

00591
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE
RESISTENCIA A CROMATO EN *Pseudomonas*
acuginosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

CARLOS CERVANTES VEGA

TUTORA: DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

2000

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

1.-RESUMEN

1.1.-ABSTRACT

2.-INTRODUCCION

INTERACCIONES DEL CROMO CON LAS BACTERIAS.

ANEXO 1.-Cervantes, C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán y R. Moreno-Sánchez. Interactions of Chromium with Microorganisms and Plants. Enviado a FEMS Microbiology Reviews en agosto 2000.

3.-HIPOTESIS

4.-OBJETIVO

5.-RESULTADOS

MECANISMO DE RESISTENCIA A CROMATO EN *Pseudomonas aeruginosa*.

ANEXO 2.-Alvarez, A.H., R. Moreno-Sánchez y C. Cervantes (1999) Chromate Efflux by means of the ChrA Chromate Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 181:7398-7400.

6.-DISCUSION Y PERSPECTIVAS

6.1.-BIBLIOGRAFIA

7.-APENDICES

7.1.-MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A METALES TOXICOS.

ANEXO 3.-Cervantes, C. (1999) Resistencia Bacteriana a los Metales Pesados. En: C. Cervantes y R. Moreno-Sánchez (Editores) Contaminación Ambiental por Metales Pesados. Impacto en los Seres Vivos. AGT Editor. México, D.F. pp. 41-59.

7.2.-SISTEMAS BACTERIANOS QUE EXPULSAN METALES TOXICOS.

ANEXO 4.-Vargas, E., A. H. Alvarez y C. Cervantes (1998) Sistemas Bacterianos de Expulsión de Metales Tóxicos. Revista Latinoamericana de Microbiología 40:53-71.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.-RESUMEN

Se han reportado diversas cepas bacterianas que poseen plásmidos responsables de la resistencia a cromato, aunque sólo los plásmidos pUM505 y pMOL28 de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes eutrophus*, respectivamente, se han analizado a nivel molecular. En el determinante de *P. aeruginosa* se identificó el gen *chrA* que codifica una proteína hidrofóbica de 416 residuos, denominada ChrA. Con base en su composición de aminoácidos y en su perfil hidropático, se ha postulado que ChrA es una proteína de la membrana que consta de 12 dominios transmembranales. La expresión de ChrA en *P. aeruginosa* causa una disminución significativa en la acumulación de cromato, lo cual indica una función relacionada con el transporte de cromato que ha llevado a sugerir que se trata de un sistema de expulsión del oxianión. En otras bacterias se ha encontrado que la resistencia a cromato también involucra una baja acumulación del ion tóxico, pero el mecanismo preciso de la tolerancia no ha sido aún descrito. El objetivo principal de este trabajo fue dilucidar el mecanismo mediante el cual la proteína ChrA de *P. aeruginosa* confiere resistencia a cromato.

Las células completas de *P. aeruginosa* PAO1 con el plásmido recombinante pCRO616, que contiene el gen *chrA* del plásmido pUM505, acumularon de 2 a 10 veces menos $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ que células de la cepa PAO1 sin el plásmido. Vesículas de membrana invertidas de PAO1 (pCRO616) captaron de 3 a 5 veces más $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ que las vesículas de PAO1. La captación de cromato fue dependiente de NADH y mostró una cinética de saturación con una Km aparente de 0.12 mM de cromato y una Vmax de 0.5 nmol CrO_4^{2-} /mg proteína/min. El transporte de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ fue abatido por inhibidores de la cadena respiratoria y por desacoplantes del potencial de membrana. Se concluyó que el mecanismo de resistencia determinado por ChrA está basado en la expulsión del cromato energizada por el potencial de membrana.

1.1.-ABSTRACT

"Elucidation of the Mechanism of Resistance to Chromate in *Pseudomonas aeruginosa*"

Several diverse bacterial strains have been reported that possess plasmids conferring chromate resistance, but only plasmids pUM505 and pMOL28 from strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes eutrophus*, respectively, have been analyzed to the molecular level. In the *P. aeruginosa* determinant, the *chrA* gene was identified and it was found to code for a hydrophobic protein of 416 amino acids, named ChrA. Based on its amino acid composition and its hydropathic profile, it was proposed that ChrA is a membrane protein with 12 transmembrane spans. Expression of ChrA in *P. aeruginosa* causes a significant decrease in the accumulation of chromate, which indicates a function related to chromate transport, and suggests a role of ChrA in the efflux

of chromate. A decreased accumulation of chromate was also found in other chromate-resistant bacteria, but the precise tolerance mechanism has not been described. The main objective of this work was to elucidate the mechanism by which the *P. aeruginosa* ChrA protein confers resistance to chromate.

Intact cells of strain *P. aeruginosa* PAO1 harboring recombinant plasmid pCRO616, which contains the *chrA* gene cloned from plasmid pUM505, accumulated 2 to 10 times less $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ than cells from strain PAO1 without plasmid. Everted membrane vesicles from PAO1(pCRO616) took up 3 to 5 times more $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ than vesicles from PAO1 strain. Chromate uptake was NADH-dependent and showed a saturation kinetics with an apparent K_m of 0.12 mM chromate and a V_{max} of 0.5 nmol $\text{CrO}_4^{2-}/\text{mg}$ protein/min. Chromate transport was abolished by respiratory chain inhibitors and by membrane potential uncouplers. It was concluded that the mechanism of resistance determined by ChrA is based on an efflux system that extrudes chromate energized by the membrane potential.

2.-INTRODUCCION

INTERACCIONES DEL CROMO CON LAS BACTERIAS

El cromo es un metal abundante que se encuentra en la naturaleza principalmente en los estados de oxidación +3 y +6, siendo estas formas interconvertibles. Los efectos biológicos del cromo están estrechamente relacionados con su estado de oxidación. La forma hexavalente (como el cromato, CrO_4^{2-}) es la más tóxica, pues es la especie permeable del cromo a través de las membranas biológicas; su permeabilidad radica en su similitud química con el anión esencial sulfato (SO_4^{2-}). Por otra parte, los derivados del Cr(III) son muy insolubles en agua y mucho menos permeables que el Cr (VI) en las membranas biológicas. Aunque el cromo se considera un micronutriente esencial en mamíferos, es sumamente tóxico para la mayoría de los organismos vivos. Por su amplia utilización en diversos ámbitos de la industria, el cromo se cataloga como un serio contaminante del ambiente. La presencia de este metal en el entorno ha propiciado una gran variedad de interacciones con los seres vivos.

En el ANEXO 1 se presentan los aspectos generales de las interacciones del cromo con los microorganismos y las plantas.

ANEXO 1

Interactions of Chromium with Microorganisms and Plants

Carlos Cervantes ^{1*}, Jesús Campos-García ¹, Silvia Devars ², Félix Gutiérrez-Corona ³,
Herminia Loza-Tavera ⁴, Juan Carlos Torres-Guzmán ³, and Rafael Moreno-Sánchez ².

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, Morelia, Mich.;

² Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F.;

³ Instituto de Investigación en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto.;

⁴ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.; México.

*Send correspondence to:

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Universidad Michoacana

Edificio B-3, Ciudad Universitaria

58030 Morelia, Michoacán, México

Tel/Fax: 52+43-26-5788

E-mail: cevega@zeus.umich.mx

Key words: chromium transport, chromium toxicity, chromate reduction, chromium resistance, chromium bioremediation.

For: FEMS Microbiology Reviews

August, 2000

Abstract

Chromium is a highly toxic nonessential metal for microorganisms and plants. Due to its widespread industrial use, chromium (Cr) has become a serious pollutant in diverse environmental settings. The hexavalent form of the metal, Cr(VI), is considered a more toxic species than the relatively innocuous and less mobile Cr(III) form. The presence of Cr in the environment has selected microbial and plant variants able to tolerate high levels of Cr compounds. The diverse Cr-resistance mechanisms displayed by microorganisms, and probably by plants, include biosorption, diminished accumulation, precipitation, reduction of Cr(VI) to Cr(III), and chromate efflux. Some of these systems have been proposed as potential biotechnological tools for the bioremediation of Cr pollution.

Contents

1.	Introduction	3
2.	Chemical properties of chromium.....	3
3.	Chromium abundance and pollution.....	3
4.	Biological significance of chromium.....	4
5.	Chromium transport and accumulation.....	4
5.1.	Microbial chromium transport and accumulation.....	5
5.2.	Chromium transport and accumulation in plants.....	6
6.	Chromium toxicity.....	8
6.1.	Chromium toxicity in microorganisms.....	9
6.2.	Chromium toxicity in plants.....	10
7.	Resistance to chromium compounds.....	13
7.1.	Bacterial plasmid-determined resistance.....	13
7.2.	Bacterial Cr(VI) reduction.....	18
7.3.	Chromium resistance in algae.....	23
7.4.	Chromium resistance in fungi.....	25
7.5.	Chromium resistance in plants.....	26
8.	Bioremediation of chromium pollution.....	29
8.1.	Bioremediation with bacteria	30
8.2.	Bioremediation with algae	33
8.3.	Bioremediation with fungi.....	34
8.4.	Bioremediation with plants.....	35
9.	Concluding remarks.....	36
	Acknowledgments.....	37
	References.....	37

1. Introduction

Living organisms continuously interact in the environment with a wide variety of chemical elements and its inorganic derivatives, mainly in ionized forms. These ions may be assimilated as essential or useful cell components or may instead be toxic for the organism. The former include anions such as sulfate and phosphate and the cations sodium, potassium, and magnesium. Among the noxious agents, the heavy metals cadmium, mercury, lead and silver and the oxyanions derived from arsenic, chromium and tellurium have been described. Toxic ions exert their effects at different cellular levels and by several biochemical mechanisms, which depend both on their particular chemical properties and on the specific organism. On the other hand, microbes and plants have developed biochemical systems that allow them to resist the toxic effects of inorganic ions to which they are exposed. In the last few years microorganisms and plants able to resist high levels of toxic metals have been proposed as biotechnological tools for the remediation of environmental metal pollution. In this review we summarize the interactions of bacteria, alga, fungi and plants with Cr and its compounds emphasizing their potential application for bioremediation purposes. We also highlight those research areas where substantial knowledge is missing.

2. Chemical properties of chromium

Chromium is a transition metal

located in the group VI-B of the periodic table. Although it is able to exist in several oxidation states, the most stable and common forms are the trivalent Cr(III) and the hexavalent Cr(VI) species, which display quite different chemical properties (McGrath and Smith, 1990). Cr(VI), considered the most toxic form of Cr, is usually associated with oxygen as chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) ions, with chromate predominating at pH above 6.0 (McGrath and Smith, 1990). In contrast, Cr(III) in the form of oxides, hydroxides or sulfates, is much less mobile and exists mostly bound to organic matter in soil and aquatic environments. Cr(III) derivatives are insoluble at pH above 5.5 (Losi et al., 1994). Cr(VI) is a strong oxidizing agent and in the presence of organic matter is reduced to Cr(III); this transformation is faster in acid environments such as acidic soils (McGrath and Smith, 1990). In addition, Cr(III) may be also oxidized to Cr(VI) in the presence of excess oxygen, being transformed again to the more toxic form (Vajpayee et al., 1999).

3. Chromium abundance and pollution

Being the seventh most abundant element on earth, Cr is 21st in abundance in the crustal rocks (McGrath and Smith, 1990). Cr is commercially extracted mainly from the mineral ore chromite. Resistance of Cr to oxidation has led to its use in corrosion-resistant alloys for more than a century. World production of Cr is in the

order of 10^7 tons per year and 60-70% is used in alloys, including stainless steel; 15% is used in chemical industrial processes mainly leather tanning, pigments and electroplating (Stern, 1982; Papp, 1985; McGrath and Smith, 1990). Its widespread use has converted Cr in a serious air, soil and water pollutant (Khasim et al., 1989; Armienta-Hernández and Rodríguez-Castillo, 1995).

Cr(VI) is rapidly reduced biotically or abiotically to Cr(III); however, high levels of Cr(VI) may overcome the reducing capacity of the environment and thus persist as a pollutant. Cr abundance in Earth's crust ranges from 100 to 300 $\mu\text{g/g}$. Soils may contain between 5 and 3,000 μg of chromium per gram (Shewry and Peterson, 1976). Cr concentrations in non-polluted waters vary from 0.1 to 0.5 ppm in fresh waters and from 0.0016 to 0.05 ppm in oceanic waters (De Filippis and Pallaghy, 1994). In geothermal discharges in New Zealand, 2-3 ppm, and in sediments in estuaries in the U.K. 30-800 ppm Cr have been recorded (De Filippis and Pallaghy, 1994). In Parma Valley, Italy, 0.4 ppm were found in an unpolluted lake, whereas in a polluted river downstream 4.4 ppm were quantified. Average Cr levels in the Great Lakes are 0.001-0.002 ppm, but Cr as high as 0.005 ppm has been reported in Canadian polluted streams (Wong and Trevors, 1988). In polluted waters from an electroplating effluent in India 40,000-56,000 ppm were found (De Filippis and Pallaghy, 1994).

4. Biological significance of chromium

In 1959 Cr was recognized as an essential trace element in humans because of its role in glucose utilization (Mertz, 1969, 1982). Later, it was shown that Cr(III) interacts with insulin receptors inducing an increase in their affinity for the hormone (Chaney, 1986; Morris et al., 1995). On the other hand, Cr competes with Fe(III) for binding to plasmatic transferrin (Offenbacher y Pi-Sunyer, 1988). A role of Cr in the metabolism of lipids, such as cholesterol, has been suggested (Teissedre et al., 1996). No protein or enzyme is known in which Cr is a constitutive element for plant metabolism. Similarly, Cr requirements by bacteria, algae and fungi have not been documented (Wong and Trevors, 1988).

5. Chromium transport and accumulation

Chromate [CrO_4^{2-} , Cr(VI)] is actively transported by biological membranes in both procaryotes (Dreyfuss, 1964) and eucaryotes (Wiegand et al., 1985; Alexander and Aashet, 1995). Once inside the cells, Cr(VI) is reduced to Cr(III) probably via the unstable Cr(V) and Cr(IV) states (Arslan et al., 1987; Liu et al., 1995, see however Zayed et al., 1998 for an opposite result). In contrast, most cells are impermeable to Cr(III) probably because it forms water insoluble compounds in non-acidic aqueous solutions (Cary, 1982; Levis and Bianchi, 1982; Alcedo and Wetterhahn,

1990).

5.1. Microbial chromium transport and accumulation

The transport of chromate through the sulfate transport system was first demonstrated in *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964; Pardee et al., 1966). Later, a similar mechanism was described in *Escherichia coli* (Karbonowska et al., 1977; Sirko et al., 1990). The sulfate transport system of *S. typhimurium* and *E. coli* (CysPTWA) comprises an outer membrane porin, a periplasmic sulfate-binding protein, two inner-membrane sulfate/thiosulfate binding polypeptides, and a membrane-associated cytoplasmic ATPase. This protein complex catalyzes the active transport of sulfate and it is coupled to the cysteine biosynthetic pathway (Hryniewicz et al., 1990). Chromate is a competitive inhibitor of the sulfate transport system in *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake et al., 1987) and *Alcaligenes eutrophus* (Nies et al., 1989). The analogy between sulfate and chromate lies upon the fact that both oxyanions are tetrahedral molecules with comparable ionic and hydration radii (Pardee et al., 1966).

Energy-dependent transport of CrO_4 [Cr(VI)] was found in the cyanobacterium *Anabaena doliolum* (Rai et al., 1992); Cr uptake showed a biphasic behavior and was dependent on Cr concentration.

In contrast to other metals, which predominantly form cationic species, Cr

exists mainly in the oxyanion form (i.e. CrO_4^{2-}) and thus can not be trapped by the anionic components of bacterial envelopes (Volesky and Holan, 1995). Cationic Cr(III) derivatives, however, bind tightly to *Salmonella* lipopolysaccharides (Snyder et al., 1978), *Bacillus subtilis* and *E. coli* cell walls (Flemming et al., 1990), and capsular polymers of *B. licheniformis* (McLean et al., 1990).

Taxa differences in Cr accumulation rates have been reported in algae: green algae retain more Cr (as well as Al and Fe) than brown or red algae (De Filippis and Pallaghy, 1994). Data on chromium transport in algae are scarce (Schroll, 1978).

In yeasts, Cr(VI) may enter cells via a nonspecific anion carrier, the permease system, which transports different anions such as sulfate and phosphate (Borst-Pauwels, 1981). Some chromate-resistant mutants of *Neurospora crassa* showed strongly reduced sulfate transport properties (Marzluf, 1970). Further studies revealed that Cr(VI) toxicity was due to its specific antagonism to sulfate uptake, whereas Cr(III) toxicity resulted from antagonism with iron transport (Ramana and Sastry, 1994). By using culture media with different sulfur sources, it was shown that the sulfate transport system is also used for chromate uptake in *Candida* sp., and to some degree in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* (Pepi and Baldi, 1992).

5.2. Chromium transport and accumulation in plants

There are conflicting results regarding which form of Cr is accumulated by plants. The interconversion of different Cr forms is quite frequent in soil and hydroponic media during long-term experiments, making the analyses difficult. In studies with bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) no differences in the uptake of either Cr(III) or Cr(VI) were detected after nine days of incubation with 0.044 ppm Cr (0.89 μM) (Huffman and Allaway, 1973). However, ^{51}Cr compounds were not analyzed in the medium and thus, no information on Cr interconversion was provided. Roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants grown in 10 μM Cr(III) showed higher Cr levels than roots of plants grown in Cr(VI), although in shoots the opposite was observed (Skeffington et al., 1976). In contrast, in seven out of ten crop species analyzed, more Cr was accumulated when grown with Cr(VI) than with Cr(III) (Zayed et al., 1998). Based on these results, it is clear that preferences on Cr uptake depend on the kind of the studied plant.

