre sí dependiendo del estado redox del medio, siendo el arsenato la forma predominante del arsénico en los suelos aeróbicos.⁵⁵

Los mecanismos de transporte del arsenato y arsenito son diferentes. El arsenato ingresa a la célula por medio de transportadores de fosfatos gracias a la similitud estructural entre el arsénico y el fosfato^{50,56} y una vez dentro es reducido a arsenito por la acción de una arsenato reductasa⁵⁷; mientras que el arsenito ingresa mediante gliceroporinas y finalmente es compartimentalizado en la vacuola.⁵⁰ Las células de las raíces llevan a cabo el primer paso en la captación y se ha comprobado que la especie que directamente toman del medio es el As(V), el cual constituye del 60-70% del arsénico total en las

raíces^{58,59} mientras que el As(III) es la especie predominante en el follaje donde ocupa del 70-90% del arsénico total en plantas.

Existe controversia acerca de la ubicación exacta donde se lleva a cabo la conversión de arsenato a arsenito. Kertulis *et al*⁶⁰ reportaron que la reducción ocurre principalmente en las hojas de *P. vittata*. Sin embargo, existe evidencia que contrarresta dicha hipótesis, como la encontrada por Duan *et al*.⁶¹ quienes sugieren que la reducción ocurre primordialmente en las raíces del helecho, ya que sólo ahí se ha detectado actividad de la arsenato reductasa dependiente de glutatión. Existen otros estudios realizados en las raíces de la planta donde se añadió BSO (L-butionina sulfoximina) con el fin de inhibir la síntesis de glutatión y se observó que también se inhibía la actividad de la arsenato reductasa.⁶²

Actualmente no se tienen claros los mecanismos de transporte de larga distancia del arsenito, pero existen tres posibilidades las cuales explicarían la translocación efectiva de las raíces hacia las hojas. La primera se refiere a la carga efectiva del arsenito al xilema (este paso resulta ser clave para la fitorremediación de arsénico por *P. vittata*), el segundo factor que pudiera estar afectando la translocación es el hecho de que el As(III) casi no forma complejos con compuestos tiolados,⁶² los cuales representan un papel vital en la supervivencia de plantas no acumuladoras y, por último, la falta de mecanismos efectivos de expulsión de arsenito de las células hacia el ambiente.⁶³

Hasta ahora no se han logrado dilucidar los mecanismos por los cuales el arsenito es secuestrado a la vacuola de las células que constituyen las hojas

así como tampoco el mecanismo mediante el cual las células de *P. vittata* detoxifican el arsénico.⁶³ Lo que se sabe gracias a trabajos previos es que la detoxificación metabólica por medio de metilación y biotransformación de arsénico en compuestos organo-arsénicos, no constituyen mecanismos importantes de protección contra la toxicidad del metaloide.⁶⁴ Como ya se mencionó anteriormente, la síntesis de compuestos tiolados tampoco juega un papel relevante en la detoxificación de As ni en la tolerancia que *P. vittata* muestra frente a éste.⁶²

Se requieren diversos estudios y nuevos enfoques a futuro que permitan conocer y entender los mecanismos de detoxificación y secuestro vacuolar que le permiten al helecho afrontar e hiperacumular arsénico con el fin de mejorar la fitorremediación de nuestro ambiente. Una de las propuestas que se están desarrollando por diversos grupos de investigación es la de incrementar la capacidad antioxidante de la planta.

Incremento de la capacidad antioxidante de la planta.

Cao *et al.*⁶⁵ reportaron que los antioxidantes enzimáticos así como los no enzimáticos son importantes en la detoxificación e hiperacumulación de arsénico en *P. vittata*.⁶⁵ Los antioxidantes enzimáticos son los más importantes cuando las plantas son expuestas a bajas concentraciones de As, mientras que los no enzimáticos resultan ser críticos cuando existen exposiciones a altas concentraciones. Srivastava *et al.*⁶⁶ demostraron que la actividad de las enzimas antioxidantes en *P. vittata* tratada con arsénico se encuentra relacionada con la hiperacumulación de éste y significa que la planta presenta

signos de toxicidad. El selenio (Se) aminora el estrés oxidativo e incrementa la acumulación de As en *Pteris vittata* debido a que actúa como antioxidante y activa mecanismos de protección de la planta (induce un mecanismo que protege a la maquinaria fotosintética de daños alterando sutilmente la susceptibilidad de las membranas celulares).⁶⁶ En general, la acción antioxidante del Se está asociada con el aumento de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px)⁶⁷. La superóxido dismutasa (SOD) juega un papel importante en la acumulación y detoxificación de As en plantas acumuladoras (*P. vittata* y *P. multifida*) y no acumuladoras (*P. ensiformis* y *P. semipinnata*). Por esta razón, las modificaciones genéticas o de otro tipo que alteren el estado redox de las plantas podrían considerarse como opciones que permitan el incremento de la acumulación de As.

El uso de la simbiosis planta-microorganismo como ayuda para remover As del suelo

Existe mucha información acerca del papel que los microorganismos rizosféricos tienen en la degradación de contaminantes orgánicos y biocontrol de patógenos acarreados por el suelo.⁶⁸⁻⁷⁰ Recientemente se encontró que la simbiosis *P.vittata*-microorganismo que se lleva a cabo naturalmente en la rizósfera de la planta, puede incrementar significativamente la eficiencia de la fitorremediación de As.⁷¹⁻⁷³

Cuando las raíces de *Pteris vittata* fueron inoculadas con *Glomus mosseae* y *Gigaspora margarita* (hongos formadores de micorrizas arbusculares [AM]), la biomasa y capacidad de la planta de remover As fueron significativamente

mayores que en helechos que no habían sido inoculados previamente.^{71,73} Estudios posteriores demostraron que los efectos de diversos hongos sobre el crecimiento plantar y la distribución de As en los helechos es diferente.⁷⁴ Por lo tanto, una alternativa de biorremediación de los ambientes contaminados podría ser la adecuada combinación de *P. vittata*-hongo AM. Actualmente las especies de hongos más comúnmente identificados en la rizósfera de *Pteris vittata* son *Glomus microaggregatum*, *Glomus mosseae*, *Glomus brohultii* y *Glomus geosporum*.⁷⁵

ANÁLISIS

La presencia de metales pesados en el ambiente suele ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, pero por otro lado, posibilita la selección de variantes resistentes al efecto tóxico del ión y esto nos permite considerar a dichos microorganismos y sus mecanismos de resistencia como posibles alternativas a las tecnologías de remoción de metales.

A continuación se desarrollará un breve análisis acerca de los microorganismos anteriormente presentados y se evaluará las ventajas y desventajas que presentan unos frente a otros como posibles biorremediadores de ecosistemas contaminados con metales pesados.

Bacterias

En las bacterias, los mecanismos predominantes de resistencia a metales pesados son aquellos relacionados con la expulsión activa de los metales del citosol a través de ATPasas y sistemas de eflujo de iones. Metales como el Cr(VI) son expulsados de las células mediante sistemas de expulsión de los iones los cuales se encuentran codificados en plásmidos.^{2,3}

Por lo general, los determinantes genéticos que confieren resistencia a los iones inorgánicos se localizan en plásmidos y no en el cromosoma de las bacterias. Estos plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se han encontrado en especies bacterianas; estas moléculas de DNA constituyen un complemento del patrimonio genético que poseen las bacterias en su cromosoma. Las funciones codificadas por los plásmidos son dispensables, pero por lo común representan propiedades ventajosas para la

sobrevivencia de bacterias en situaciones de emergencia y por ello se consideran elementos importantes en la evolución de las células bacterianas. La desventaja de este mecanismo es que sólo le confiere resistencia a los metales a las bacterias, pero no puede considerarse como un prospecto para biorremediación ya que sólo le proporciona resistencia a la célula y regresa el metal tóxico al medio.

Otro de los mecanismos empleados por las bacterias para resistir la exposición a iones metálicos y que sí puede considerarse como un posible biorremediador, es el uso de sus propias enzimas codificadas por DNA cromosomal, como es el caso de las reductasas. Estas enzimas son capaces de reducir metales como el Cr(VI) convirtiéndolo en una forma menos tóxica para las células en general.¹³

Algunas bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) también producen sustancias poliméricas extracelulares (polisacáridos, glicoproteínas, etc.) que adsorben metales a su superficie y los remueven de esta manera de aguas contaminadas.⁵ Este mecanismo también se considera como posible biorremediador.

El caso de las bacterias que viven en la rizósfera de las plantas es un importantísimo ejemplo del potencial que poseen estos microorganismos para eliminar contaminantes del suelo, ya que además de utilizar sus propios mecanismos de resistencia (exclusión activa, biosorción, bioacumulación en espacios extra e intracelulares) para poder sobrevivir al estrés, permite que las plantas sean capaces de acumular mayores cantidades de metales gracias al mecanismo de transferencia previamente mencionado, lo que trae consigo la disminución de efectos fitotóxicos.⁶

Además de todas estas características, no debemos olvidar que las bacterias son microorganismos que se duplican en tiempos usualmente muy breves, no requieren de grandes cantidades ni de sustratos complejos, son de fácil manejo y pueden utilizarse vivas y/o muertas con el fin de remover iones metálicos del medio ambiente, lo que las convierte en excelentes candidatos para biorremediar ambientes contaminados.

Algas

A diferencia de las plantas y los hongos, las algas son microorganismos que requieren de nutrimentos simples y pueden ser fácilmente cultivables bajo estrictas condiciones de laboratorio.¹⁷ Son organismos de crecimiento rápido y se ha demostrado que algunas especies de algas verdes son capaces de acumular concentraciones elevadas de diversos metales. Todas estas características las hacen ser uno de los mejores candidatos para la biorremediación de ambientes contaminados, superando así a muchas de las desventajas de plantas y hongos.