Measurements of ^{51}Cr uptake rate by barley roots showed the following values: 190 $\mu\text{mol/g}$ dry weight (DW) per h in 1 mM Cr(III) and 45 $\mu\text{mol/g}$ DW per h in 1 mM Cr(VI) (Skeffington et al. 1976). Rates of Cr uptake for other crops have not been reported.

Cr complexation with organic compounds is involved in facilitating Cr

availability to plants (Srivastava et al., 1999). For instance, wheat (*Triticum vulgare*) plants grown in hydroponic cultures with 2 ppm (38.4 μM) CrCl₃ and 198 ppm of oxalic acid, malate, or glycine accumulated more Cr (578, 477 or 360 $\mu\text{g/g}$ DW, respectively) in their roots than plants exposed to Cr alone (94.8 $\mu\text{g/g}$ DW).

Evidence for independent uptake mechanisms for Cr³⁺ and CrO₄²⁻ in plants has been presented. By using metabolic inhibitors, such as azide or dinitrophenol, a substantial decrease in CrO₄²⁻ but not in Cr³⁺ uptake was observed in barley seedlings. These results indicate that Cr(VI) uptake depends on metabolic energy whereas Cr(III) uptake does not (Skeffington et al., 1976). However, an active uptake of both Cr species, slightly higher for Cr³⁺ than for CrO₄²⁻, has also been reported in barley seedlings (Ramachandran et al., 1980).

As in microorganisms, the sulfate transport system is apparently involved in CrO₄²⁻ uptake by plants, since sulfate inhibits competitively CrO₄²⁻ uptake in barley seedlings (Shewry and Peterson, 1974).

The translocation of Cr inside the plant depends on the oxidation state of the supply (Mishra et al., 1995) as well as on the plant species. By feeding barley seedlings with $^{51}\text{Cr}^{3+}$ or $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$, a higher content of ^{51}Cr was found in shoots when provided as CrO₄²⁻ (Skeffington et al., 1976). The results showed that only 0.5%

of the Cr^{3+} absorbed by the basal part of the root moved upwards after 4h, whereas 3.4% of absorbed CrO_4^{2-} moved under the same conditions. These results suggest that Cr is transported largely by the xylem. However, the ions are quite mobile when fed to the base of cut stems; 24% Cr^{3+} and 53% CrO_4^{2-} absorbed were transported beyond the basal 0.5 cm. It seems that both forms hardly enter the vascular tissue but once there they can be readily transported. CrO_4^{2-} moves faster in the xylem than Cr^{3+} presumably because the latter is held up by electrostatic interaction with the vessel walls, as occurs for Ca^{2+} (Skeffington et al., 1976). The low rates of transport can explain the low levels of Cr in shoots compared to roots, as it has been observed in all the studied plants (see below).

In a recent study using X ray absorption spectroscopy (XAS), only Cr(III) was found in tissues of plants grown with either Cr(III) or Cr(VI) (Zayed et al., 1998). From these results emerge the following question: since any form of Cr taken up by plants is converted to Cr(III), how a difference in translocation between Cr(III) and Cr(VI) fed plants can occur? One possibility is that only if the Cr(VI) supply is very high and exceeds the capacity of roots cortex cells to reduce and to accumulate it, the Cr concentration in aerial parts of plants increases. Other explanation is that a small fraction of Cr(VI) is transported to the aerial parts of the plant without being transformed to Cr(III) by root or aerial tissues.

Levels of Cr in plant tissues depend on the plant species and are correlated with the concentration and the form of Cr supplied in the culture media (Mishra et al., 1995; Kleiman and Cogliatti, 1998). In barley seedlings, Cr concentrations were 0.03 and 0.05 mg/g DW in shoots and 0.12 and 0.8 mg/g DW in roots exposed to 10 μM Cr(III) or Cr(VI), respectively. When 1 mM Cr was supplied, 0.5 and 0.8 mg/g DW in shoots and 6 and 4 mg/g DW in roots were detected in response to Cr(III) or Cr(VI), respectively (Skeffington et al., 1976). In spinach growing in the presence of 100 μM Cr(III), 0.014 mg Cr/g DW were determined in stems and 0.038 mg/g DW in roots. For 100 μM Cr(VI), concentrations of 5.7 μg Cr/g DW were observed in stems and 19 μg Cr/g DW in roots (Srivastava et al., 1998). In leaves and stems of rape (*Brassica napus* L.), Cr concentrations were 3 -5 mg/g DW in plants treated with 1.9 mM Cr(VI) during 7 to 14 days, whereas in plants treated with the same concentration of Cr(III), ten times lower Cr was found (Hauschild, 1993).

Differential accumulation of Cr in plant organs has been observed. Roots accumulate 10 to 100 times more Cr than shoots and other tissues; this difference depends on the plant species and on the Cr form supplied in the culture media (Skeffington et al., 1976; Srivastava et al., 1998; Zayed et al., 1998; Srivastava et al., 1999). In bean, as few as 0.1% of total Cr accumulated is found in seeds, whereas roots concentrate 98% of total Cr uptake

(Huffman and Allaway, 1973).

Huge values of Cr accumulation were observed for cauliflower, kale, and cabbage, plants known as sulfur-loving species, and not for peas, strawberry, or lettuce: 350 mg Cr/Kg DW in roots; 2 mg Cr/Kg DW in shoots for plants growing in Cr(VI) and 160 mg/Kg DW in roots and less than 1.67 mg/Kg DW in shoots for plants growing in Cr(III) (Zayed et al., 1998). It should be noted that a *Brassica* spp. showed a higher ability to take up and accumulate Cr and other heavy metals than other plant species (Kumar et al., 1995). The mechanisms underlying this hyperaccumulating ability of heavy metals by *Brassica* have not been defined.

It has not been established which subcellular compartments stores Cr in plant tissues. Lytle et al. (1998) determined by XAS that in roots of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart) Cr(III) was hydrated by water, but in petiole, and more markedly in leaf, a fraction of Cr(III) was bound to oxalate and probably to other organic acids. Subcellular compartmentation for Cr(III) storage in roots may be at the vacuoles of the cortex cells. However, there is no information on the mechanism accounting for Cr compounds entrance to the vacuole.

6. Chromium toxicity

The biological effects of Cr depend on its oxidation state: Cr(VI) is highly toxic to most organisms whereas Cr(III) is relatively innocuous (Katz and Salem,

1993). Chromate has been largely identified as a toxic molecule and it is considered a carcinogen in humans (Enterline, 1974; Leonard and Lauvery's, 1980; Langerverf et al., 1985; Langard, 1990; Costa, 1997). On the other hand, Cr(III) complexes with most of the relevant biological molecules (Snow, 1991; Miller et al., 1991; Zhitkovich et al., 1996). Cr toxicity is related to the process of reduction of Cr(VI) to lower oxidation states, not necessarily to Cr(III) (Kawanishi et al., 1986), in which free radicals are generated (Kadiiska et al., 1994). Reduction of Cr(VI) to Cr(III) has been reported in many biological systems; however, the formation of Cr(V) during this process is the most likely mechanism involved in Cr toxicity (Kawanishi et al., 1986). Cr(V) complexes are formed from Cr(VI) by physiological reducing agents such as NAD(P)H, FADH₂, several pentoses, and glutathione (Shi and Dalal, 1990a, b). These complexes react with H₂O₂ to generate significant amounts of ·OH radicals with no associated generation of O₂⁻. The ·OH radicals may trigger directly DNA alterations as well as other toxic effects (Shi and Dalal, 1990a).

Additional intracellular chromate reducers are vitamins C and B₁₂, cytochrome P-450, and the mitochondrial respiratory chain (Alcedo and Wetterhahn, 1990). Intracellular Cr(III) may be sequestered by phosphate groups in DNA affecting replication, transcription and causing mutagenesis (Nishio and Uyeki, 1985; Costa, 1991; Kortenkamp et al.,

1991; Bridgewater et al., 1994). Oxidative damage on DNA is considered the basis of the genotoxic effects produced by Cr (Aiyar et al., 1991; Itoh et al., 1995; Luo et al., 1996). Cr(III) may also react with carboxyl and sulfhydryl groups of proteins causing alterations in their structure and catalytic activities (Levis and Bianchi, 1982). Modification of the DNA polymerase and other enzyme activities may be caused by the displacement of magnesium ions by Cr(III) (Snow, 1994).

6.1. Chromium toxicity in microorganisms

Several toxic effects of Cr on bacteria and algae have been reported (reviewed by Wong and Trevors, 1988). A major toxic alteration caused by chromate in bacteria is the competitive inhibition of the sulfate transport pathway (Pardee et al., 1966; Ohtake et al., 1987; Nies et al., 1989). In *S. typhimurium*, *E. coli* and *B. subtilis*, chromate effects range from mutagenic to inhibitory depending on the concentration used (Venitt and Levy, 1974; Nishioka, 1975; Petrilli and De Flora, 1977; Arluskas et al., 1985). In addition, LaVelle (1986) found that chromate potentiates the mutagenic damage of acridine dyes in *E. coli* and *S. typhimurium*, inferring that the mutagenic effects of Cr derive from a disfunction of the DNA repair systems.

In vivo generation of Cr(V) from Cr(VI) by the algae *Spirogyra* and *Mougeotia* has been described (Liu et al.,

1995). Different toxic effects on growth rate, photosynthesis and morphology are induced on algae by concentrations of Cr ranging from 0.02 to 10 ppm (0.4-200 μ M). The most obvious effect is an inhibition of growth in a variety of algae species including *Chlorella* spp., *Chlorella pyrenoidosa*, *Cladophora glomerata*, *Scenedesmus* spp., *Microcystis* spp., *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema capricornutum* and *Ulothrix fimbriata* (Wong and Trevors, 1988). Growth of *Chlorella vulgaris* was unaffected by 45-100 ppm Cr(III) or Cr(VI), whereas no growth of *Scenedesmus acutus* was detected at concentrations of Cr higher than 15 ppm (Travieso et al., 1999). However, Brady et al. (1994) reported algal colony growth of *Scenedesmus* and *Selenastrum* in agar plates when cells were previously streaked with 100 ppm Cr(III) but not with 100 ppm Cr(VI). Inhibition of growth by 50% for the diatom *Nitzschia closterium* and the green alga *Dunaliella tertiolecta* by 2.4 and 17.8 ppm Cr(VI), respectively, was reported (Peterson and Stauber, 1996). The mechanism underlying the different sensitivity to Cr in algae remains to be elucidated. However, as with other metals, the differences could be related to the size of the organism, the rate of metal uptake, and the density of binding sites (Wong and Trevors, 1988).

In *Euglena gracilis*, a lengthening in the lag growth phase was induced by 0.2-1 mM Cr(VI), whereas Cr(III) decreased the rate and extent of growth (Brochiero et

al., 1984). Inhibition of growth in *Euglena* correlates with the arrest of cells in the G-2 phase of cell cycle and inhibition of respiration and photosynthesis (Fasulo et al., 1983). Light-grown *Euglena* cells were more sensitive to Cr(VI) than dark-grown cells (Fig. 1): there was a strong (90%) inhibition of growth in photosynthetic cells incubated with 1 mM Cr(VI); in heterotrophic cells the inhibition of growth was 76%. Lower concentrations of Cr were well tolerated in both culture conditions (Fig. 1). This observation places *Euglena* among the most Cr-tolerant algae species. Cr(VI) also induces alterations in the cytoskeleton of *E. gracilis*, which may be involved in the loss of motility (Bassi and Donini, 1984). Inhibition of photosynthesis by 1.5 ppm Cr was reported for *Chlorella* (Wong and Trevors, 1988), *Euglena* (Fasulo et al., 1983) and *Scenedesmus* (Corradi et al., 1995b).

Salinity, pH, sulfate concentration and organic ligands affect Cr toxicity in algae. In estuarine algae, Cr(VI) toxicity is inversely proportional to salinity (Frey et al., 1983; De Filippis and Pallaghy, 1994). Similarly to bacteria, a competition between Cr and sulfate has been proposed (Wong and Trevors, 1988). In *S. capricornutum*, Cr toxicity is higher at pH 4 than at pH 6-12 (Wong and Trevors, 1988). The presence of other metals may also influence Cr toxicity. In *Scenedesmus*, Cr and Cu showed a synergistic effect with Cd for growth inhibition (Lasheen et al., 1990).

In fungal cells, Cr(VI) compounds are also more toxic than those containing Cr(III) (Babich et al., 1982; Ramana and Sastry, 1994). The most obvious effect of toxicity by Cr(VI) in fungal cells is growth inhibition (Henderson, 1989; Baldi et al., 1990; Baldi and Pepi, 1991). In *S. cerevisiae*, chromate toxicity was stronger in cells grown in non-fermentable carbon sources than in those grown in fermentable substrates (Henderson, 1989); other effects included inhibition of oxygen uptake (Kharab and Sing, 1987; Henderson, 1989) and induction of *petite* mutations. These results suggest that chromate targets specifically the mitochondria of *S. cerevisiae* (Henderson, 1989). Additional effects of Cr in *S. cerevisiae* cells include genotoxic alterations such as gene conversion (Kharab and Singh, 1985; Galli et al., 1985) and mutation (Kharab and Singh, 1985; Galli et al., 1985; Cheng et al., 1998).

6.2. Chromium toxicity in plants

Whereas Cr(VI) has been clearly demonstrated to produce serious damage to living cells and also to be a potent carcinogen agent, it is widely considered that Cr(III) is less toxic because of its extremely low solubility, which prevents its leaching into ground water or its uptake by plants. However, studies in plants have shown that Cr(III) also produces serious problems in living tissues although at higher concentrations than Cr(VI).

The effects of Cr on growth and

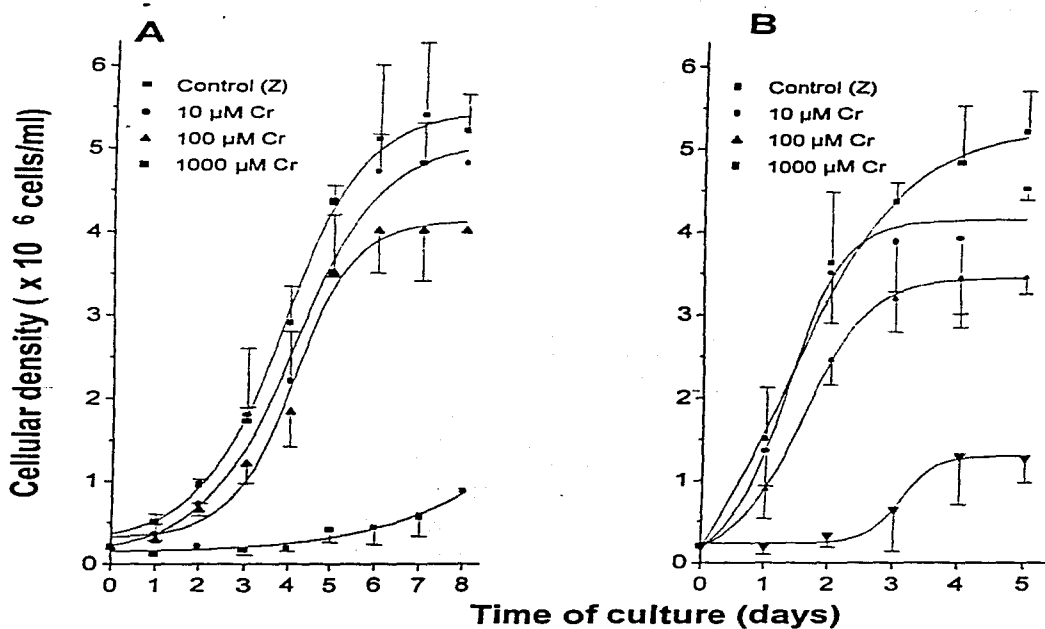


Figure 1.—Effect of chromate on the growth of *Euglena. E. gracilis* strain Z was cultured under white fluorescent light-dark (12h/12h) regime (A) or in complete darkness (B). Cultures were incubated at 25°C without shaking (A) or under orbital shaking (B) with the indicated K_2CrO_4 concentrations. Cells were counted with a Neubauer chamber ($n=3$, mean \pm S.D.). Cell viability: (A) control 98%, 10 μ M 96%, 100 μ M 91%, 1,000 μ M 76%; (B) control 99%, 10 μ M 99%, 100 μ M 93%, 1,000 μ M 81%. Devars et al., unpublished data.

development have been studied in several plants and under different conditions. The most evident Cr effect in plants is also the inhibition of growth. Barley seedlings grown for 7 days in 1 or 10 μM of either form of Cr showed a diminution of 20-30% in growth. Plants supplied with 100 μM Cr(III) showed 40% of growth inhibition and in plants supplied with Cr(VI) growth inhibition reached up to 75% in shoots and 90% in roots. One mM Cr stopped root growth and inhibited shoot growth by 70 and 90% when supplied as Cr(III) and Cr(VI), respectively (Skeffington et al., 1976). Thus a consistent result in all published works is that Cr(VI) inhibits the growth of roots and shoots to a greater extent than Cr(III).

Symptoms of Cr toxicity in plants have been described as progressive stages of chlorosis and necrosis, which intensify with increasing concentrations and time exposure. Barley plants exposed to 50 ppm (0.96 mM) Cr(VI), remained vital although with altered appearance; 100 ppm (1.9 mM) Cr(VI) caused a stressed appearance after two days of exposure, but after 7 to 10 days, all barley plants died. Toxic symptoms produced by Cr(VI) are stronger than those caused by Cr(III), and occur earlier and at lower concentrations (Hauschild, 1993).

Studies on the biochemical effect of Cr in plants have shown that chlorophyll content, and catalase and peroxidase activities are reduced, whereas acidic phosphatase and ribonuclease activities

increased, when *Triticum aestivum* was exposed to increasing concentrations of Cr (Sharma and Sharma, 1996). Lbik-Nowak and Gabara (1997) observed that treating *Pisum sativum* roots with Cr for 144 h promoted the lowering in the content of nucleolar RNA together with enhanced levels of nuclear and cytoplasmic RNA, resulting in an increase in total RNA. Reduction in protein content and in nitrate reductase activity analyzed *in vitro* has also been reported (Vajpayee et al., 1999). Cr also elicitates the synthesis of polyamines in barley. Putrescine levels were increased up to 10 times in plants grown either with 100 ppm (1.9 mM) Cr(VI) or Cr(III). Cr(VI) was a faster and more efficient inducer of putrescine increase than Cr(III). Shortly after putrescine induction, decrease in growth, chlorosis, induction of leaf chitinase activity and lately reduction of shoot growth and lowered water content in leaves were observed (Hauschild, 1993).