Las algas son organismos de remoción de metales muy importantes, ya que al vivir en el agua son capaces de tomar el metal directamente de ella y removerlo de esta manera.¹⁷ Esta característica las hace ser de los organismos más importantes en el terreno de la biorremediación, ya que uno de los principales objetivos de esta nascente tecnología es remover los contaminantes del agua

con el objeto de que no lleguen a ser consumidos por ningún ser vivo (además del organismo biorremediador). Muchas algas verdes (*Euglena sp.*) también cuentan con los mecanismos de inactivación (formación de complejos con compuestos tiolados) y compartimentalización; de los cuales ya se explicó su relevancia biológica al describir que de esta manera se neutraliza la toxicidad del metal y se permite el desarrollo y reproducción del organismo.

Otra ventaja importantísima de las algas verdes del género *Euglena* es que son capaces de desarrollarse en aguas residuales con pHs ácidos (2.5-4.5),^{17, 113} hecho que prácticamente las hace el único organismo posible capaz de biorremediar las aguas residuales producidas por la industria minera y curtidoras de cuero; que son las principales generadoras de efluentes ácidos contaminados con metales.

A diferencia de lo que ocurre en los hongos, la capacidad de biosorción de metales de las algas puede ser alterada por diversos factores como la concentración de metal, biomasa celular, pH, temperatura, etc.

Todos los organismos presentados poseen diversas ventajas y desventajas a la hora de ser considerados como posibles herramientas en el terreno de la biorremediación. La adecuada selección de éstos depende de las características del sitio contaminado que se desee recuperar, así como de las características inherentes de resistencia y tolerancia que cada uno posee.

Hongos

Los hongos son comunes en el suelo, alimentos, bebidas y en el mismo aire. Estas características los hacen excelentes candidatos para fines de biorremediación pues indican que son fácilmente adaptables a diversos tipos de ambientes, además de que resultan ser menos sensibles que otros organismos a condiciones ambientales adversas.⁷⁸

Los hongos son de crecimiento lento y requieren de diversos sustratos para su desarrollo óptimo. Por estas razones puede concluirse que en general, los hongos son menos eficientes que las bacterias en la remoción de metales.

Una de las ventajas que poseen los hongos frente a otros organismos es que resultan ser más versátiles en cuanto a la variedad de sustratos que pueden utilizar, además de que la morfología y sus características de crecimiento son responsables de su rápida colonización. Otra ventaja importante que presentan los hongos frente a organismos como las bacterias y plantas es que su estructura filamentosa permite la fácil separación de la biomasa fúngica por medio de filtración.⁷⁸

En cuanto a condiciones de adaptación, algunos hongos del género *Penicillium* han demostrado ser capaces de sobrevivir en ambientes salinos⁷⁸, lo cual representa una ventaja sobre otros microorganismos en el campo de la biorremediación.

Plantas

Se han utilizado plantas para remover metales pesados de los suelos. Cuando estas plantas alcanzan la madurez, se cosecha la biomasa enriquecida con metales y una fracción de la contaminación en el suelo habrá sido removida. Este es uno de los aspectos favorables del uso de plantas frente a otros organismos biorremediadores, ya que existen especies de plantas que pueden localizar al metal en las hojas facilitando así su cosecha y remoción.

Los principales mecanismos por los que las plantas logran resistir exposiciones a metales son la disminución del transporte y la acumulación interna del ión tóxico en vacuolas.¹⁷ La compartimentalización del metal es considerada como uno de los principales mecanismos con posibles aplicaciones biorremediadoras, ya que retira al ión del suelo y permite que la planta siga llevando a cabo sus funciones. No se sabe aún si el metal es inactivado con compuestos tiolados antes de ingresar a la vacuola o si esto ocurre una vez que ha entrado¹⁷; aunque podría ocurrir cualquiera de las dos opciones según varios investigadores. Este mecanismo de resistencia y remoción del metal es uno de los más importantes debido a que además de ser retirado del suelo, el metal es inactivado primero por medio de la formación de complejos con grupos tioles, lo que asegura que su toxicidad ha sido neutralizada.

Las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de acumular concentraciones extremadamente altas de metales pesados, pero logran esto a costa de crecer más lento que las plantas normales que no se encuentran expuestas a ellos, lo que trae consigo la producción de menor cantidad de

biomasa.⁵² Este es un aspecto negativo del uso de estos organismos con fines de biorremediación ya que una de las características necesarias para dicho fin es que se obtenga la mayor cantidad de biomasa posible para retirar una mayor concentración de metales del ambiente.