Micronuclei formation and chromosome aberrations have been observed in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips when they are exposed to toxic levels of heavy metals and organic contaminants (Minissi et al., 1998; Rank and Nielsen, 1998). It was recently found that the levels of micronuclei formation directly correlated with the Cr levels detected in contaminated soils (Wang, 1999). However, levels of other heavy metals present in the soil samples were not measured, and hence the possibility that the nucleus aberrations observed could be due

to the presence of other heavy metals remains.

7. Resistance to chromium compounds

Environmental pollution by Cr is considered as the main cause for the appearance of microbial and plant resistant variants: Cr exposure may select those strains able to tolerate toxic levels of the ion. Resistance to chromate mainly results from alterations in the sulfate transport pathway or by an increased reduction of Cr(VI) to less toxic Cr(III), although other mechanisms may function in different organisms. For example, capsular polymers are known to protect bacterial cells from the toxic effects of heavy metals (Geesey and Jang, 1989). Nonmucoid variants from a coryneform bacterium isolated from a Cr-polluted marine sediment were more sensitive to Cr(III) than a mucoid wild type strain (Aislabie and Loutit, 1986). The capsulated strain accumulated more Cr than the nonmucoid variant; moreover, higher than 80% of Cr was in the exopolymer.

Since the initial reports showing that the sulfate transport system in *S. typhimurium* was involved in chromate uptake, it was clear that mutations in this system may confer resistance to chromate (Pardee et al., 1966; Ohta et al., 1971). However, it is not known the frequency or the significance of these type of mutations in the tolerance to chromate in bacterial populations of different environments.

7.1. Bacterial plasmid-mediated resistance

A variety of chromate-resistant bacterial isolates have been reported, including strains from environmental (Luli et al., 1983; DeVicente et al., 1990) and clinical (Summers and Jacoby, 1978; Cervantes-Vega et al., 1986) settings. In these natural isolates chromate tolerance is usually associated with plasmids (Cervantes and Silver, 1992). Plasmid-mediated resistance has been found in species of *Streptococcus* (Efstathiou and McKay, 1977), *Pseudomonas* (Summers and Jacoby, 1978; Bopp et al., 1983; Cervantes-Vega et al., 1986; Cervantes and Ohtake, 1988; Dhakephalkar et al., 1996), and *Alcaligenes* (Nies et al., 1990) (Table I).

The involvement of sulfate transport in plasmid-conferred chromate resistance has been ruled out in both *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake et al., 1987) and *Alcaligenes eutrophus* (Nies et al., 1989); resistant strains with plasmids transported sulfate with a similar kinetics to that shown by plasmidless chromate-sensitive strains. Bopp and Ehrlich (1988) also showed that Cr(VI) reduction is independent of the chromate resistance mechanism conferred by plasmid pLHB1 of *P. fluorescens*. Dhakephalkar et al. (1996) reported that plasmid pARI180, from a *Pseudomonas mendocina* strain, determined both chromate resistance and reduction; however, no conclusive data were provided and further analysis of this

Table 1. Resistance to chromate conferred by bacterial plasmids

Bacteria	Plasmid	Origin	Reference
<i>Streptococcus lactis</i>	pLM3001	Lactic fermentation	Efstathiou & McKay 1977
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pMG6	Clinical	Summers & Jacoby 1978
<i>P. fluorescens</i>	pLHB1	River sediment	Bopp et al. 1983
<i>P. aeruginosa</i>	pUM505	Clinical	Cervantes & Ohtake 1988
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	pMOL28	Polluted soil	Nies et al. 1989
<i>P. mendocina</i>	pARI180	Polluted soil	Dhakephalkar et al. 1996

strain has not been published.

Two plasmid-associated chromate resistance determinants have been analyzed to the molecular level: those from plasmids pUM505 of *P. aeruginosa* (Cervantes et al., 1990) and pMOL28 of *A. eutrophus* (Nies et al., 1990). The chromate resistance *chrA* genes were cloned and sequenced. From the nucleotide sequence it was deduced that pUM505 and pMOL28 encode hydrophobic proteins, named ChrA, of 416 and 410 amino acid residues, respectively (Cervantes et al., 1990; Nies et al., 1990). ChrA from both *Pseudomonas* and *Alcaligenes* were expressed in *E. coli* but they did not confer Cr resistance in this host (Cervantes et al., 1990; Nies et al., 1990). The ChrA polypeptides shared 29% of identical residues (Table 2). A second gene, *chrB*, was found in the *Alcaligenes* determinant but not in that of *Pseudomonas* and was assigned a role in the regulation (induction) by chromate of the resistance phenotype (Nies et al., 1990). Based on their amino acid composition and hydrophobic profiles, ChrA from both *Pseudomonas* and *Alcaligenes* are considered as membrane proteins probably having 12 transmembrane spans (Cervantes and Silver, 1992), as has been shown for other inner membrane transport proteins (Nikaido and Saier, 1992); in contrast, Nies et al. (1998) suggested that the ChrA proteins show only 10 transmembrane spans. Further ChrA homologs have been found from protein sequence databases (Table 2), including proteins deduced from

the sequenced genomes of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* (Fraser et al., 1997), the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* (Presecan et al., 1997), the cyanobacterium *Synechocystis* (Kaneko et al., 1996) and even the archaea *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996). The role of these putative ChrA homologs in chromate resistance has not been established. On the other hand, sulfur-regulated protein SrpC from a plasmid of another cyanobacterium, *Synechococcus*, also showed similarity to *Alcaligenes* ChrA (Table 2); SrpC seems to be involved in sulfate transport, but not in chromate resistance, in *Synechococcus* (Nicholson and Laudenbach, 1995).

In accordance with its apparent membrane location, ChrA caused a diminished chromate uptake in *Pseudomonas* resistant strains (Cervantes et al., 1990; Alvarez et al., 1999) (Fig. 2A). Similar results were also found in *Alcaligenes* (Nies et al., 1990). A reduced chromate uptake has also been observed in plasmid-containing cells of *P. fluorescens* (Ohtake et al., 1987) and *Enterobacter cloacae* (Ohtake et al., 1990c). Nies et al. (1998) suggested that ChrA proteins may function as chromate/sulfate antiporters although no experimental evidence has been obtained in that direction.

Both amino acid composition and hydrophobic profiles of ChrA are similar to those from ArsB, the inner membrane protein of the arsenic resistance operons which extrudes the oxyanion arsenite in

Table 2. Similarity of ChrA protein homologs

Protein (bacteria)	Size(aa)	% identical aminoacids ^a	% hydrophobic aminoacids	Reference
ChrA (<i>P. aeruginosa</i>)	416	-	63	Cervantes et al. 1990
ChrA (<i>A. eutrophus</i>)	401	29	63	Nies et al. 1990
SrpC (<i>Synechococcus</i>)	393	23 ^b	58	Nicholson & Laudenbach 1995
X ^c (<i>Synechocystis</i>)	399	30	60	Kaneko et al. 1996
MJ0718 (<i>Methanococcus</i>)	402	26	60	Bult et al. 1996
ArsB (<i>E. coli</i>) ^c	429	20	62	Chen et al. 1986

^a As compared with *P. aeruginosa* ChrA protein.

^b Shares 62% identity with *A. eutrophus* ChrA protein.

^c Membrane protein from the arsenic-resistance operon of *E. coli* plasmid R773.

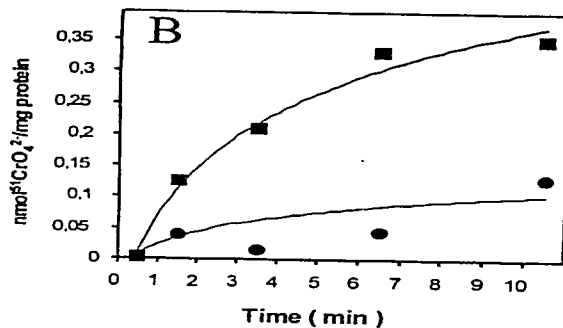
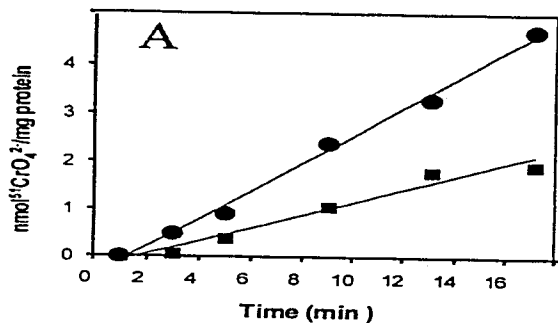


Figure 2.—Chromate uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. Intact cells (A) or everted membrane vesicles (B) of chromate-sensitive PAO1 strain (●) and chromate-resistant PAO1 (pCRO616) strain (■) were tested. A, bacterial suspensions of log phase cultures were incubated at 37°C with 50 μM Na₂⁵¹CrO₄ and the radioactivity incorporated to cells was measured after filtration. B, everted membrane vesicles were incubated with 10 μM Na₂⁵¹CrO₄ and processed as in (A). Alvarez et al., unpublished data.

several bacterial species (Wu et al., 1992) (Table 2). ArsB has been shown to possess 12 transmembrane segments (Wu et al., 1992), as suggested for ChrA (Fig. 3). Thus, a chromate efflux system was postulated as the mechanism of chromate resistance by ChrA (Cervantes and Silver, 1992). Using everted membrane vesicles it was recently demonstrated that resistance to chromate conferred by ChrA in *P. aeruginosa* is based on an efflux system that extrudes chromate from the cytoplasm (Alvarez et al., 1999). Vesicles obtained from the resistant strain accumulated significantly more chromate than those from the sensitive one (Fig. 2B). Cr accumulation followed a Michaelis-Menten kinetics with a K_m of 0.12 mM chromate; interestingly, this K_m value was similar to that of 0.14 mM reported for the efflux of arsenite by ArsB (Kuroda et al., 1997). It was also shown that chromate efflux is dependent on NADH addition and it was abolished by respiratory-chain inhibitors and uncouplers, suggesting that chromate efflux depends on the membrane potential (Alvarez et al., 1999). Chromate efflux by membrane vesicles was also inhibited by sulfate, suggesting that ChrA binds sulfate.

7.2. Bacterial Cr(VI) reduction

Bacterial redox transformations of metals have been widely studied (Summers and Silver, 1978; Lovley, 1993; Wakatsuki, 1995). Reduction of Cr(VI) to less-toxic Cr(III) has been suggested as an additional chromosome-encoded Cr(VI)-resistance

mechanism, in addition to the plasmid-encoded tolerance (Horitsu et al., 1987; Cervantes and Silver, 1992; Ohtake and Silver, 1994). The first example of bacterial chromate reduction was reported by Romanenko and Koren'kov (1977). They described a bacterial culture that utilizes chromates and dichromates as hydrogen acceptors only under anaerobic conditions; by this ability the strain was named as *Pseudomonas dechromaticans*. A similar bacterial species was described by Lebedeva and Lyalikova (1979); this novel species was designed *Pseudomonas chromatophila*, and was able to reduce Cr(VI) to Cr(III) from crocoite ore under anaerobic conditions.

In 1984, Bopp submitted the first patented Cr(VI)-reducing bacteria. In this patent it was described the use of *Pseudomonas fluorescens* strain LB300 for the removal of Cr from contaminated wastewaters. The characteristics of this microorganism include resistance to chromate and the ability to reduce Cr(VI) to Cr(III) in aqueous medium in the presence of an organic reductant in both aerobic and anaerobic conditions (Bopp and Ehrlich, 1988). A novel bacterium, isolated from Cr-containing industrial wastewaters, was discovered by Kvasnikov et al. (1985). For its ability to reduce Cr(VI) to Cr(III) under anaerobic conditions was named as *Aeromonas dechromatica*.

Enterobacter cloacae HO1 strain, described as a Cr(VI)-resistant bacterium

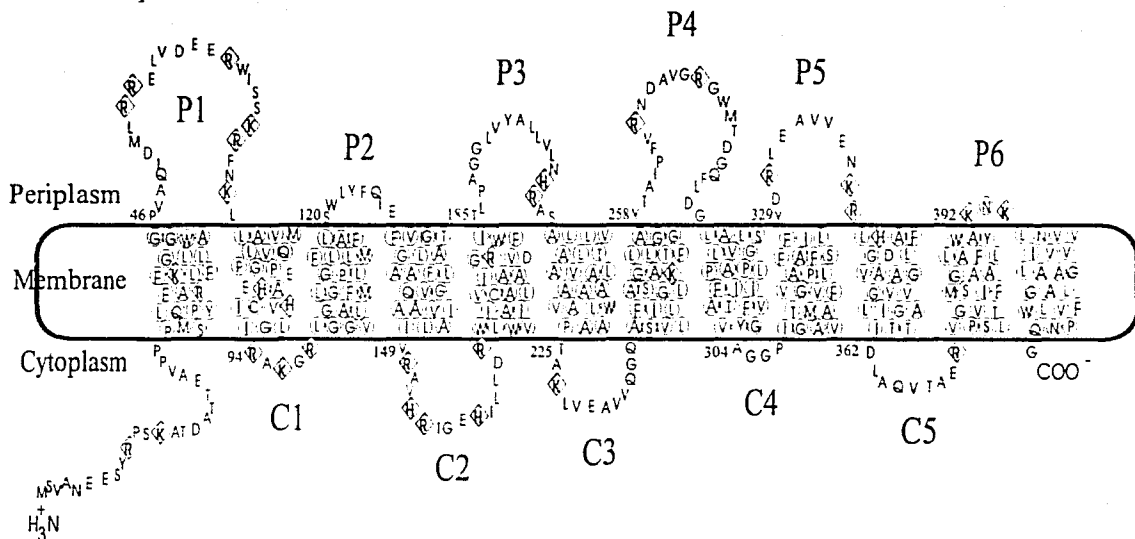


Figure 3.—Topological model of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. The scheme shows the aminoacid sequence of ChrA (416 aa) and its probable location within the inner membrane (according to hydropathy profiles obtained with the DNASTAR software). The model proposes 12 transmembrane spans (circled residues). Cytoplasmic (C) and periplasmic (P) numbered regions and the N and C ends are also shown. Basic residues (◊), probably involved in chromate binding, are highlighted.

(Wang et al., 1989), it is the most studied example of Cr(VI)-reducing bacteria. Resistance to chromate occurred under both aerobic and anaerobic conditions, whereas reduction of Cr(VI) to Cr(III) was observed only under anaerobic conditions (Ohtake et al., 1990a, b). The Cr(VI)-reducing activity was NADH-dependent and was abolished by respiratory-chain inhibitors and uncouplers. Assays using membrane vesicles of HO1 suggested that the Cr(VI) reductase was located at the inner side of the cell membrane (Wang et al., 1989). However, reduced Cr was precipitated in the external medium, suggesting that the reductase catalytic site was located at the outer side of the cell membrane. It was also found that the rate of Cr(VI) reduction was controlled by the redox potential, that a c548 cytochrome was involved, and that this activity may require *de novo* protein synthesis (Wang et al., 1990).

Pseudomonas ambigua G-1 was described as a bacterium with both chromate-resistance and Cr(VI)-reducing capabilities. The Cr(VI)-reducing ability was observed only under aerobic conditions (Horitsu et al., 1987). The Cr(VI)-reducing activity was located in the soluble fraction of cell-free extracts of *P. ambigua*. Suzuki et al. (1992) further reported the purification of a NAD(P)H-dependent Cr(VI) reductase from *P. ambigua* G-1. The estimated molecular mass for the intact enzyme was 65 kDa on gel filtration chromatography, and a subunit mass of 25 kDa under denaturing conditions. The

enzyme was active within a wide range of temperatures (40 to 70°C) and pH values (6 to 9), showing a K_m of 13 μM CrO_4^{2-} . These authors proposed a catalytic mechanism of Cr(VI) reduction; first, Cr(VI) takes one electron from NADH and generates Cr(V) as an intermediate; second, the Cr(V) intermediate accepts two electrons from NADH to produce Cr(III). The first step proceeds faster and both steps are carried out by a single enzyme (Suzuki et al., 1992).

Bacillus sp. QC1-2, a strain isolated from a Cr-polluted zone, was selected by its ability to both tolerate chromate and reduce Cr(VI) to Cr(III) (Fig. 4) (Campos et al., 1995). Cell suspensions of QC1-2 rapidly reduced Cr(VI) in both aerobic and anaerobic conditions, leaving the Cr reduced in the supernatant. *Bacillus* sp. QC1-2 was able to reduce Cr(VI) in the presence of toxic concentrations of heavy metals Hg, Ag, Cu, Mo, Zn, Mn, and As (Campos-Garcia et al., unpublished data). Cr(VI) reduction by QC1-2 cell suspensions occurred at a temperature interval of 10 to 40°C, with 37°C as optimal, and at pH between 6 to 9 with an optimal of 7. The Cr(VI)-reducing activity was NADH-dependent and was associated to the soluble fraction of cell-free extracts. In 1997, Campos-Garcia et al. reported the purification and partial characterization of the chromate reductase from QC1-2. The enzyme showed a molecular mass of 24 kDa under denaturing conditions and 44 kDa in native conditions. The partially

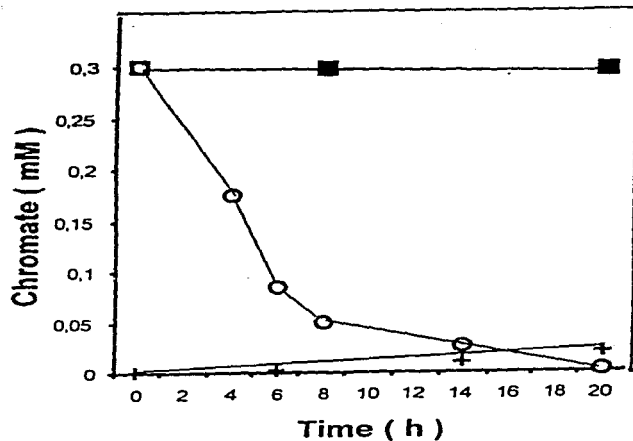


Figure 4.-Chromate reduction by *Bacillus* sp QC1-2. Cell suspensions (ca. 1×10^9 cells/ml) containing 0.3 mM chromate were incubated at 30°C for the indicated times. After centrifugation, Cr(VI) was quantified in the supernatant (○) and in the pellet (+). Total chromium was also measured in the supernatant (■). Total chromium and Cr(VI) were measured by atomic absorption spectrophotometry and by a spectrophotometric method using diphenylcarbazide, respectively; Cr(III) was obtained by the difference between total chromium and Cr(VI). Adapted from Campos et al. (1995) with permission.

purified enzyme showed a K_m of 0.35 mM for CrO_4^{2-} and a V_{max} of 50 nmol CrO_4^{2-} /min per mg of protein.

Pseudomonas fluorescens LB300, reported as a plasmid-encoded chromate-resistant strain, also showed the ability to reduce Cr(VI) (Bopp et al., 1983). Bopp and Ehrlich (1988) detected the Cr(VI)-reducing activity in both aerobic and anaerobic conditions. In aerobic conditions, the Cr(VI)-reducing activity was NADH-dependent, whereas under anaerobic conditions it was membrane-associated, suggesting the utilization of Cr(VI) as an electron acceptor. These authors did not find significant differences in Cr(VI)-reducing activity between Cr(VI)-resistant *P. fluorescens* LB300 and a Cr(VI)-sensitive derivative, concluding that this activity was constitutive and independent of plasmid-encoded chromate resistance.

Ishibashi et al. (1990) reported Cr(VI) reduction to Cr(III) under aerobic conditions by cell suspensions and cell-free supernatants from chromate-sensitive *Pseudomonas putida* PRS2000 strain. Cr(VI) reduction required NAD(P)H for maximum activity and was associated to the soluble fraction. The crude cell-free Cr(VI)-reducing activity was heat-labile and showed a K_m of 46 μM CrO_4^{2-} and an optimal pH of 6.5 to 7.5. In addition, neither sulfate, molybdate, vanadate, phosphate or nitrate affected Cr(VI) reduction either *in vitro* or with intact *P. putida* cells, while Hg^{2+} and Ag^+ ions were strong non-competitive inhibitors (Ishibashi

et al., 1990), suggesting the presence of essential thiol groups in non-catalytic sites.

The Cr(VI)-reducing ability of *Desulfovibrio vulgaris* was shown under anaerobic conditions and was H_2 -dependent when Cr(VI) was used as electron donor (Lovley and Phillips, 1994). This Cr(VI)-reducing activity was found in both soluble and membrane fractions, although the former reduced chromate faster. Cytochrome c3 was reported to catalyze uranium [U(VI)] reduction in *D. vulgaris* (Lovley et al., 1993). It was found that the Cr(VI)-reducing activity remained in the soluble fraction and that was also cytochrome c3-dependent. These results suggest that cytochrome c3 may function as both U(VI) and Cr(VI) reductase (Lovley and Phillips, 1994). Cr(VI) reduction in *D. vulgaris* was not inhibited by the heavy metals Ni, Mn, Co, Cu, Zn, Mg, V, Mo and Se at 100 μM each.

Cr(VI)-reduction by *Escherichia coli* ATCC 33456 was reported under both aerobic and anaerobic conditions, involving a soluble NADH-dependent reductase activity (Shen and Wang, 1993). This activity was not inhibited under aerobic or anaerobic conditions by cyanide, azide, or rotenone in both intact cells and the soluble fraction. Respiratory-chain-linked electron transport to Cr(VI) was also involved in Cr(VI) reduction, although it required the presence of soluble reductase activity to mediate electron transport to Cr(VI) (Shen and Wang, 1993).

Gvozdyak et al. (1986) reported the

reduction of Cr(VI) by a group of collection strains. This group was constituted by *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Flavobacterium devorans* 33, *Sarcina flava*, *Arthrobacter* sp. 654, *E. coli* K-12, *Achromobacter eurydice*, *Arthrobacter variabilis* and *Micrococcus roseus*. It was found that the Cr(VI)-reduction ability in these bacteria was associated with nonspecific activities, mainly cell's redox potential-dependent, or depended on the use of the Cr(VI) ion as the electron acceptor. A consortium of sulfate-reducing bacteria that tolerated high concentrations of chromate and other toxic heavy metals, removed 80 to 95% of Cr at concentrations ranging from 50 to 2000 ppm from metal-refinishing wastewaters (Fude et al., 1994). It was suggested that Cr(VI) reduction was carried out by the H₂S produced by sulfate-reducing bacteria, accumulating a precipitate of Cr(III) on the bacterial surfaces (Fude et al., 1994). **Table 3** summarizes the properties of some bacterial reductases.

After the pioneer discoveries and the more complete studies described above, several Cr(VI)-reducing microorganisms have been reported. For instance, *Pseudomonas* K21 strain reduced chromate under aerobic conditions (Shimada and Matsushima, 1983); Das and Chandra (1990) reported that Cr(VI) was reduced in the presence of NAD(P)H in cell extracts of *Streptomyces* species; Llovera et al. (1993) showed Cr(VI) reduction by *Agrobacterium radiobacter*. In an *Enterobacter aerogenes*

strain, Cr(VI) reduction was carried out nonspecifically by a nitrite-reductase activity (Clark, 1994). Dhakephalkar et al. (1996) apparently found the association of chromate resistance and reduction with a plasmid in *Pseudomonas mendocina*, but their data was not conclusive. A spore-forming sulfate-reducing bacterium *Desulfoformaculum reducens* sp. MI-1 strain, reduced both Cr(VI) and U(VI) under anaerobic conditions using them as electron acceptors (Bradley and Obratsova, 1998). Plasmid-bearing heavy metal-resistant *Alcaligenes eutrophus* CH34 was also able to reduce Cr(VI) under aerobic conditions (Peitzsch et al., 1998).

7.3. Chromium resistance in algae
Scenedesmus acutus develops tolerance to Cr(VI) after being treated for three months with 1 ppm potassium chromate, leading to a Cr-tolerant progeny by sexual reproduction; with chromate, asexual reproduction does not occur in *Scenedesmus* (Corradi et al., 1995a). Induction of plastid-deprived gametes is favored in the presence of Cr (Corradi et al., 1995b). Such interference of Cr with plastidial metabolism has been described in *Scenedesmus* (Corradi et al., 1993), *Chlorella* (Wong and Chang, 1991), and *Euglena* (Fasulo et al., 1983). Interestingly, tolerance to Cr(VI) in *Scenedesmus* is not related to a decreased metal uptake (Gorbi et al., 1996). The Cr-tolerant strain is less sensitive to copper (1.5 ppm) but not to zinc (Abd-El-Monem et al., 1998).

Table 3.- Properties of bacterial Cr(VI) reductases

Bacteria	Reduction conditions	Enzyme location	Electron donor	Molecular mass (kDa)	Reference
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ana	M	NADH	ND	Wang et al. 1989
<i>Pseudomonas ambigua</i>	Aer	S	NAD(P)H	65	Suzuki et al. 1992
<i>Bacillus sp.</i>	Aer & Ana	S	NADH	44	Campos-Garcia et al. 1997
<i>P. fluorescens</i>	Aer & Ana	M	ND	ND	Bopp and Ehrlich 1988
<i>P. putida</i>	Aer	S	NAD(P)H	ND	Ishibashi et al. 1990
<i>Escherichia coli</i>	Aer & Ana	S	ND	ND	Shen and Wang 1993
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Ana	S & M	H ₂	ND	Lovley and Phillips 1994

Abbreviations: Ana, anaerobic; Aer, aerobic; M, membrane; S, soluble; ND, non determined.

Scenedesmus acutus cultured in the presence of 1 ppm Cr(VI) forms aggregates; when the aggregates break up, biflagellated cells are released, allowing the cell to survive (Corradi et al., 1995a).

Analysis of metal pollution in a river, receiving waste from a paper mill, revealed that Cr reached toxic values of 20-80 ppm either at the point of discharge and 1 Km away (Sudhakar et al., 1991). Several algae showed tolerance to these Cr levels, which promoted enhanced populations, particularly of *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Scenedesmus* and *Pandorina* (Sudhakar et al., 1991). Epiphytic (organisms which live on plants) algae are considered to have a high affinity for atmospheric pollutants and the ability to accumulate heavy metals from the air. Cr and Pb contents were elevated in the epiphytic alga *Pleurococcus* sp in sites close to a motorway in England (Sims and Reynolds, 1999).

7.4. Chromium resistance in fungi

Chromium resistance has been described in filamentous fungi and yeasts, either by mutagenic induction of laboratory strains (Marzluf, 1970; Czako-Vér et al., 1999) or through the isolation of Cr-resistant organisms from Cr-contaminated environments (Baldi et al., 1990; Baldi and Pepi, 1991; Pepi and Baldi, 1992; Ramirez-Ramirez et al., 1998). In the filamentous fungus *Neurospora crassa*, chromate-resistant mutants induced by UV treatment were defective in sulfate transport

(Marzluf, 1970). In *Schizosaccharomyces pombe*, UV and nitrosoguanidine mutagenesis led to the isolation of chromate-sensitive and tolerant mutants (Czako-Vér et al., 1999). Growing cells of the sensitive mutant exhibited high accumulation of total Cr, whereas those of the resistant mutant showed a significantly lower accumulation of the metal, as compared to the wild-type strain. These observations suggested that chromate sensitivity and resistance were due to increased and reduced uptake of the metal, respectively (Czako-Vér et al., 1999). The analysis of chromate-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* showed the involvement of at least six loci in the maintenance of wild-type levels of resistance to chromate (Ono and Weng, 1982). One of these loci was identified as *LYS7* (Ono and Weng, 1982), which is the structural gene for homocitric dehydrase, an enzyme involved in lysine biosynthesis; however, the role of this enzyme in Cr detoxification is unknown.

Mutants of *S. cerevisiae* devoid of vacuolar structures or deficient in specific protein subunits of the vacuolar (V)-H(+) ATPase showed increased sensitivity to chromate and tellurite: such sensitivity was associated to an increased accumulation of Cr and Te (Gharieb and Gadd, 1998). The accumulation of both Cr and Te occurred mainly in the cytosol, whereas detoxification was influenced by the presence of a functionally-active vacuole (Gharieb and Gadd, 1998).

Scheibel et al. (1997) found that *S. cerevisiae* proteins have a significantly lower cysteine content compared to other eukaryotes. Previous observations linked a defect in sulfate uptake of *S. cerevisiae* to an increased resistance to the environmental pollutants chromate and selenate, ions that share the same permeases (Breton and Surdin-Kerjan, 1977; Smith et al., 1995; Lachance and Pang, 1997). It was proposed that this environmental problem caused *S. cerevisiae* to down-regulate its sulfate uptake system; this lowered available sulfur led to the replacement of dispensable sulfur amino acids in proteins (Scheibel et al., 1997).

Yeast strains isolated from Cr-contaminated environments include the genus *Candida* (Baldi et al., 1990; Baldi and Pepi, 1991; Pepi and Baldi, 1992; Ramírez-Ramírez et al., 1998) and to a minor extent other species, such as *Rhodospordium* (Pepi and Baldi, 1992). These yeasts have shown to be resistant to high concentrations (0.5-8.0 mM; 1,470-2,350 µg/ml) of chromate, as compared to the most common yeast species *S. cerevisiae*, which is sensitive to 0.05 mM chromate or lower (Baldi et al., 1990; Baldi and Pepi, 1991; Pepi and Baldi, 1992; Ramírez-Ramírez, 1998). In some species of *Candida* and *Rhodospordium*, the general mechanism of chromate resistance has been related to reduced uptake of the ion, rather than to biological reduction of Cr(VI) to Cr(III), since Cr accumulation

was much higher in chromate-sensitive yeasts *S. cerevisiae* and *Candida famata* (Baldi et al., 1990; Pepi and Baldi, 1992) (Fig. 5).

Strain RR1 of *Candida* sp. isolated from a leather tanning plant, was able to grow in the presence of 2 mM chromate. RR1 caused the disappearance of about 60% of the total Cr(VI) initially present in the medium after 14 h incubation (Ramírez-Ramírez et al., 1998) (Fig. 6A). Laboratory strains of the zygomycete fungus *Mucor rouxii* and the yeasts *Candida albicans*, *S. cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* were unable to grow in these conditions and showed no effect on the concentration of chromate in the medium (Ramírez-Ramírez et al., 1998). When *Candida* strain RR1 was cultured for longer periods with chromate, there was a further increase in the disappearance of this ion from the medium that correlated with the appearance of Cr(III) (Fig. 6A). These observations indicated that in strain RR1 exists a correlation between Cr(VI) reduction and Cr(VI) resistance.

7.5. Chromium resistance in plants

Natural resistance to heavy metals has been observed in liverworts growing in contaminated soils and in aquatic macrophytes growing in polluted waters (Samecka-Cymerman and Kempers, 1996; Samecka-Cymerman et al., 1997; Mallick et al., 1996; Shallari et al., 1998). From these studies, a correlation between contents of Cr in soil and the presence of

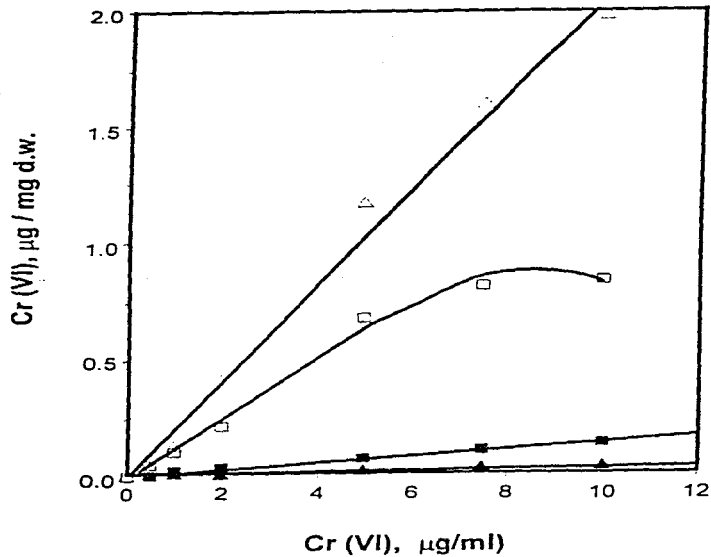


Figure 5.-Chromate uptake by yeasts. Cultures of *Rhodospiridium* sp. (▲), *Candida* sp. (■), *Candida famata* 6016 (□) and *Saccharomyces cerevisiae* (△) were grown in minimal medium with the indicated amounts of Cr(VI) for 18 h at 28°C with shaking. Chromate was measured by atomic absorption spectrophotometry. Adapted from Pepi and Baldi (1992) with permission.

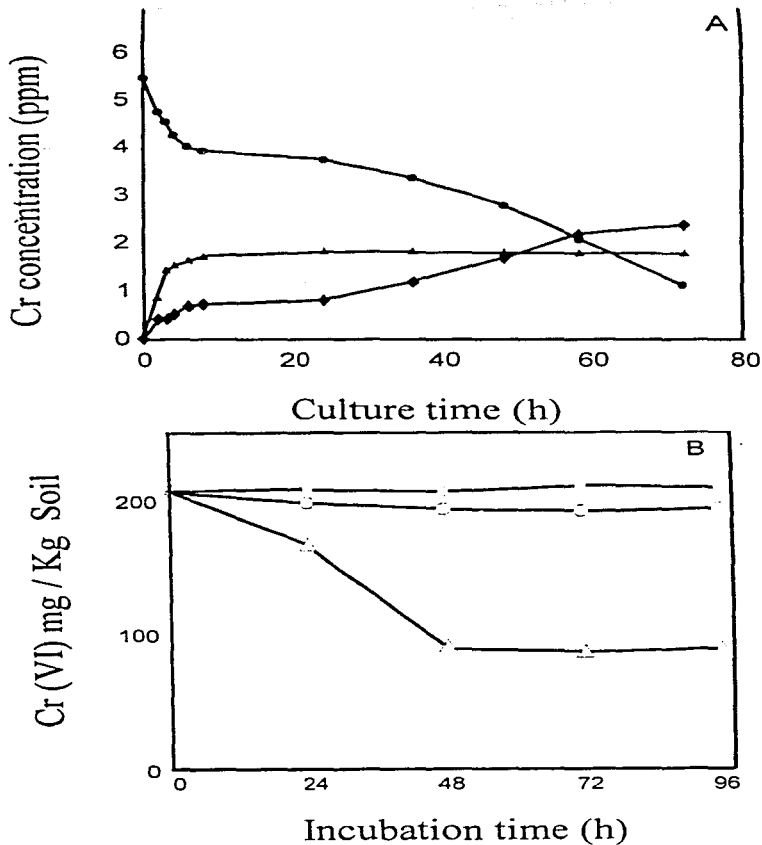


Figure 6.-Interactions of *Candida* cells with chromium. A, distribution of chromium during the growth of *Candida* sp. strain RR1. (●), Cr(VI) or (◆), Cr(III) remaining in the spent medium; (▲), total Cr in the biomass. B, decrease of Cr(VI) in Cr-contaminated soil inoculated with strain RR1. (○), non inoculated control; (△), inoculated soil; (□) inoculated soil with 2 mM sodium azide. Chromium was measured as described in Figure 4. Ramírez-Ramírez et al., unpublished results.

the macrophyte *Comocepalum conicum* has been established, suggesting that this plant may be useful in monitoring soil contamination by metals (Samecka-Cymerman et al., 1997). Shallari et al. (1998), collecting plants growing in serpentine soils, found that *Herniaria hirsuta* was a Cr high-accumulator, showing concentrations of 275 µg Cr/g DW. Also water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) has shown a high capacity to accumulate Cr: 6 mg/g DW have been detected in roots of this plant growing in 10 ppm Cr(VI) (Lytle et al., 1998).