Hasta la fecha la mayoría de las especies hiperacumuladoras de metales está restringida a unas cuantas zonas geográficas. Por ejemplo, plantas hiperacumuladoras de Ni se encuentran en Nueva Caledonia, Filipinas, plantas acumuladoras de Ni y Zn se encuentran en Asia; y aquellas acumuladoras de Co y Cr están en África Central. Estos hechos dificultan mucho el uso de las plantas como alternativas a los métodos tradicionales de remoción de contaminantes ya que no será posible o al menos fácil su desarrollo óptimo en diversas regiones que no son las nativas. Estas características restringen por tanto el uso de esta tecnología.

CONCLUSIONES

- La biorremediación es una tecnología que está creciendo rápidamente. Consiste en el uso de organismos vivos o muertos que son capaces de remover compuestos tóxicos (incluyendo los metales pesados) de lugares contaminados y tiene diversas ventajas sobre los métodos tradicionales.
- Actualmente, los metales pesados son removidos de los cuerpos de agua por medio de cromatografía de intercambio iónico, el cual es un método caro e ineficiente para remover concentraciones micromolares de metales. Como consecuencia de esto, es necesario desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de ecosistemas contaminados con metales pesados.
- El uso de las distintas capacidades naturales de adaptación de los microorganismos que viven en ambientes contaminados y que remueven el metal del suelo o lo biotransforman en una forma menos tóxica es una posible estrategia de eliminación de tóxicos de los ecosistemas.
- Es necesario que se sigan llevando a cabo estudios en este campo con el fin de que día con día se vuelva más tangible el uso de las capacidades innatas de resistencia de los organismos como posible ayuda en la búsqueda de la eliminación de contaminantes que resultan extremadamente nocivos para los seres vivos; en especial el hombre. Si bien se trata de una propuesta interesante y sustentable, no deja de ser

una tecnología naciente que requiere de perfeccionamiento y diversas condiciones para su aplicación.

- Lo que no debe perderse de vista es que el principal objetivo de utilizar a la biorremediación frente a tecnologías artificiales es aprovechar las ya existentes capacidades de un organismo para lidiar con el contaminante, sin la necesidad de grandes inversiones en el diseño ni materiales de alto costo, que a su vez traen consigo “contaminación secundaria” en los procesos de elaboración, de equipos o dispositivos creados por el hombre para realizar tal fin.
- Otro de los aspectos ideales que la biorremediación posee es que posibilita recuperar el área contaminada en el mismo sitio donde se encuentra, lo que permite que su aplicación sea prácticamente en cualquier ecosistema contaminado y minimiza costos al no haber necesidad de transporte ni almacenamiento antes del tratamiento como, por ejemplo, en el caso de las aguas contaminadas .
- La biorremediación debe considerarse como una alternativa de remoción de metales viable y costeable, particularmente para países en vías de desarrollo.
- Una vez comprendidos los mecanismos de resistencia de los organismos y la forma cómo contribuyen a que un organismo remueva el metal del ecosistema contaminado, podemos concluir que la elección del

más adecuado depende de características como: su hábitat (si vive en el agua o en el suelo), la capacidad de hiperacumular el metal y la eficiente producción de biomasa que asegure la constante remoción de trazas de metales.

BIBLIOGRAFÍA

11. Abou-Shanab RAI, van Berkum P, Angle JS. 2007. **Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale***. Chemosphere 68: 360–367.
72. Agely, A. A.; Sylvia, D. M.; Ma, L. Q. **Mycorrhizae increase arsenic uptake by the hyperaccumulator Chinese brake fern (*P. vittata L.*)**. J. Environ. Qual 2005, 34, 2181–2186.
104. Aksu, Z. 2002. **Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel (II) ions onto *Chlorella vulgaris***. Process Biochem. 38: 89–99.
44. Alia, Mohanty, P. and Matysik, J. (2001) **Effect of proline on the production of singlet oxygen**. Amino Acids 21, 195–200.
2. Alvarez, A.H., Moreno-Sanchez, R. and Cervantes, C. (1999) **Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa***. J. Bacteriol. 181, 7398-7400.
35. Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N. and Moreno-Sánchez, R. (2003) **Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium accumulating phenotype in *Euglena gracilis***. Arch. Microbiol. 180, 1–10.
97. Axtell, N. R., Sternberg, S. P., and Claussen, K. 2003. **Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor***. Bioresource Technol. 89: 41–48.
77. Banke, S.; Frisvad, J.C.; Rosendahl, S. **Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis**. Mycol. Res. 1997, 101, 617-624
27. Bick, J.A., Aslund, F., Chen, Y. and Leustek, T. (1998) **Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8404–8409
37. Breton, A. and Surdin-Kerjan, Y. (1977) **Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study**. J. Bacteriol. 132, 224–232.
- 29b) Brzywczy, J., Sienko, M., Kucharska, A. and Paszewski, A. (2002) **Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi**. Yeast 19, 29–35.
56. Bun-Ya, M.; Shikata, K.; Nakade, S.; Yompakdee, C.; Harashima, S.; Oshima, Y. **Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae***. Curr. Genet. 1996, 29, 344–351.

65. Cao, X. D.; Ma, L. Q.; Tu, C. **Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern *Pteris vittata* L.** Environ. Pollut. 2004, 128, 317-325.
115. Casiot, C.; Bruneel, O.; Personne, J.C.; Leblanc, M.; Elbaz-Poulichet, F. **Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoules, France).** Sci. Total Environ. 2004, 320, 259–67
13. Cervantes Carlos et al. **Chromate efflux by means of the ChrA Chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of bacteriology. 1999:181(23) 7398-7400
111. Cervantes, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H.; Torres-Guzman, J.C.; Moreno-Sánchez, R. **Interactions of chromium with microorganisms and plants.** FEMS Microbiol. Rev. 2001, 25, 335–347.
68. Chin-A-Woeng, T. F. C.; De Priester, W.; van der Bij, A. J.; Ligtenberg, B. J. **Description and colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365 using scanning electron microscopy.** Mol. Plant- Microbe Interact. 1997, 10, 79–86.
94. Chojnacka, K, Chojnacki, A., and Górecka, H. 2005. **Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process.** Chemosphere 59: 75–95.
22. Clemens, S. (2001) **Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.** Planta 212, 475–486
36. Cobbett, C.S. (2000) **Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification.** Plant Physiol. 123, 825–832
107. Corder, S. L., and Reeves, M. 1994. **Biosorption of nickel in complex aqueous waste streams by cyanobacteria.** Appl. Biochem. Biotechnol. 45: 847–859.
46. Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A. and Mullineaux, P. (1999) **Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress.** Plant Cell 11, 1277–1291.
105. Cruz, C. C. V., Da Costa, A. C. A., Henriques, C. A., and Luna, A. S. 2004. **Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum* sp. biomass.** Bioresource Technol. 91:249–257.

98. Darnall, D. W. 1989. **AlgaSORB®: A new biotechnology for removing and recovering heavy metals ions from groundwater and industrial wastewater.** In: **Hazardous Waste Treatment: Biosystems for Pollution Control.** pp. 113–124. Proceeding of 1989 A and WMA/EPA International symposium.
125. Devars, S.; Avilés, C.; Cervantes, C.; Moreno-Sánchez, R. **Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*.** Arch. Microbiol. 2000, 174 175–180.
118. Devars, S.; Hernández, R.; Moreno-Sánchez, R. **Enhanced heavy metal tolerance in *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1998, 34, 128–135.
61. Duan, G. L.; Zhu, Y. G.; Tong, Y. P.; Cai, C.; Kneer, R. **Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator.** Plant Physiol. 2005, 138, 461–469.
48. Ercal Nuran et al. Toxic metals and Oxidative stress part I: **Mechanisms involved in Metal induces oxidative damage.** Current topics in Medicinal Chemistry 2001, 1, 529-539
90. Fan, T.; Liu, Y.; Feng, B.; Zeng, G.; Yang, C.; Zhou, M.; Zhou, H.; Tan, Z.; Wang, X. **Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics.** J. Hazard. Mater. 2008, 160, 655-661.
86. Farkas, V. **Biosynthesis of cell wall of fungi.** Microbiol. Rev. 1980, 44, 117-141
85. Fomina, M.; Charnock, J.; Bowen, A.D.; Gadd, G.M. **X-ray absorption spectroscopy (XAS) of toxic metal mineral transformations by fungi.** Environ. Microbiol. 2007, 9, 308-321.
82. Fourest, E.; Roux, J. **Heavy metals biosorption by fungal mycelial by-product: Mechanisms and influence of pH.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992, 37, 399-403.
89. Franz, A.; Burgstaller, W.; Schinner, F. **Leaching with *Penicillium simplicissimum*: influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production.** Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57, 769-774.
80. Gadd, G.M. **Interaction of fungi with toxic metals.** New Phytol. 1993, 124, 25-60.
87. Galun, M.; Keller, P.; Malki, D.; Feldstein, H.; Galun, E.; Siegel, S.M.; Siegel, B.Z. **Removal of uranium(VI) from solution by fungal biomass and fungal wall-related biopolymers.** Science 1983, 219, 285-286.

34. Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H. (1988) **Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes**. Arch. Microbiol. 150, 197–202.
14. Gekeler, W.; Grill, E.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. **Algae sequester heavy metal via synthesis of phytochelatin complexes**. Arch. Microbiol. 1988, 150, 197–202.
7. Giller KE, Witter E, McGrath SP. 1998. **Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils**. Soil Biol Biochem 30: 1389–1414.
127. Godfray HC, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. **Food Security: The Challenge of feeding 9 billion people**. Science. 2010 Feb 12;327(5967):812-8. Epub 2010 Jan 28
- 45b) Grant, C.M., MacIver, F.H. and Dawes, I.W. (1997) **Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide γ -glutamylcysteine**. Mol. Biol. Cell 8, 1699–1707
109. Greene, B., McPherson, R., and Darnall, D. 1987. **Algal sorbents for selective metal ion recovery**. In: **Metal Speciation, Separation and Recovery**. pp. 315–338. Patterson, J.W., and Pasino, R., Eds., Lewis, Chelsea, MI.
110. Hall, J., Healey, F. P., and Robinson, G. G. C. 1989. **The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation of two chlorophytes in batch culture**. Aquat. Toxicol. 14: 1–14.
114. Hargreaves, J.W.; Lloyd, E.J.H., Witton, B.A. **Chemistry and vegetation of highly acidic streams**. Freshwater. Biol. 1975, 5, 563–576.
- 29c) Hell, R., Jost, R., Berkowitz, O. and Wirtz, M. (2002) **Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana***. Amino Acids 22, 245–257
10. Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. 2004. **Bacterial communities associated with lowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense***. Appl Environ Microb 70: 2667–2677.
103. Itoh, M., Yuasa, M., and Kobayashi, T. 1975. **Adsorption of metal ions on yeast cells at varied cell concentrations**. Plant Cell Physiol. 16: 1167–1169.

18. Jenkins, D.; Russell, L.L. **Heavy metals contribution of household washing products to municipal wastewater.** *Water Environ. Res.* 1994, 66, 805–813.
- 6b) Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY. 2008. **Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil.** *Chemosphere* 72: 157–164.
4. Jianlong Wang, Can Chen (2006) **Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review.** *Biotechnology Advances* 24 (2006) 427–451
54. Jones, D. **Encyclopaedia of Ferns** (Lothian, Melbourne, 1987)
53. Kabata-Pendias, A. **Trace Elements in soils and plants** 203-209 (CRC, Boca raton, 1991)
70. Kamaludeen, S. P. B.; Ramasamy, K. **Rhizoremediation of metals: harnessing microbial communities.** *Indian J. Microbiol.* 2008, 48, 80–88.
117. Kamiski, L.P. **Hg²⁺ and Cu⁺ are ionophores, mediating Cl⁻/OH⁻ exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes.** *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 19218-19225.
60. Kertulis, G. M.; Ma, L. Q.; MacDonald, G. E.; Chen, R.; Winefordner, J. D.; Cai, Y. **Arsenic speciation and transport in *P. vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap.** *Environ. Exp. Bot.* 2005, 54, 239–247.
- 28b) Koprivova, A., Meyer, A.J., Schween, G., Herschbach, C., Reski, R. and Kopriva, S. (2002) **Functional knockout of the adenosine 5-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation.** *J. Biol. Chem.* 277, 32195–32201
- 33b) Kubota, H., sato, K., Yamada, T. and Maitani, T. (2000) **Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish.** *Phytochemistry* 53, 239–245.
83. Kuyucak, N.; Volesky, B. **Biosorption by algal biomass. In Biosorption of heavy metals;** Volesky, B. Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1990; pp. 173-198.
95. Lee, D.-C., Park, C.-J., Yang, J.-E., Jeong, Y.-H., and Rhee, H.-I. 2000. **Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 997–600.
78. Leitão L. **Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field.** *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009, 6, 1393-1417

73. Leung, H. M.; Ye, Z. H.; Wong, M. H. **Interactions of mycorrhizal fungi with *P. vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils.** Environ. Pollut. 2006, 139, 1–8.
40. Li, Z.-S., Lu, Y.-P., Zhen, R.-G., Szczypka, M., Thiele, D.J and Rea, P.A. (1997) **A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1 catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 42–47.
63. Li Xia et al. **The Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L.** ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY / VOL. 43, NO. 22, 2009
- 5.a)Liu Y, Lam MC, Fang HHP. **Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge.** Water Sci Technol 2001;43:59–66.
- 71.Liu, Y.; Zhu, Y. G.; Chen, B. D.; Christie, P.; Li, X. L. **Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *P. vittata*** Mycorrhiza 2005, 15, 187–192.
52. Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E.D., 2001. **A fern that hyperaccumulates arsenic.** Nature 409, 579.
12. Malagoli Mario et al. **Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*.** Journal of environmental quality. 2008 Jun 23;37(4): 1536-45
55. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T. **Arsenic round the world: a review.**Talanta 2002, 58, 201- 235.
- 32a)Mehra, R.K., Tarbet, E.B., Gray, W.R. and Winge, D.R. (1988) **Metal-specific synthesis of two metallothioneins and c-glutamyl peptides in *Candida glabrata*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8815–8819.
- 32 b) Mehra, R.K., Mulchandani, P. and Hunter, T.C. (1994) **Role of CdS quantum crystallites in cadmium resistance in *Candida glabrata*.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 1193–1200.
93. Mehta s et al. **Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects** Critical Reviews in Biotechnology, 25:113–152, 2005
96. Mehta, S. K., and Gaur, J. P. 2001a. **Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*.** Ecol. Eng. 18: 1–13.
- 23, 31 Meister, A. (1995) **Glutathione metabolism.** Methods Enzymol. 251, 3–13.
91. Mendil, D.; Tuzen, M.; Soylak, M. **A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum* loaded on Sephabeads SP 70 prior to flame atomic**