Plants may also be able to reduce toxic Cr(VI) to Cr(III) as a Cr tolerance mechanism, a conversion that very likely occurs in roots. The reduction of CrO_4^{2-} to Cr^{3+} may be catalyzed by Fe(III)-reductase enzymes (Zayed et al., 1998).

The mechanisms of Cr resistance in plants have not been completely identified. The observation that members of the Brassicacea family are high Cr accumulators makes these plants suitable models for the analysis of Cr resistance mechanisms (Zayed et al. 1998). The sulfate transport system may be responsible for the high Cr uptake of these plants, but how they deal with oxidation stress is still unknown; a probable mechanism may be related to the storing of Cr in a subcellular compartment.

8. Bioremediation of chromium pollution

Increase of environmental

contamination lead to a progressive deterioration of environmental quality. This condition challenges our global society to find efficient processes of remediation to reverse the negative conditions that severely threaten human and environmental health (Bonaventura and Johnson, 1997). Bioremediation exploits the genetic diversity and metabolic versatility of microorganisms and plants for the transformation of contaminants into less harmful end-products, which are then integrated into natural biogeochemical cycles. Understanding the ecology, physiology and evolution of the potentially useful organisms is critical for the successful consideration and implementation of bioremediation (Liu and Suflita, 1993).

Chromium, with its great economic importance in industrial grounds, is a major metal pollutant of the environment (Pillichshammer et al., 1995). As already discussed, the environmental behavior of Cr is largely a function of its oxidation state: Cr(VI) compounds are highly toxic to a variety of terrestrial and aquatic organisms and are mobile in soil/water systems, much more so than Cr(III) compounds (Losi et al., 1994). Thus, among other possible Cr transformations, biological reduction of Cr(VI) to Cr(III) is a potentially useful mechanism to detoxify Cr pollution and to bioremediate contaminated areas (Wakatsuki, 1995). However, as Cr(III) is also harmful for several organisms, the reduction of Cr(VI)

together with Cr(III) compartmentation could be a useful strategy to control Cr dispersion. Subcellular compartmentation may probably be carried out more efficiently by plants.

Microorganisms are capable of actively and passively concentrating metals to levels substantially higher than those found in their immediate environment (Unz and Shuttleworth, 1996). The processes of active (energy-dependent) and passive (energy-independent) metal uptake have been described as bioaccumulation and biosorption, respectively (Blackwell et al., 1995). The utilization of microbial biomass for the removal of metals from industrial wastewaters and polluted waters has been already recognized (Al-Asheh and Duvnjak, 1995). The biomass has to satisfy the following requirements to be considered as a good adsorbent: (1) An efficient and rapid uptake and release of metals; (2) A low production cost of the biosorbent and the possibility of its reutilization; (3) An efficient, rapid, and cheap separation of the biosorbent from the solution; and (4) A high selectivity of metal adsorption and desorption. If these points are fulfilled, the utilization of the biomass would make the biosorption process more attractive compared to processes which use other types of adsorption (Al-Asheh and Duvnjak, 1995). Preliminary calculations suggest that biosorption may be economically competitive with ion exchange or chemical precipitation for treating some waste streams (Lovley and

Coates, 1997). It has also been suggested that stimulating the growth of native microorganisms with metal biosorptive ability may be a useful strategy for immobilizing metals in soils thus preventing contamination of underlying groundwater supplies. Furthermore, it is possible to envision that a barrier of microorganisms with biosorptive abilities could be established in subsurface environments in order to remove metals from groundwater flowing through the biobarrier (Lovley and Coates, 1997). Also, the chemical properties of microbial envelope components may be used to trap Cr^{3+} resulting from Cr(III) pollution or from extracellular Cr(VI) reduction.

8.1. Bioremediation with bacteria

The Cr(VI)-reducing ability found in some bacteria has raised the possibility of using these microorganisms as a biotechnological tool for remediation of chromate-polluted zones (Silver and Williams, 1984; Lovley, 1993; Ohtake and Silver, 1994; Wakatsuki, 1995). **Figure 7** shows the variety of Cr reduction systems present in bacteria. The main advantages of using bacterial Cr(VI) reduction are: 1) It does not require high energy input nor toxic chemical reagents; 2) The possibility of using native, non-pathogenic, and non-hazardous strains.

Several microbiological strategies to remove chromate involving Cr(VI) reduction have been described (Bopp, 1984; Komori et al., 1989; Komori et al.,

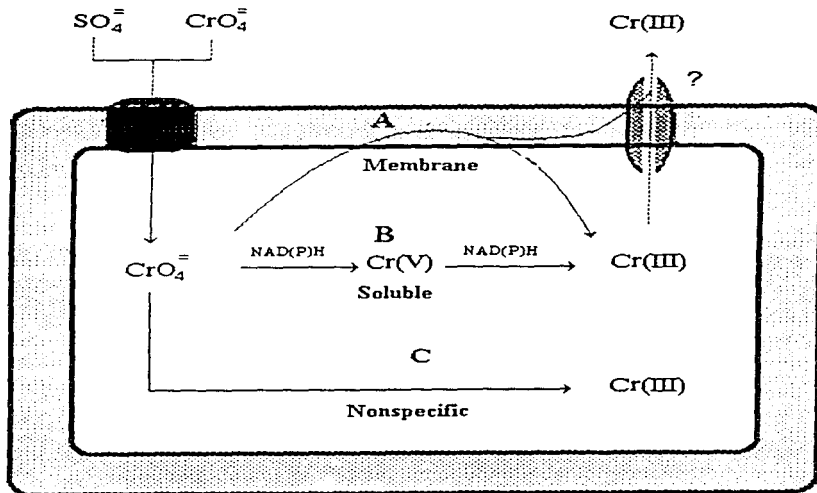


Figure 7.- Schematic summary of Cr(VI) reduction systems in bacteria. Chromate is transported into the cell by the sulfate transport system. A, reduction by membrane-associated components, may use Cr(VI) as an electron acceptor for respiration under anaerobic conditions; an efflux mechanism may function to extrude Cr(III). B, reduction by specific chromate reductases or by other reductases, usually found in the cytosol, coupled with NAD(P)H coenzymes. C, chromate reduction by nonspecific cytoplasmic components (e.g. H_2S , H_2 , H_2O_2 , FADH_2 , NAD(P)H , cytochrome P-450, glutathione, cysteine, etc.) that can function under both aerobic and anaerobic conditions.

1990; Ohtake et al., 1990a; Fujii et al., 1990; Fude et al., 1994; Lovley and Phillips, 1994; Ohtake and Silver, 1994; Campos et al., 1995; Shen and Wang, 1995). Bopp (1984) patented the use of *P. fluorescens* LB300 as a tool for the removal of chromate from wastewaters. Thereafter, other bacterial strains were proposed as biological tools for bioremediation of chromate wastes. For instance, *E. cloacae* HO1 was proposed as the basis of a process for reduction of Cr(VI) from chromate-polluted industry effluents (Komori et al., 1989; Komori et al., 1990; Ohtake et al., 1990a; Fujii et al., 1990; Ohtake and Silver, 1994). In such a system, two chambers were separated by anion-exchange membranes, with one chamber containing a chromate solution and the other an anaerobic suspension of the HO1 strain. The removal of 95% Cr from 2 mM Cr(VI) was reached within 50 h (Komori et al., 1989). This system also allows the insoluble form of reduced Cr(III) be removed by conventional separation technologies. A related system, consisting of an *E. cloacae* culture in a dialysis sac submerged in a chromate solution, was also successful. The dialysis sac allowed Cr(VI) to diffuse into the culture, where it was reduced anaerobically by the cells; the impermeable Cr(III) precipitate produced was then retained inside the sac (Komori et al., 1990). With this method it was possible to remove about 90% of total Cr (200 ppm) from contaminated water within 7 days. Fujii et al. (1990) proposed the

utilization of fed-batch cultures of HO1 strain, which enabled to reduce the Cr(VI) continuously added with a specific feeding rate of 25 mmol chromate/g dry cell/h. This process proved an effective biological method for detoxifying Cr(VI) in aqueous solutions (Fujii et al., 1990).

Bacillus sp. QC1-2 strain was also tested for its Cr(VI)-removal ability using the dialysis sac system (Campos et al., 1995). In addition, QC1-2 strain was able to reduce Cr(VI), in both aerobic and anaerobic conditions, in the presence of toxic chromate concentrations, and can use several substrates as sole carbon and energy sources. *Bacillus* sp. QC1-2 has the advantage that it is a non-pathogenic sporulated soil bacterium that can survive in unfavorable environmental conditions. Also, this strain can tolerate high concentrations of other heavy metals commonly found in wastewaters (Campos-García et al., 1997).

For its ability to utilize a wide range of aromatic pollutants for Cr(VI) reduction, the use of a co-culture of Cr(VI)-resistant *E. coli* ATCC 33456 and phenol-degrading *Pseudomonas putida* DMP-1 has been suggested as a potential tool for the simultaneous detoxification of Cr and aromatic contaminants (Shen and Wang, 1995).

A distinct type of bacterial interaction with Cr is extracellular precipitation. Since insoluble metallic complexes are usually less toxic than ionic forms, precipitation is considered a

detoxification mechanism (Unz and Shuttleworth, 1996). Precipitation of Cr has been reported in anaerobic *Clostridium* (Francis and Dodge, 1990) and by sulfate-reducing bacteria (Dvorak et al., 1992).

Bioremediation processes may first require detecting and measuring pollutant concentrations in the sites intended to decontaminate. Biosensors have been reported as good candidates for monitoring heavy metal pollution (Ramanathan et al., 1997). Biosensors utilize organisms, including bacteria, which possess biological components to provide selectivity for monitoring compounds of environmental concern. Engineering of bacterial heavy-metal resistance genes have resulted in the generation of biosensors for several toxic metals (Ramanathan et al., 1997). Peitzsch et al. (1998) reported a chromate sensor consisting of the transcriptional fusion of *chr* chromate-resistance genes and *lux* reporter genes. These fusions, expressed in *A. eutrophus*, responded to micromolar concentrations of chromate and dichromate ions but were 10 times less sensitive to Cr(III) compounds; no signal was observed with other oxyanions. The authors proposed that this biosensor may be used to monitor chromate levels in industrial sewage waters (Peitzsch et al., 1998).

8.2. Bioremediation with algae

The absence of biomagnification of Cr by different algae has been documented (De Filippis and Pallaghy, 1994).

Biomagnification is the process by which a substance enhances its concentration in higher trophic levels. Adsorption of Cr(III) by heat-dried biomass of the cyanobacterium *Phormidium laminosum* has been reported (Sampedro et al., 1995): the adsorption found was 66% with an initial dose of 25 ppm Cr. The biosorption of Cr required 45 min; in contrast, the biosorption of other metals (such as Fe, Pb, Cd) was completed in 15 min. Biosorption of all metals was enhanced at pH values of 6-7 in comparison to acidic pH (4-5) values, and was also enhanced by alkaline pre-treatment of the biomass (Sampedro et al., 1995). Binding of Cr(III) by microalgae was enhanced at lower pH values (from 3.5 to 5.5) than that of Cr(VI), which was favored at pH 2.0 or lower (Wilde and Benemann, 1993). These results demonstrate that optimal pH for bioremoval also depends on the oxidation state of Cr. Reduction of Cr(VI) to Cr(III) was increased from 25 to 55°C (Wilde and Benemann, 1993).

The filamentous alga *Cladophora* accumulated 169 ppm Cr ($\mu\text{g/g}$ dry weight), 159 ppm Pb, 119 ppm Cd, and 87 ppm Co after 6 h incubation with 0.2 ppm of each metal (Vymazal, 1990). Cr was the metal with the higher accumulation and the faster uptake rate (72% after 15 min). *Selenastrum* removed 39% of the Cr in solution from samples of a post-anaerobic digester in a tannery effluent (Brady et al., 1994). Cr(III) was effectively removed (83-99%) in laboratory tests by *Scenedesmus*.

Selenastrum and *Chlorella*, whereas Cr(VI) was removed in a surprisingly lower degree (18-22%) (Brady et al., 1994). The lower Cr removal from wastewater in comparison to artificial solutions may be due to competition with chelating compounds including organic matter. Using immobilized cells in columns with kappa-carrageenan (fluidized bed) or polyurethane foam (packed bed), *Chlorella vulgaris* removed 48 and 34% of Cr, respectively, whereas *Scenedesmus acutus* removed 36 and 31% (Travieso et al., 1999). Both microalgae also showed a significant removal of Zn (85 and 91%, respectively). Since the concentration of metals used was well above the level of industrial effluents, then a possible use of immobilized algae in wastewater treatment seems viable.

The removal of Cu, Ni, Al and Cr by the red alga *Cyanidium caldarium* from acidic mine wastes occurs by cell surface precipitation of metal-sulfide microcrystals (Wood and Wang, 1983). Thus, this alga may be a suitable organism for removal or recovery of metals from heavy metal-polluted wastewaters.

8.3. Bioremediation with fungi

Yeasts and filamentous fungi also offer a viable alternative for the bioremediation of waters and soils polluted by Cr. Many fungi contain chitin, the homopolymer of N-acetylglucosamine, and chitosan, a heteropolymer of N-acetylglucosamine and glucosamine, as an integral part of their cell wall structure. The

deacetylated amino groups of glucosamine may act as binding sites for metals (Pillichshammer et al., 1995). In addition, a new siderophore type, named rhizoferrin, which show increased Cr(III) biosorption, has been identified in Mucorales. Rhizoferrin is a polycarboxylate siderophore that is able to bind Fe(III), Cr(III), and Al(III). Trivalent Cr and Al should not be reduced under physiological conditions. These metals remain bound to the siderophore and may be accumulated by the cells in a further stage; for some microorganisms this can be a mechanism of resistance to toxic metals (Pillichshammer et al., 1995).

The biomasses of *Mucor mucedo* and *Rhizomucor michei*, after treatment with hydroxide to expose the chitin/chitosan cell wall components, were effective in the capture of metal ions. Chemically-treated mycelia efficiently bind Cr (Wales and Sagar, 1990). The biomasses obtained from *Rhizomucor arrhizu*, *Candida tropicalis* and *Penicillium chrysogenum* were excellent biosorbents for Cr (Volesky and Holan, 1995). *Aspergillus carbonarius* NRC401121 adsorbs Cr from solution and the amount of adsorbed metal per unit of biomass increased with a decrease in the biomass concentration (Al-Asheh and Duvnjak, 1995). *M. hiemalis* MP/92/3/4 was also able to accumulate substantial amounts of Cr. Cr(III) was enriched best at pH 5.5 and Cr(VI) at pH 1; the enrichment of Cr(III) by *M. hiemalis* seemed to be mainly a passive

biosorption to the cell wall, whereas for the uptake of Cr(VI) intracellular accumulation as well as biosorption are possible (Pillichshammer et al., 1995). Cells from *S. cerevisiae* and *Candida utilis* have the ability to sorb Cr(VI) and the sorption capacity of dehydrated cells is considerably higher than that of the intact cells (Rapoport and Muter, 1995).

Recent novel strategies for improving the biosorption process include the use of pulsed electrical fields; the engineering of a spiral bioreactor that requires less volume than suspended cell systems and has a better binding capacity than reactors employing entrapped cells; various physical and chemical treatments of the biomass; the use of flotation systems to enhance the subsequent collection of the biomass and sorbed metal; and growing the biomass in the form of microbial mats (Lovley and Coates, 1997).

A strategy for enhancing the applicability of biosorption over alternative metal removal techniques is the employment of organisms resistant to high concentrations of the metal. Several studies have reported the isolation of Cr(VI)-resistant fungal strains, either from laboratory strains (Marzluf, 1970; Czakó-Vér et al., 1999) or from Cr-contaminated environments (Baldi et al., 1990; Baldi and Pepi, 1991; Pepi and Baldi, 1992; Paknikar and Bhide, 1993; Ramírez-Ramírez et al., 1998). Although in most cases Cr accumulation in the Cr(VI)-resistant strains was lower than in Cr(VI)-sensitive strains,

the biosorption and bioaccumulation processes were similar. In one case it was observed that non growing cells of Cr(VI)-resistant and -sensitive mutants exhibited nearly the same Cr uptake ability (Czakó-Vér et al., 1999). In the context of bioremediation, the biosorption ability of Cr(VI)-resistant mutants could be combined with their ability to reduce chromate. Cr(VI)-resistant strains of *Aspergillus* spp (Paknikar and Bhide, 1993) and *Candida* spp (Ramírez-Ramírez et al., 1998), isolated from Cr-polluted environments, have shown Cr(VI)-reducing activity. The latter strain caused a decrease in Cr(VI) from the culture medium which was accompanied by the appearance of Cr(III) (Fig. 6A). This *Candida* spp strain also decreased in 40% the amount of Cr(VI) when incubated in Cr-contaminated soil (Fig. 6B; Ramírez-Ramírez et al., unpublished results). This observation suggests that Cr-resistant fungi with Cr(VI)-reducing activity have a good potential for bioremediation of Cr-polluted soils.

8.4. Bioremediation with plants

Although the use of plants to remediate contaminated soils (phytoremediation) is in its initial stages of research and development, it is becoming a promising possibility for cleaning and detoxification of heavy-metal polluted areas. This technology is based on the ability of the plant to absorb, sequester, and/or transform a contaminant

(Cunningham and Ow, 1996). The possibility of cleaning heavy-metal contaminated waters or soils by using plants may be of greater advantage than by the use of microorganisms. Plants, because of their size, can be easily managed, their distribution can be controlled, and they can be processed for recovering valuable metals.