- absorption spectrometric determinations.** J. Hazard. Mater. 2008, 152, 1171-1178.
47. Mendoza-Cózatl David et al. **Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protist and plants.** FEMS Microbiology Reviews 29 (2005) 653-671
- 42, 113, 120. Mendoza-Cózatl, D.; Loza-Tavera, H.; Moreno-Sánchez, R. **Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*.** Physiol.Plant. 2002, 115, 276–283.
9. Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbrielli R, Bazzicalupo M. 2001. **Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil.** Environ Microbiol 3: 691–708.
57. Mukhopadhyay, R.; Rosen, B. P. ***Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase.** FEMS Microbiol. Lett.1998, 168, 127–136.
124. Nagel, K.; Adelmeier, U.; Voight, J. **Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** J. Plant. Physiol. 1996, 149, 86–90.
84. Nazareth, S.; Marbaniang, T. **Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium morphotypes*.** J. Basic Microb. 2008, 48, 363-369.
19. Nieboer, E.; Richardson, D.H.S. **The replacement of the nondescript term “heavy metal” by a biologically and chemically significant classification of metal ions.** Environ. Pollut. 1980, 1, 3–8.
16. Nriagu, J.O.; Pacyna, J.M. **Quantitative assessment of worldwide contamination of air,water and soils by heavy metals.**Nature 1988,333, 134–139.
69. Okon, Y.; Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, B. J. J. **Biotechnology of biofertilisation and phytostimulation.** In Agricultural Biotechnology; Altman, A., Ed.; Dekker: New York, 1998.
- 28, 29 a) Ono, B., Hazu, T., Yoshida, S., Kawato, T., Shinoda, S., Brzwczy, J. and Paszewski, A. (1999) **Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation.** Yeast 15, 1365–1375.
33. a)Oven, M., Page, J.E., Zenk, M.H. and Kutchan, T.M. (2002) **Molecular characterization of the homophytochelatin synthase of soybean *Glycine max*.** J. Biol. Chem. 277, 4747-4754.
100. Özer, D., Aksu, Z., Kutsal, T., and Caglar, A. 1994. **Adsorption isotherms of lead (II) and chromium (VI) on *Cladophora crispata*.** Environ. Technol. 15: 439–448

58. Pickering, I. J.; Gumaelius, L.; Harris, H. H.; Prince, R. C.; Hirsch, G.; Banks, J. A.; Salt, D. E.; George, G. N. **Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern.** *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 5010–5014.
3. Pimentel, B.E., Moreno-Sanchez, R. and Cervantes, C. (2002) **Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein.** *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 249-254.
106. Rai, L. C., Gaur, J. P., and Kumar, H. D. 1981. **Phycology and heavy-metal pollution.** *Biol. Rev. Phil. Soc.* 56: 99–151.
21. Rajkmar Mani et al. **Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals.** *Critical Reviews in Biotechnology*, 2009,29(2): 120-130
17. Rodriguez-Zavala Jose et al. **Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*.** *Journal of Environmental Science and Health Part A* (2007) 42, 1365–1378
112. Rodríguez-Zavala, J.S.; Ortiz-Cruz, M.A.; Moreno-Sánchez R. **Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*.** *J. Eukaryot. Microbiol.* 2006, 53, 36–42.
50. Rosen, B.P., 2002. **Biochemistry of arsenic detoxification.** *FEBS Lett.* 529, 86–92
102. Roux, J. C. 1998. **Use of dead recovered biomasses to adsorb heavy metals from wastewaters.** *Water Quality Int.*, June 21–26. Vancouver, Canada.
101. Roy, D., Greenlaw, P. N., and Shane, B. S. 1993. **Adsorption of heavy metals by green algae and ground rice hulls.** *J. Environ. Sci. Health, Part A.* 28: 37–50.
92. Say, R.; Yilmaz, N.; Denizli, A. **Removal of chromium(VI) ions from synthetic solutions by the fungus *Penicillium purpurogenum*.** *Eng. Life Sci.* 2004, 4, 276-280.
121. Schäfer, H.J.; Haag-Kerwer, A.; Rausch, T. **CDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L. evidence for Cd induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform.** *Plant. Mol. Biol.* 1998, 37, 87–97.
8. Schlegel HG, Cosson JP, Baker AJM. 1991. **Nickel hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria.** *Bot Acta* 194: 18–25.

123. Silverberg, B.A.; Stokes, P.M.; Ferstenberg, L.B. **Intracellular complexes in a copper tolerant green alga.** J. Cell Biol. 1976, 69, 210–214.
119. Silver, S. **Bacterial resistance to toxic metal ions—a review.** Gene 1996, 179, 9–19.
76. Sing, H. **Mycoremediation;** John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, 2006.
1. Snavely, M.D., Florer, J.B., Miller, C.G. and Maguire, M.E. (1989) **Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg²⁺ transport by CorA, MgtA, and MgtB systems.** J. Bacteriol. 171, 4761-4766.
66. Srivastava, M.; Ma, L. Q.; Singh, N.; Singh, S. **Antioxidant responses of hyper accumulator and sensitive fern species to arsenic.** J. Exp. Bot. 2005, 415, 1335–1342.
59. Su, Y. H.; McGrath, S. P.; Zhu, Y. G.; Zhao, F. J. **Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*.** New Phytol. 2008, 180, 434–441.
38. Takagi, H., Yoshioka, K., Awano, N., Nakamori, S. and Ono, B. (2003) **Role of *Saccharomyces cerevisiae* serine O-acetyltransferase in cysteine biosynthesis.** FEMS Microbiol. Lett. 218, 291–297.
24. Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Wmitch, F.W., Blake-Klaff, M., Hawkesford, M.J. and Saito, K. (2000) **The roles of three different functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*.** Plant J. 23, 171-182.
30. Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1997) **Metabolism of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 503–532
74. Trotta, A.; Falaschi, P.; Cornara, L.; Minganti, V.; Fusconi, A.; Drava, G.; Berta, G. **Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *P. vittata* L.** Chemosphere 2006, 65, 74–81.
43. Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M.H. and Miyamoto, K. (2002) **Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 653–659
20. Valko, M et al. **Metals, toxicity and oxidative stress.** Current Medicinal Chemistry, 2005, 12, 1161-1208
41. Vande, J.G. and Ow, D.W. (2001) **Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt²⁺.** Mol. Microbiol. 42, 29–36

25. Vidmar, J.J., Tagmount, A., Cathala, N., Touraine, B. and Davidian, J.C. (2000) **Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana***. FEBS Lett. 475, 65–69.
- 5b) Vijver MG, Gestel CAMV, Lanno RP, Van Straalen NM, Peijnenburg WJGM. **Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review**. Environ Sci Technol 2004;38:4705–12
81. Volesky, B. **Biosorption and me**. Water Res. 2007, 41, 4017-4029.
49. Wang Suiling et al. **On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater**. Journal of Environmental Management 90 (2009) 2367–2376
51. Waring, J., Maher, W., 2005. **Arsenic bioaccumulation and species in marine *Polychaeta***. Appl. Organometal. Chem. 19, 917–929.
15. Weber, D.N.; Shaw, C.F.; Petering, D.H. ***Euglena gracilis* cadmium binding protein-II contains sulfide**. J. Biol. Chem. 1987, 262, 6962–6964
26. Yildiz, F.H., Davies, J.P. and Grossman, A.R. (1994) **Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth**. Plant Physiol. 104, 981–987
116. Wilkinson, S.C.; Goulding, K.H.; Robinson, P.K. **Mercury accumulation and volatilization in immobilized algal cell systems**. Biotechnol. Lett. 1989, 11, 861–864.
79. Woolard, C.R.; Irvine, R.L. **Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor**. Water Res. 1995, 29, 1159-1168.
75. Wu, F. Y.; Ye, Z. H.; Wu, S. C.; Wong, M. H. **Metal accumulation and arbuscular mycorrhizal status in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Pteris vittata* L. and *Sedumalfredii* Hance**. Planta 2007, 226, 1363–1378
67. Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V., 2001. **Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce**. Plant Soil 237, 55–61.
108. Yun, Y.-S., Niu, H., and Volesky, B. 2001. **The effect of impurities on metal biosorption. 2001. In: Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. Internat. Biohydromet. Symp. Proceedings. Part B—Biosorption and Bioremediation. pp. 181–187.** Ciminelli, V. S. T., and Garcia, O. Jr., Eds., Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands
- 6.a) Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J. 2006. **Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea***. Chemosphere 64: 991–997.

39. a), 122 Zenk, M.H. (1996) **Heavy detoxification in higher plants – a review.** Gene 179, 21–30.
88. Zhang, D.; Duine, J.A.; Kawai, F. **The extremely high Al resistance of *Penicillium janthinellum* F-13 is not caused by internal or external sequestration of Al.** Biometals 2002, 15, 167-174.
64. Zhao, F. J.; Dunham, S. J.; McGrath, S. P. **Arsenic hyperaccumulation by different fern species.** New Phytol. 2002, 156,27–31.
62. Zhao, F. J.; Wang, J. R.; Barker, J. H. A.; Schat, H.; Bleeker, P. M.; McGrath, S. P. **The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *P. vittata*** New Phytol. 2003, 159, 403–410.
99. Zhou, J. L., Huang, P. L., and Lin, R. G. 1998. **Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae.** Environ. Pollut. 101:67–75.
- 45.a) Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Jouanin, L. and Terry, N. (1999) **Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance.** Plant Physiol. 119, 73–79.
126. <http://www.jornada.unam.mx/2009/02/02/eco-c.html>