In marked contrast to cadmium and mercury, in which several strategies have been successfully applied to generate plants able to accumulate or transform these contaminants (Cunningham and Ow, 1996), there are only a few reports on Cr phytoremediation. Recent works provide evidence that some members of the Brassicacea family (Kumar et al., 1995; Zayed et al., 1998), as well as water hyacinth (Lytle et al., 1998), could be high Cr accumulators. Although these plants do not fulfill the hyperaccumulator criteria, since they do not accumulate higher levels of Cr in their shoots, they seem currently the best option available as Cr phytoremediators. The reduction of Cr(VI) to Cr(III) by these plants (Zayed et al., 1998) will obviously not terminate the problem of Cr contamination, since Cr(III) is also detrimental for plant growth; however, their use will produce a less harmful and more manageable compound.

9. Concluding remarks

Bacterial interactions with Cr have been widely studied, in some cases with great detail. Plasmid-encoded chromate

resistance genes have been cloned and sequenced. The mechanism of tolerance conferred by the ChrA protein is based in an efflux of chromate ions. *chrA* gene homologs have been described for other bacterial species, including Archaeae, suggesting that a chromate extrusion mechanism is widespread in microbes. In addition, several bacterial Cr(VI)-reduction systems have been studied to different levels. Several chromate reductases were purified and further analyzed but their physiological role is still unknown. Also, no genes for bacterial Cr(VI) reductases have been reported despite continuous efforts in that direction. Notwithstanding, Cr(VI) reduction by bacteria has been largely postulated as a good candidate to be used as a biotechnological tool for bioremediation of chromate pollution.

The knowledge regarding the mechanisms of Cr(VI) uptake and resistance in algae and fungi is relatively scarce. Most of the reports link chromate resistance to differences in uptake or accumulation of the ion. Only a few studies describe Cr(VI)-reducing activities in fungi (but not in algae yet) and the possible relationship of this process with chromate resistance. There is also a limited amount of molecular studies regarding genes involved in Cr detoxification in fungi and no counterpart analyses have been conducted in algae. However, algal and fungal biomasses have proven useful in biosorption studies for the recovery of Cr from contaminated sources. This property,

and the ability of some species of fungi to reduce Cr(VI), indicate that these microorganisms also have potential applications in the bioremediation of polluted environments. Further studies with these organisms will open new perspectives for understanding Cr resistance mechanisms.

In the case of plants, little is known with respect to the interactions with Cr, including plant tolerance mechanisms. The transport of Cr has not been addressed in plants and only a limited number of reports concerning the use of plants for Cr phytoremediation processes have been published. A deeper understanding of plant metabolic pathways involved in Cr uptake, Cr reduction and accumulation, together with the use of molecular genetics approaches, will allow to generate plant phenotypes able to be used in the remediation of Cr pollution.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge support from CONACYT (México) to CC (31402N), JCG (CAMGJ-32884), SD (26105N) and HLT (25199N); from CIC-UMSNH to CC and JCG; from PAEP-UNAM to SD (002323) and HLT (IN205697); from Universidad de Guanajuato and CONCYTEG to FGC and JCTG.

References

Abd-El-Monem, M., Corradi, M.G. and Gorbi, G. (1998) Toxicity of copper and zinc to two

- strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.* 40, 59-66.
- Aislabie, J. and Loutit, M.W. (1986) Accumulation of Cr(III) by bacteria isolated from polluted sediments. *Mar. Environ. Res.* 20, 221-225.
- Al-Asheh, S., and Duvnjak, Z. (1995) Adsorption of copper and chromium by *Aspergillus carbonarius*. *Biotechnol. Prog.* 11, 638-42.
- Alcedo, J. and Wetterhahn, K.E. (1990) Chromium toxicity and carcinogenesis. *Int. Rev. Exp. Path.* 31, 85-107.
- Alexander, J. and Aashet, J. (1995) Uptake of chromate in human red blood cells and isolated rat liver cells: the role of the anion carrier. *Analyst* 120, 931-933.
- Alvarez, A.H., Moreno-Sánchez, R. and Cervantes, C. (1999) Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 7398-7400.
- Aiyar, J., Berkovits, H.J., Floyd, R.A. and Wetterhahn, K.E. (1991) Reaction of chromium(VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: Identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ. Health Perspect.* 92, 53-62.
- Arluskas, A., Baker, R.S., Bonin, A.M., Tandon, R.K., Crisp, P.T. and Ellis, J. (1985) Mutagenicity of metal ions in bacteria. *Environ. Res.* 36, 376-388.
- Armienta-Hernández, M.A. and Rodríguez-Castillo, R. (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of Leon, México. *Environ. Health Perspect.* 103, 47-51.
- Arslan, P., Beltrame, M. and Tomasi, A. (1987) Intracellular chromium reduction. *Biochem. Biophys. Acta* 931, 10-15.
- Babich, H., Schifflbauer, M. and Stotzky, G. (1982) Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to fungi. *Bull. Environ. Toxicol.* 28, 452-459.
- Baldi, F. and Pepi, M. (1991) Study of metal and non-metal resistances in chromate-resistant yeasts isolated from industrial wastes. In: *Proc. Int. Symp. on Environmental Biotechnology* (Verachtert, H. and Verstraete, W., Eds.), Vol.1, pp. 255-258. Ostend, Belgium.
- Baldi, F., Vaughan, A.M. and Olson, G.J. (1990)

- Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 913-918.
- Bassi, M. and Donini, A. (1984) Phallotoxin visualization of F-actin in normal and chromium-poisoned *Euglena* cells. *Cell Biol. Int. Reports* 8, 867-871.
- Blackwell, K. J., Singleton, I., and Tobin, J. M. (1995) Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 579-584.
- Bonaventura, C. and Johnson, F. M. (1997) Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environ. Health Perspect.* 105, Suppl. 1, 5-20.
- Bopp, L.H. (1984) Microbial removal of chromate from contaminated waste water. U.S. Patent 4,468,461.
- Bopp, L.H., Chakrabarty, A.M. and Ehrlich, H.L. (1983) Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155, 1105-1109.
- Bopp, L.H. and Ehrlich, H.L. (1988) Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* LB300. *Arch. Microbiol.* 150, 426-431.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981) Ion transport in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 650, 88-127.
- Bradley, M. T. and Obratsova, A. Y. (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptor. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 193-198.
- Brady, D., Letebele, B., Duncan, J.R. and Rose, P.D. (1994) Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae. *Water SA* 20, 213-218.
- Breton, A. and Surdin-Kerjan, Y. (1977) Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *J. Bacteriol.* 132, 224-232.
- Bridgewater, L.C., Manning, F.C., Woo, E.S. and Patierno, S.R. (1994) DNA polymerase arrest by aducted trivalent chromium. *Mol. Carcinog.* 9, 122-133.
- Brochiero, E., Bonaly, J. and Mestre, J.C. (1984) Toxic action of hexavalent chromium on *Euglena gracilis* strain Z grown under heterotrophic conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 603-608.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., Fitzgerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.-F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghegan, N.S.M., Weidman, J.F., Fuhmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Roberts, K.M., Hurst, M.A., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H.-P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. and Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- Campos, J., Martinez-Pacheco, M. and Cervantes, C. (1995) Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 203-208.
- Campos-Garcia, J., Martinez-Cadena, G., Alvarez-Gonzalez, R. and Cervantes, C. (1997) Purification and partial characterization of a chromate reductase from *Bacillus*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 39, 73-81.
- Cary, E.E. (1982) Chromium in air, soil and natural waters. In: *Biological and Environmental Aspects of Chromium* (Langard, S., Ed.), pp. 48-64. Elsevier, Amsterdam.
- Cervantes, C. and Ohtake, H. (1988) Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 173-176.
- Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. and Silver, S. (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pJM505. *J. Bacteriol.* 172, 287-291.
- Cervantes, C. and Silver, S. (1992) Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27, 65-71.
- Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, N.A., de la Mora, P. and Velasco, J.A. (1986) Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48, 159-163.
- Chaney, S.G. (1986) Micronutrients: chromium. In: *Biochemistry* (Devlin, T.M., Ed.), pp. 987-988. Wiley Medical.
- Chen, C.-M., Misra, T.K., Silver, S. and Rosen,

- B.P. (1986) Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261, 15030-15038.
- Cheng, L., Liu, S. and Dixon, K. (1998) Analysis of repair and mutagenesis of chromium-induced DNA damage in yeast, mammalian cells, and transgenic mice. *Environ. Health Perspect.* 106, 1027-1032.
- Clark, D.P. (1994) Chromate reductase activity of *Enterobacter aerogenes* is induced by nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 233-237.
- Corradi, M.G. and Gorbi, G. (1993) Chromium toxicity on two linked trophic levels. II Morphophysiological effects on *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 72-78.
- Corradi, M.G., Gorbi, G., and Bassi, M. (1995a) Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater algae *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 106-110.
- Corradi, M.G., Gorbi, G., Ricci, A., Torelli, A. and Bassi, A.M. (1995b) Chromium-induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 32, 12-18.
- Costa, M. (1991) DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 92, 45-52.
- Costa, M. (1997) Toxicity and carcinogenesis of Cr(VI) in animal models and humans. *Crit. Rev. Toxicol.* 27, 431-442.
- Cunningham, S.D. and Ow, D. (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715-719.
- Czakó-Vér, K., Batié, M., Raspor, P., Sipiecki, M. and Pesti, M. (1999) Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 109-115.
- Das, S. and Chandra, A.L. (1990) Chromate reduction in *Streptomyces*. *Experientia* 46, 731-733.
- De Filippis, L.F. and Pallaghy, C.K. (1994) Heavy metals: sources and biological effects. In: *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution* (Rai, L.C., Gaur, J.P. and Soeder, C. J., Eds.), pp. 31-77. E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart.
- De Vicente, A., Avilés, M., Codina, J.C., Borrego, J.J. and Romero, P. (1990) Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 625-632.
- Dhakephalkar, P.K., Bhide, J.V. and Paknikar, K.M. (1996) Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MICMB-180. *Biotechnol. Lett.* 18, 1119-1122.
- Dreyfuss, J. (1964) Characterization of a sulfate and thiosulfate transporting system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 239, 2292-2297.
- Dvorak, D.H., Hedin, R.S., Edeborn, H.M. and McIntire, P.E. (1992) Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction. Results from pilot-scale reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 609-616.
- Efstathiou, J.D. and McKay, L.L. (1977) Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130, 257-265.
- Enterline, P.E. (1974) Respiratory cancer among chromate workers. *J. Occup. Med.* 16, 523-526.
- Fasulo, M.P., Bassi, M. and Donini, A. (1983) Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and ultrastructural studies. *Protoplasma* 114, 35-43.
- Flemming, C.A., Ferris, F.G., Beveridge, T.J. and Bailey, G.W. (1990) Remobilization of toxic heavy metals adsorbed to bacterial cell wall-clay composites. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3191-3203.
- Francis, A.J. and Dodge, C.J. (1990) Anaerobic microbial remobilization of toxic metals coprecipitated with iron oxide. *Environ. Sci. Technol.* 24, 373-378.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.-F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fujii, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O. and Venter, J.C. (1997)

- Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586.
- Frey, B.E., Riedl, G. F., Bass, A.E. and Small, L.F. (1983) Sensitivity of estuarine phytoplankton to hexavalent chromium. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 17, 181-187.
- Fude, L., Harris, B., Urrutia, M.M. and Beveridge, T. J. (1994) Reduction of Cr(VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1525-1531.
- Fujii, E., Toda, K. and Ohtake, H. (1990) Bacterial reduction of toxic hexavalent chromium using a fed-batch culture of *Enterobacter cloacae* strain HO1. *J. Ferm. Bioeng.* 69, 365-367.
- Galli, A., Boccardo, P., Del Carratore, R., Cundari, E. and Bronzetti, G. (1985) Conditions that influence the genetic activity of potassium dichromate and chromium chloride in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 144, 165-169.
- Geesey, G.G. and Jang, L. (1989) Interactions between metal ions and capsular polymers. In: *Metal Ions and Bacteria* (Beveridge, T.J. and Doyle, R.J., Eds.), pp. 325-357. Wiley, New York.
- Gharieb, M.M. and Gadd G.M. (1998) Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. *BioMetals* 11, 101-106.
- Gorbi, G., Corradi, M.G., Torelli, A. and Bassi, M. (1996) Comparison between a normal and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* as a source food to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 109-111.
- Gvozdyak, P.I., Mogilevich, N.F., Rylskii, A.F. and Grishchenko, N.I. (1986) Reduction of hexavalent chromium by collection strains of bacteria. *Mikrobiologiya* 55, 962-965.
- Hauschild, M.Z. (1993) Putrescine (1,4-diaminobutane) as an indicator of pollution-induced stress in higher plants: barley and rape stressed with Cr(III) or Cr(VI). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26, 228-247.
- Henderson, G. (1989) A comparison of the effects of chromate, molybdate and cadmium oxide on respiration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Metals* 2, 83-88.
- Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S. and Kawai, K. (1987) Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2417-2420.
- Hryniewicz, M., Sirko, A., Palucha, A., Böck, A. and Hulanicka, D. (1990) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* 172, 3358-3366.
- Huffman, E.W.D. Jr. and Allaway, W.H. (1973) Chromium in plants: distribution in tissues, organelles and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agric. Food Chem.* 21, 982-986.
- Ishibashi, Y., Cervantes, C. and Silver, S. (1990) Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2268-2270.
- Itoh, M., Nakamura, M., Suzuki, T., Kawai, K., Horitsu, H. and Takamizawa, K. (1995) Mechanism of chromium(VI) toxicity in *Escherichia coli*: is hydrogen peroxide essential in Cr(VI) toxicity? *J. Biochem.* 117, 780-786.
- Kadiiska, M.B., Xiang, Q.H. and Mason, R.P. (1994) In vivo free radical generation by chromium (VI): An electron resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 800-805.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirotsawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
- Karbonowska, H., Wiaterska, A. and Hulanicka, D. (1977) Sulphate permease of *Escherichia coli* K12. *Acta Biochim. Pol.* 24, 329-334.
- Katz, S.A. and Salem, H. (1993) The toxicology of chromium with respect to its chemical

- speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13, 217-224.
- Kawanishi, S., Inoue, S., and Sano, S. (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261, 5952-5958.
- Kharab, P. and Singh, I. (1985) Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat. Res.* 155, 117-20
- Kharab, P. and Singh I. (1987) Induction of respiratory deficiency in yeast by salts of chromium, arsenic, cobalt and lead. *Indian J. Exp. Biol.* 25, 141-142.
- Khasim, D.I., Kumar, N.V. and Hussain, R.C. (1989) Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 742-746.
- Kleiman, I.D. and Cogliatti, D.H. (1998) Chromium removal from aqueous solutions by different plant species. *Environ. Tech.* 19, 1127-1132.
- Komori, K., Rivas, A., Toda, K. and Ohtake, H. (1990) A method for removal of toxic chromium using dialysis-sac cultures of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 117-119.
- Komori, K., Wang, P., Rivas, A., Toda, K. and Ohtake, H. (1989) Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 951-954.
- Kortenkamp, A., O'Brien, P. and Beyersmann, D. (1991) The reduction of chromate is a prerequisite of chromium binding to cell nuclei. *Carcinogenesis* 12, 1143-1144.
- Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H. and Raskin, I. (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232-1238.
- Kuroda, M., Dey, S., Sanders, O.I. and Rosen, B.P. (1997) Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the ArsA anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 326-331.
- Kvasnikov, E.I., Stepanyuk, V.V., Klushnikova, T.M., Serpokrylov, N.S., Simonova, G.A., Kasatkina, T.P. and Panchenko, L.P. (1985) A new chromium-reducing gram variable bacterium with mixed type of flagellation. *Mikrobiologiya* 54, 83-88.
- Lachance, M.-A. and Pang, W.-M. (1997). Predacious yeasts. *Yeast* 13, 225-232.
- Langard, S. (1990) One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports. *Am. J. Ind. Med.* 17, 189-215.
- Langerwerf, J.S., Bakkeren, H.A. and Jongen, W.M. (1985) A comparison of the mutagenicity of soluble trivalent chromium compounds with that of potassium chromate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9, 92-100
- Lasheen, M.R., Shiehata, S.A. and Ali, G.H. (1990) Effect of cadmium, copper and chromium (VI) on the growth of the Nile (Egypt) water algae. *Water Air Soil Pollut.* 50, 19-30.
- LaVelle, J.M. (1986) Potassium chromate potentiates frameshift mutagenesis in *E. coli* and *S. typhimurium*. *Mutat. Res.* 171, 1-10.
- Lbik-Nowak, A. and Gabara, B. (1997) Effect of calcium on RNA content in meristematic cells of pea (*Pisum sativum* L.) roots treated with toxic metals. *Folia Histochem. Cytobiol.* 35, 231-235.
- Lebedeva, E.V. and Lyalikova, N.N. (1979) Reduction of crocoite by *Pseudomonas chromatophila*. Sp. nov. *Mikrobiologiya* 48, 517-522.
- Leonard, A. and Lauwerys, R.R. (1980) Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat. Res.* 76, 227-239.
- Levis, A.G. and Bianchi, V. (1982) Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. In: *Biological and Environmental Aspects of Chromium* (Langard, S., Ed.), pp.171-208 Elsevier, Amsterdam.
- Liu, K.J., Jiang, J., Shi, X., Gabrys, H., Walezak, T. and Swartz, M. (1995) Low-frequency EPR study of chromium (VI) formation from chromium (VI) in living plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 829-834.
- Liu, S. and Sufita, J. M. (1993) Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 11, 344-352.
- Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M.D. and Congregado, F. (1993) Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium*

- radiobacter* EPS-916. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3516-3518.
- Losi, M. E., Amrhein, C. and Frankenberger, W. T. Jr. (1994) Environmental biochemistry of chromium. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 136, 91-121.
- Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction. Annu. Rev. Microbiol. 47, 263-290.
- Lovley, D. R. and Coates, J. D. (1997) Bioremediation of metal contamination. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 285-289.
- Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1994) Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. Appl. Environ. Microbiol. 60, 726-728.
- Lovley, D.R., Widman, P.K., Woodward, J.C. and Phillips, J.P. (1993) Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3572-3576.
- Luli, G.W., Talnagi, J.W., Strohl, W.R. and Pfister, R.M. (1983) Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. Appl. Environ. Microbiol. 46, 846-854.
- Luo, H., Lu, Y., Shi, X., Mao, Y. and Delal, N.S. (1996) Chromium (IV)-mediated Fenton-like reaction causes DNA damage: Implication to genotoxicity of chromate. Ann. Clin. Lab. Sci. 26, 185-191.
- Lytle, C.M., Lytle, F.W., Yang, N., Qian, J.H., Hansen, D., Zayed, A. and Terry, N. (1998) Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. Environ. Sci. Technol. 32, 3087-3093.
- Mallick, N., Shardendu, P. and Rai, L.C. (1996) Removal of heavy metals by two free floating aquatic macrophytes. Biomed. Environ. Sci. 9, 399-407.
- Marzluf, G.A. (1970) Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. J. Bacteriol. 102, 716-721.
- McGrath, S.P. and Smith, S. (1990) Chromium and nickel. In: Heavy Metals in Soils (Alloway, B.J., Ed.), pp. 125-150. Wiley, New York.
- McLean, R.J.C. Beauchemin, D., Claphan, L. and Beveridge, T.J. (1990) Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3671-3677.
- Mertz, W. (1969) Chromium occurrence and function in biological systems. Physiol. Rev. 49, 163-239.
- Mertz, W. (1982) Introduction. In: Biological and Environmental Aspects of Chromium. (Langard, S., Ed.), pp. 1-4. Elsevier, Amsterdam.
- Miller, C.A., Cohen, M.D., Kargacin, B., Klein, C.B. and Costa, M. (1991) Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diammine-dichloroplatinum (II) and chromium compounds. Carcinogenesis 12, 269-276.
- Minissi, S., Caccese, D., Passafiume, F., Grella, A., Eleonora, C. and Rissoni, M. (1998) Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. Mutat. Res. 420, 77-84.
- Mishra, S., Singh, V., Srivastava, S., Srivastava, R., Srivastava, M.M., Dass, S., Satsangi, G.P. and Prakash, S. (1995) Studies on uptake of trivalent and hexavalent chromium by maize (*Zea mays*). Food Chem. Toxicol. 33, 395-397.
- Morris, B., Gray, T. and MacNeil, S. (1995) Evidence for chromium acting as an essential trace element in insulin-dependent glucose uptake in cultured mouse myotubes. J. Endocrinology 144, 135-141.
- Nicholson, M.L. and Laudenbach, D.E. (1995) Genes encoded on a cyanobacterial plasmid are transcriptionally regulated by sulfur availability and CysR. J. Bacteriol. 177, 2143-2150.
- Nies, A., Nies, D.H. and Silver, S. (1989) Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 171, 5065-5070.
- Nies, A., Nies, D.H. and Silver, S. (1990) Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. 265, 5648-5653.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. and Saier, M.H. Jr. (1998) CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-

- driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180, 5799-5802.
- Nikaido, H. and Saier, M.H. Jr. (1992) Transport proteins in bacteria: Common themes in their design. *Science* 258, 936-941.
- Nishio, A. and Uyeke, E.M. (1985) Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* 15, 237-244.
- Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.* 31, 185-189.
- Offenbacher, E. and Pi-Sunyer, N. (1988) Chromium in human nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 8, 543-563.
- Ohta, N., Galsworthy, P.R. and Pardee, A.B. (1971) Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 105, 1053-1062.
- Ohtake, H., Cervantes, C. and Silver, S. (1987) Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169, 3853-3856.
- Ohtake, H., Fujii, E. and Toda, K. (1990a) Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environ. Technol. Lett.* 11, 663-668.
- Ohtake, H., Fujii, E. and Toda, K. (1990b) Bacterial reduction of hexavalent chromium: Kinetic aspects of chromate reduction by *Enterobacter cloacae* HO1. *Biocatalysis* 4, 227-235.
- Ohtake, H., Komori, K., Cervantes, C. and Toda, K. (1990c) Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 85-88.
- Ohtake, H. and Silver, S. (1994) Bacterial detoxification of toxic chromate. In: *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals* (Chaudry, G. R., Ed.), pp. 403-415. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Ono, B. and Weng, M. (1982) Chromium sensitive mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 5, 215-220.
- Paknikar, K.M. and Bhide, J.V. (1993) Aerobic reduction and biosorption of chromium by a chromate resistant *Aspergillus* sp. In: *Biohydrometallurgical Technologies* (Torma, A.E., Apel, M.L. and Brierley, C.L., Eds.), pp. 237-244. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, PA.
- Papp, J.F. (1985) Chromium. In: *Mineral Facts and Problems. Bureau of Mines bulletin 675* (Knorr, A.W., Ed.), pp. 139-155. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Pardee, A.B., Prestidge, L.S., Whipple, M.B. and Dreyfuss, J. (1966) A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 241, 3962-3969.
- Peitzsch, N., Eberz, G. and Nies, D.H. (1998) *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 453-458.
- Pepi, M. and Baldi, F. (1992) Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes. *BioMetals* 5, 179-185.
- Peterson, S.M. and Stauber, J.L. (1996) New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 750-757.
- Petrilli, F.L. and De Flora, S. (1977) Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 805-809.
- Pillichshammer, M., Pumpel, T., Pöder, R., Eller, K., Klima, J., and Schinner, F. (1995) Biosorption of chromium to fungi. *BioMetals* 8, 117-121.
- Presecan, E., Moszer, I., Boursier, L., Cruz-Ramos, H., de la Fuente, V., Hullo, M.-F., Lelong, C., Schleich, S., Sekowska, A., Song, B.H., Villani, G., Kunst, F., Danchin, A. and Glaser, P. (1997) The *Bacillus subtilis* genome from gerBC(311a) to licR(334a). *Microbiology* 143, 3313-3328.
- Rai, L.C., Dubey, S.K. and Mallick, N. (1992) Influence of chromium on some physiological variables of *Anabaena doliolum*: interaction with metabolic inhibitors. *BioMetals* 5, 13-16.
- Ramachandran, V., D'Souza, R.J. and Mistry, K.B. (1980) Uptake and reduction of chromium in plants. *J. Nuclear Agric. Biol.* 9, 126-128.
- Ramana, V.V. and Sastry, K.S. (1994) Chromium toxicity in *Neurospora crassa*. *J. Inorg. Biochem.* 56, 87-95.
- Ramanathan, S., Ensor, M. and Daunert, S. (1997) Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends Biotechnol.* 15, 501-506.

- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C. and Gutiérrez-Corona, J.F. (1998) Chromate resistance and reduction in a yeast strain isolated from industrial waste discharges. In: Proc. Int. Symp. Environ. Engin. Health Sci. (Raynal, J.A., Ed.), p. 14. Cholula, Pue. Mexico.
- Rank, J. and Nielsen, M.H. (1998) Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.* 418, 113-119.
- Rapoport, A. I., and Muter, O. A. (1995) Biosorption of hexavalent chromium by yeast. *Process Biochem.* 30, 145-149.
- Romanenko, V.I. and Koren'kov, V.W. (1977) A pure culture of bacteria utilizing chromates and dichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46, 414-417.
- Samecka-Cymerman, A. and Kempers, A.J. (1996) Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wrocław, Poland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 242-247.
- Samecka-Cymerman, A., Marczonek, A. and Kempers, A.J. (1997) Bioindication of heavy metals in soil by liverworts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 162-171.
- Sampedro, M.A., Blanco, A., Llana, M. J. and Serra, J.L. (1995) Sorption of heavy metals to *Phormidium laminosum* biomass. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22, 355-366.
- Scheibel, T., Bell, S. and Walke, S. (1997) *S. cerevisiae* and sulfur: a unique way to deal with the environment. *FASEB J.* 11, 917-921.
- Schroll, H. (1978) Determination of the absorption of Cr⁶⁺ and Cr³⁺ in an algal culture of *Chlorella pyrenoidosa* using ⁵¹Cr. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 271-274.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A. and Morel, J.L. (1998) Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ.* 209, 133-142.
- Sharma, D.C. and Sharma, C.P. (1996) Chromium uptake and toxicity effects on growth and metabolic activities in wheat, *Triticum aestivum* L. cv. UP2003. *Indian J. Exp. Biol.* 34, 689-691.
- Shen, H. and Wang, Y. (1993) Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC33456. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3771-3777.
- Shen, H. and Wang, Y. (1995) Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2754-2758.
- Shewry, P.R. and Peterson, P.J. (1974) The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 25, 785-797.
- Shewry, P.R. and Peterson, P.J. (1976) Distribution of chromium and nickel in plants and soil from serpentine and other sites. *J. Ecol.* 64, 195-212.
- Shi, X. and Dalal, N.S. (1990a) On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (VI) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 342-350.
- Shi, X.L. and Dalal, N.S. (1990b) NADPH-dependent flavoenzymes catalyze one electron reduction of metal ions and molecular oxygen and generate hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* 276, 189-191.
- Shimada, K. and Matsushima, K. (1983) Isolation of potassium chromate-resistant bacterium and reduction of hexavalent chromium by the bacterium. *Bull. Fac. Agric. Mie Univ.* 67, 101-106.
- Silver, S. and Williams, J.W. (1984) Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 531-537.
- Sims, I.R. and Reynolds, P.J. (1999) Effects of atmospheric pollution on a lichenophagous lepidopteran. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 30-34.
- Sirko, A., Hryniewicz, M., Hulanicka, D. and Böck, A. (1990) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Nucleotide sequence and expression of the *cytWAA1* gene cluster. *J. Bacteriol.* 172, 3351-3357.
- Skeffington, R.A., Shewry, P.R. and Peterson, P.J. (1976) Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 132, 209-214.
- Smith, F.W., Hawkesford, M.J., Prosser, I.M. and Clarkson, D.T. (1995) Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulfate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.*

- 247, 709-715.
- Snow, E.T. (1991) A possible role of chromium(III) in genotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 92, 75-81.
- Snow, E.T. (1994) Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environ. Health Perspect.* 3, 41-44.
- Snyder, S.L., Walker, R.L., MacVittie, T.J. and Sheil, J.M. (1978) Biologic properties of bacterial lipopolysaccharides treated with chromium chloride. *Canad. J. Microbiol.* 24, 495-501.
- Srivastava, S., Nigam, R., Prakash, S. and Srivastava, M.M. (1999) Mobilization of trivalent chromium in presence of organic acids: a hydroponic study of wheat plant (*Triticum vulgare*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 524-530.
- Srivastava, S., Shanker, K., Srivastava, S., Shirvastav, R., Das, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M. (1998) Effect of selenium supplementation on the uptake and translocation of chromium by spinach (*Spinacea oleracea*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 750-758.
- Stern, R.M. (1982) Chromium compounds: Production and occupational exposure. In: *Biological and Environmental Aspects of Chromium* (Langard, S., Ed.), pp. 5-47. Elsevier, Amsterdam.
- Sudhakar, G., Jyothi, B. and Venkateswarlu, V. (1991) Metal pollution and its impact on algae in flowing waters in India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 556-566.
- Summers, A.O. and Jacoby, G.A. (1978) Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13, 637-640.
- Summers, A.O. and Silver, S. (1978) Microbial transformations of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 637-672.
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y. and Okazaki, M. (1992) NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174, 5340-5345.
- Teissedre, P.L., Cabrera C., Cabanis, M.T. and Cabanis, J.C. (1996) Wine contribution to chromium and nickel dietary intake and their biodisponibilities. In: *Metal Ions in Biology and Medicine* (Collery, P., Corbello, J., Domingo, J.L., Etienne, J.C. and Loblet, J.M., Eds.), Vol. 4, pp. 172-174. John Libbey Eurotext, Paris.
- Travieso, L., Cañizarez, R.O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A.R., Dupeyron, R. and Valiente, V. (1999) Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 144-151.
- Unz, R. F. and Shuttlesworth, K. L. (1996) Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Curr. Opinion Biotechnol.* 7, 307-310.
- Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N. and Yunus, M. (1999) Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39, 2159-2169.
- Venitt, S. and Levy, L.S. (1974) Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature* 250, 493-495.
- Volesky, B. and Holan, Z. R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11, 235-250.
- Vymazal, J. (1990) Uptake of lead, chromium, cadmium and cobalt by *Cladophora glomerata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 468-472.
- Wakatsuki, T. (1995) Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.* 14, 169-177.
- Wales, D. S. and Sagar, B. F. (1990) Recovery of metal ions by microfungial filters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 49, 345-355.
- Wang, H. (1999) Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutat. Res.* 426, 147-149.
- Wang, P., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, K., Toda, K. and Ohtake, H. (1989) Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1665-1669.
- Wang, P., Mori, T., Toda, K. and Ohtake, H. (1990) Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172, 1670-1672.
- Wiegand, H.J., Ottenweilder, H. and Bolt, H.M. (1985) Fast uptake kinetics in vitro of

- $^{51}\text{Cr(VI)}$ by red blood cells of man and rat. Arch. Toxicol. 57, 31-34.
- Wilde, E. and Benemann, J.R. (1993) Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. Biotech. Adv. 11, 781-812.
- Wong, P.K. and Chang, L. (1991) Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. Environ. Pollut. 72, 127-139.
- Wong, P.T. and Trevors, J.T. (1988) Chromium toxicity to algae and bacteria. In: Chromium in the Natural and Human Environments (Nriagu, J.O. and Nieboer, E., Eds.), pp. 305-315. Wiley, New York.
- Wood, J.M. and Wang, H.-K. (1983) Microbial resistance to heavy metals. Environ. Sci. Technol. 17, 582-590.
- Wu, J., Tisa, L.S. and Rosen, B.P. (1992) Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. J. Biol. Chem. 267, 12570-12576.
- Zayed, A., Lytle, C.M., Qian, J.H. and Terry, N. (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. Planta 206, 293-299.
- Zhitkovich, A., Voitkun, V. and Costa, M. (1996) Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: Importance of trivalent chromium and the phosphate group. Biochemistry 35, 7275-7282.

3.-HIPOTESIS

La proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* confiere resistencia a cromato mediante un mecanismo que expulsa el ion tóxico del citoplasma.

4.-OBJETIVO

Determinar el mecanismo de resistencia a cromato conferido por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.-RESULTADOS

MECANISMO DE RESISTENCIA A CROMATO EN *Pseudomonas aeruginosa*

Aunque se han reportado varias cepas bacterianas que poseen plásmidos que confieren resistencia a cromato, solamente los plásmidos pUM505 y pMOL28 de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes eutrophus*, respectivamente, se han estudiado a nivel molecular. En el determinante de *P. aeruginosa* se encuentra el gen *chrA* que codifica una proteína hidrofóbica de 416 residuos, denominada ChrA. Por su composición de aminoácidos y su perfil hidropático, se ha propuesto que ChrA es una proteína de la membrana que presenta 12 dominios transmembranales. ChrA de *P. aeruginosa* causa una disminución significativa en la acumulación de cromato, lo cual sugiere una función relacionada con el transporte de cromato. Aunque en otras bacterias se sabe que la resistencia a cromato también radica en una baja acumulación del ion, el mecanismo detallado de la tolerancia a este anión no ha sido aún descrito. El objetivo principal de este trabajo fue dilucidar el mecanismo bioquímico mediante el cual la proteína ChrA confiere resistencia a cromato en *P. aeruginosa*.

El ANEXO 2 resume los resultados obtenidos acerca de este mecanismo de resistencia.

ANEXO 2

Chromate Efflux by Means of the ChrA Chromate Resistance Protein from *Pseudomonas aeruginosa*

ANGEL H. ALVAREZ,¹ RAFAEL MORENO-SÁNCHEZ,² AND CARLOS CERVANTES^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, 58030 Morelia, Mich., and Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, 14080 México, D.F.,² México

Received 28 June 1999/Accepted 21 September 1999

Everted membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 harboring plasmid pCRO616, expressing the ChrA chromate resistance protein, accumulated four times more $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ than vesicles from plasmidless cells, indicating that a chromate efflux system functions in the resistant strain. Chromate uptake showed saturation kinetics with an apparent K_m of 0.12 mM chromate and a V_{max} of 0.5 nmol of chromate/min per mg of protein. Uptake of chromate by vesicles was dependent on NADH oxidation and was abolished by energy inhibitors and by the chromate analog sulfate. The mechanism of resistance to chromate determined by ChrA appears to be based on the active efflux of chromate driven by the membrane potential.

Plasmid-determined resistance to chromate ions has been found in the genera *Streptococcus* (5), *Pseudomonas* (1, 2, 17), and *Alcaligenes* (9). Molecular analysis of chromate resistance determinants from plasmid pUM505 from *Pseudomonas aeruginosa* (3) and plasmid pMOL28 from *Alcaligenes eutrophus* (10) revealed that the deduced product of the *chrA* gene, the hydrophobic protein ChrA (416 and 401 amino acid residues, respectively), was responsible for the resistance phenotype. Chromate tolerance conferred by the ChrA protein was associated with reduced accumulation of $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ in both *P. aeruginosa* and *A. eutrophus*, and it was hypothesized that ChrA was involved in the extrusion of chromate ions (3, 10). Nevertheless, direct evidence for efflux was missing. Here we show that everted membrane vesicles from chromate-resistant *P. aeruginosa* cells expressing the ChrA protein accumulate more $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ than vesicles prepared from a plasmidless chromate-sensitive derivative.

Bacterial strains and chromate susceptibility. Chromate-sensitive *P. aeruginosa* PAO1 and chromate-resistant PAO1 (pCRO616), which contains the *chrA* gene from plasmid pUM505 (2) cloned in the pKT230 vector, have been previously described (3). Cells were grown in nutrient broth (Bioxon, Mexico City, México) and incubated at 37°C with shaking. The presence of plasmid pCRO616 allowed strain PAO1 to tolerate about six times more chromate than the plasmidless derivative or the isogenic strain bearing the pKT230 cloning vector (data not shown).

Accumulation of $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ by whole cells. Cultures of PAO1(pCRO616) accumulated about 2.5 times less chromate than the sensitive PAO1 strain after an 8-h incubation in the presence of 10 μM chromate (data not shown). Initial rates of chromate uptake were determined with suspensions of exponential-phase cells (0.3 mg/ml [dry weight]) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) with 50 μM $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.; specific activity, 400 to 1,200 mCi/mg). Aliquots (0.1 ml) were filtered through 0.45- μm -pore-diameter membranes (Millipore Corp., Bedford, Mass.) and washed twice with 5 ml of distilled water. The radioactivity on the filters was quantified in a Packard Multi-Pras gamma radi-

ation counter. Cell suspensions from PAO1(pCRO616) showed a decreased initial rate of $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake compared with that from the plasmidless strain (data not shown). Resistance to chromate was also related to diminished chromate accumulation in *Pseudomonas ambigua* (6), *Pseudomonas fluorescens* (11), and *Enterobacter cloacae* (12), although the precise mechanism of resistance was not elucidated in these bacteria. Decreased chromate uptake by resistant cells may be caused either by an efflux system, by a blockage in chromate uptake, or by both processes. To distinguish between these two possibilities, the uptake of chromate by inside-out membrane vesicles was measured. The properties of ChrA suggested that it might function as a membrane transporter involved in the extrusion of chromate (3).

Uptake of $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ by vesicles. Everted membrane vesicles from *Pseudomonas* strains were prepared as follows. Cultures (1 liter) grown for 16 to 18 h at 37°C with shaking were harvested (12,000 \times g, 15 min, 4°C), and then the cells were washed twice in 0.1 M phosphate buffer, suspended in 20 to 25 ml of the same buffer containing 1 mM dithiothreitol, and disrupted by passage twice through an Aminco French pressure cell at 12,000 lb/in². Intact cells were removed by repeating the centrifugation step. Membrane vesicles were recovered by centrifugation at 200,000 \times g for 45 min at 4°C, suspended in SHE buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA [pH 7.4]), and stored at -70°C until used. The activity of inside-out vesicles was assessed as reported by Rotenberg and Moreno-Sánchez (13). Protein was determined by a modification of the method of Lowry et al. (8) by using bovine serum albumin as a standard. Transport assays were carried out at 25°C in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM NADH, 5 mM MgCl₂, and 200 μM $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ and were initiated by the addition of membrane vesicles (0.15-mg/ml final concentration). Samples (0.4 ml) were filtered through 0.22- μm -pore-diameter Millipore membranes and processed as described above. Chromate uptake by vesicles from PAO1(pCRO616) was four times higher than that of its chromate-sensitive derivative (Fig. 1A). These data support the notion that a chromate efflux system is present in the plasmid-containing chromate-resistant strain. In experiments with whole cells, 20-fold excess sulfate (an analog of chromate, inhibited 50 to 60% $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake by PAO1 (data not shown). Apparently, chromate uptake by PAO1(pCRO616) was unaffected by excess sulfate, since this strain accumulated

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Mich., México. Phone/fax: 52 (43) 26-5788. E-mail: cvega@zeus.ccu.umich.mx.

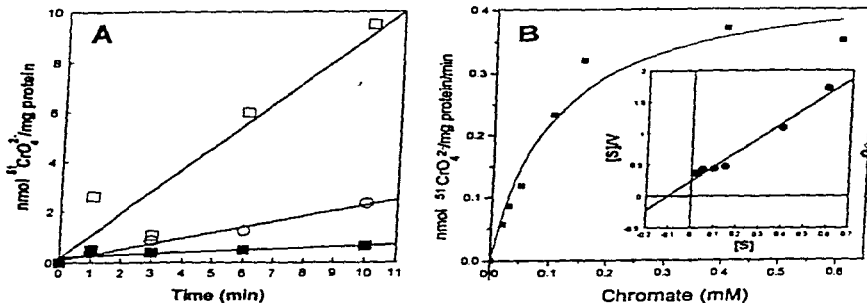


FIG. 1. (A) Chromate uptake by everted membrane vesicles of PAOI (○) and PAOI(pCRO616) (□). Membrane vesicles (0.15 mg/ml) were suspended in phosphate buffer with 200 μM $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$. After incubation at 25°C in the presence of 2 mM NADH, $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake was measured. Uptake by vesicles from PAOI(pCRO616) was assayed in the absence of NADH (■). (B) Kinetics of chromate uptake by vesicles of PAOI(pCRO616). The uptake conditions were as described above, except that various concentrations of chromate were tested and aliquots were filtered after a 10-min incubation. The solid line represents the best fit to the Michaelis-Menten (hyperbolic) equation. The inset shows a linear transformation of the Michaelis-Menten equation by using the Hanes-Woolf plot (14). Data are representative of three assays in duplicate.

an amount of chromate similar to that accumulated by the sensitive one in the presence of 1 mM sulfate (data not shown). Hence, these data suggested that chromate efflux was not functioning in the presence of high concentrations of sulfate. Accordingly, $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake by membrane vesicles of PAOI(pCRO616) was severely inhibited by sulfate (Table 1). Thus, it appears that sulfate competes with chromate for extrusion by the ChrA protein. This is not surprising, since it has been established that chromate is a competitive inhibitor of sulfate transport in *Pseudomonas* (3, 11).

Kinetics of chromate uptake. For the determination of kinetic constants, $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake by membrane vesicles from strain PAOI(pCRO616) was measured with various concentrations of chromate after a 10-min incubation. $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ was taken up by the vesicles of PAOI(pCRO616) according to substrate saturation kinetics (Fig. 1B). An apparent K_m of 0.12 ± 0.05 ($n = 3$) mM chromate and a V_{max} of 0.5 ± 0.23 ($n = 3$) nmol of chromate/min per mg of protein were calculated (Fig. 1B). This K_m value is similar to that of 0.14 mM

reported for the accumulation of arsenite by everted membrane vesicles of *Escherichia coli* cells expressing the ArsB protein from plasmid R773 (7). ChrA and ArsB are hydrophobic proteins of about 400 amino acid residues, with no significant identity at the amino acid sequence level, but with similar amino acid composition and hydrophobic profiles (4). Both proteins seem to be involved in similar anion extrusion systems.

Energetics of chromate uptake. $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake by membrane vesicles of strain PAOI(pCRO616) was much lower in the absence of NADH (Fig. 1A and Table 1), suggesting that a transmembrane H^+ gradient is required for chromate transport. Accordingly, the respiratory chain inhibitors NaCN, HQNO, and NaN₃ were tested and significantly lowered chromate uptake by vesicles (Table 1); notably, cyanide diminished uptake by almost 80%. Treatment of vesicles with ionophores also caused a significant inhibition of chromate uptake (Table 1); nigericin abolished chromate uptake by 65%. These data suggest that ChrA functions as a secondary transport system using the membrane potential as an energy source for the extrusion of chromate ions. Moreover, the addition of 50 mM lactic acid, which decreased the pH of assays from neutral to about 5.0, caused an increase in $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ uptake by vesicles of PAOI(pCRO616) (data not shown), also implying the involvement of protons in chromate transport. Arsenite extrusion by vesicles from *E. coli* expressing the ArsB protein also decreased at alkaline pH (7).

Whereas several bacterial determinants for the active efflux of diverse inorganic cations have been described (16), efflux of chromate by the ChrA protein represents the second example of an inorganic anion translocation system reported in bacteria, the first one being the already mentioned *ars* operon for the extrusion of arsenite (15).

We thank Eréndira Vargas, Irais Sánchez, and Concepción Bravo for technical help.

This work was supported by grants from Coordinación de Investi-

TABLE 1. Effect of energy inhibitors on chromate uptake by everted membrane vesicles

Treatment	Initial rate of chromate uptake (nmol of $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ /mg of protein/min) ^a
+NADH	1.59 \pm 0.10
No NADH	0.52 \pm 0.06
+4 mM NaCN	0.34 \pm 0.20
+50 μM HQNO	0.54 \pm 0.26
+20 mM NaN ₃	0.60 \pm 0.26
+50 μM Carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone	0.66 \pm 0.10
+5 μM Nigericin	0.55 \pm 0.20
+1 mM Na ₂ SO ₄	0.48 \pm 0.13

^a Chromate uptake by vesicles from PAOI(pCRO616) was assayed in phosphate buffer with 2 mM NADH and 400 μM chromate, as described in the text. The values are the mean \pm standard deviation of three assays in duplicate.

gación Científica (UMSNH) to C.C. and CONACYT (25274-M) to R.M.-S. A.H.A. was supported by a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- Bopp, L. H., A. M. Chakrabarty, and H. L. Eherlich. 1983. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155:1105-1109.
- Cervantes, C., and H. Ohtake. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:173-176.
- Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Mirra, and S. Silver. 1990. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUMS05. *J. Bacteriol.* 172:287-291.
- Cervantes, C., and S. Silver. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27:65-71.
- Efstathiou, J. D., and L. L. McKay. 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 130:257-265.
- Hortisau, H., S. Futo, K. Ozawa, and K. Kawai. 1983. Comparison of characteristics of hexavalent-chromium tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* G-1, and its hexavalent chromium-sensitive mutant. *Agric. Biol. Chem.* 47:2907-2908.
- Kuroda, M., S. Dey, O. I. Sanders, and B. P. Rosen. 1997. Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the ArsA anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:326-331.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Nies, A., D. H. Nies, and S. Silver. 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:5065-5070.
- Nies, A., D. H. Nies, and S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- Ohtake, H., C. Cervantes, and S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169:3853-3856.
- Ohtake, H., K. Komori, C. Cervantes, and K. Toda. 1990. Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:85-88.
- Rottenberg, H., and R. Moreno-Sanchez. 1993. The proton pumping activity of H⁺-ATPases: an improved fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* 113:161-170.
- Segel, I. H. 1975. *Enzyme kinetics*, p. 210-212. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Silver, S., G. JI, S. Bröer, S. Dey, D. Dou, and B. P. Rosen. 1993. Orphan enzyme of patriarch of a new tribe: the arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 8:637-642.
- Silver, S., and L. T. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.
- Summers, A. O., and G. A. Jacoby. 1978. Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:637-640.

6.- DISCUSION Y PERSPECTIVAS

El gen de resistencia a cromato *chrA*, originalmente identificado en el plásmido pUM505 (100 kb) de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y Ohtake, 1988), se clonó en el vector pKT230 dando origen al plásmido recombinante pCRO616 (Cervantes y col., 1990). Mediante experimentos de transporte de cromato radioactivo encontramos que la tolerancia a cromato se debe a una captación disminuida del ion, por lo que se hipotetizó que ChrA funciona como un sistema de expulsión de cromato (Cervantes y Ohtake, 1988; Cervantes y col., 1990). La proteína deducida de la secuencia de nucleótidos de *chrA*, denominada ChrA, es un polipéptido hidrofóbico de 416 aminoácidos que es necesario y suficiente para conferir la resistencia a cromato en *P. aeruginosa*. En el presente trabajo se planteó como principal objetivo conocer el mecanismo bioquímico que emplea ChrA para conferir resistencia a cromato en *P. aeruginosa*.

La resistencia a cromato fue aproximadamente 10 veces mayor en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1(pCRO616) que en la cepa PAO1 sensible sin plásmido. Los niveles de tolerancia a cromato encontrados concuerdan con los observados por Cervantes y col. (1990) en la cepa PAO1 con el plásmido pUM505, de donde se clonó el gen *chrA*; estos niveles también tienen similitud con los conferidos por los plásmidos pLHB1 y pMOL28 de *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake y col., 1987) y *Alcaligenes eutrophus* (Nies y col., 1989), respectivamente, bacterias en las que también se ha propuesto un sistema de expulsión de cromato como responsable del fenotipo de resistencia. En estos casos, sin embargo, no existe evidencia experimental de un mecanismo de expulsión.

En cultivos incubados durante 6-8 h en presencia de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$, se observó un distinto patrón de acumulación del anión: la cepa resistente PAO1(pCRO616) acumuló de 2 a 10 veces menos cromato que la cepa sensible PAO1. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Cervantes y col. (1990) en *P. aeruginosa* PAO1(pUM505), y son similares a los reportados para cepas resistentes a cromato de *A. eutrophus* (Nies y col., 1989) y *Enterobacter cloacae* (Ohtake y col., 1990). Estos resultados nuevamente sugirieron la posibilidad de que un sistema de expulsión sea la base de la resistencia a cromato.

Cuando se incubaron suspensiones celulares en presencia de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ durante 15 min y se midió la captación del ion, se observó que la velocidad inicial del transporte de cromato es aproximadamente 2.7 veces menor en la cepa resistente PAO1(pCRO616) que en la cepa sensible PAO1 (ver **Figura 1A del anexo I**); este dato muestra que el sistema de resistencia funciona aun en tiempos cortos de exposición bacteriana al cromato. Ohtake y col. (1987) encontraron una captación 2.2 veces menor de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ en la cepa de *P. fluorescens* LB300(pLHB1) resistente a cromato, que en una cepa sensible sin el plásmido; estos autores propusieron que la acumulación disminuida de cromato en *Pseudomonas* era debida a un sistema de expulsión del ion. Aunque el plásmido pLHB1 no mostró similitud con el DNA del gen *chrA* del plásmido pCRO616 (Cervantes y col., datos no publicados), no se descarta la

posibilidad de que se trate de un sistema de resistencia similar.

La acumulación disminuida de iones inorgánicos tóxicos en bacterias resistentes puede deberse a la presencia de sistemas de expulsión, como los encontrados en algunos determinantes plasmídicos de resistencia a Ag^+ , As^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} (Cervantes y Silver, 1996; Vargas y col., 1998). La baja acumulación puede también obedecer a un bloqueo en la captación del ion, causado por una alteración en el sistema de transporte por el cual ingresa a la célula. Por ejemplo, la resistencia bacteriana a arsenato (AsO_4^{3-}) puede relacionarse con una mutación que afecta la vía de captación de su análogo esencial fosfato (PO_4^{3-}) (Cervantes y col., 1994); de manera similar, la resistencia a cromato se ha asociado con mutaciones que alteran la vía de entrada de sulfato tanto en bacterias (Cervantes y Silver, 1992) como en levaduras (Scheibel y col., 1997).

La hipótesis de la expulsión de cromato como la base del mecanismo de resistencia conferido por ChrA fue también apoyada inicialmente por la similitud que existe entre la proteína ArsB, de los operones bacterianos que confieren resistencia a arsénico (Cervantes y col., 1994), y la proteína ChrA de *P. aeruginosa* (Cervantes y Silver, 1992). ArsB es un transportador de membrana que expulsa al anión arsenito (AsO_2^-) del citoplasma, ya sea actuando como una subunidad de la ATPasa ArsA (Tisa y Rosen, 1990), o como un transportador secundario empleando el potencial de membrana como fuente de energía (Dey y Rosen, 1995; Kuroda y col., 1997) (ver Figura 3.2 del anexo 3). ChrA y ArsB son proteínas hidrofóbicas de aproximadamente 400 aminoácidos, sin relación significativa a nivel de la secuencia, pero con una gran similitud en cuanto a su composición de aminoácidos y a sus perfiles hidropáticos (Cervantes y Silver, 1992). La similitud entre ChrA y ArsB incluye los 12 segmentos transmembranales, motivos aparentemente conservados en diversos transportadores bacterianos (Nikaido y Saier, 1992; Wu y col., 1992; Nies y col., 1998) (ver Figura 3 del anexo 1). Estas semejanzas reforzaron la posibilidad de que ChrA funcionara también como un transportador de membrana involucrado en la expulsión del anión cromato del citoplasma celular.

Para probar la hipótesis de la expulsión de cromato como responsable del mecanismo de resistencia, inicialmente se intentó cuantificar la salida del cromato radioactivo en suspensiones celulares previamente incubadas con el anión. La medición de la expulsión de iones inorgánicos utilizando células intactas se ha descrito para iones fisiológicos como el Na^+ (Rosen, 1986) pero, salvo el caso de arsenito, oxianión derivado del metaloide arsénico (Bröer y col., 1993), no existen reportes donde se haya dilucidado un sistema de expulsión de metales pesados utilizando células completas (Vargas y col., 1998). El diseño experimental consistió en "cargar" suspensiones bacterianas con $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ incubándolas durante 2 horas en presencia del ion; posteriormente, la suspensión se diluyó 100 veces y se cuantificó la salida del cromato intracelular. Los resultados fueron negativos: la salida de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ fue similar en la cepa resistente PAO1 (pCRO616) que en la cepa sensible PAO1. Aunque se modificaron diversas variables experimentales, como el tiempo y la temperatura de incubación, la concentración de cromato y la tonicidad del medio, no se detectaron diferencias significativas en la

pérdida de la radioactividad acumulada en las cepas sensible y resistente. No se tiene una explicación para este problema, pero tal vez se relacione con nuestro hallazgo posterior de que la presencia de sulfato (proveniente del medio de cultivo) en los ensayos de transporte inhibe la expulsión de cromato (ver más adelante).

Aun cuando que no fue posible detectar la salida del cromato en suspensiones celulares, no se descartó la posibilidad de que la expulsión fuera responsable de la acumulación disminuida del ion. En virtud de que los sistemas de expulsión para metales como plata, cobre, cadmio, e incluso arsénico, se han dilucidado mediante el uso de vesículas de membrana invertidas (Tsai y col., 1992; Solioz y Odermatt, 1995; Kuroda y col., 1997), se decidió emplear esta alternativa para estudiar el transporte de cromato. Los resultados obtenidos con las vesículas de membrana invertidas corroboraron la hipótesis de expulsión planteada inicialmente: las vesículas de la cepa PAO1(pCRO616) acumularon de 2 a 5 veces más cromato que las de la cepa PAO1 (ver **Figura 1A del anexo 2**). Una mayor acumulación de cromato en las vesículas invertidas de la cepa resistente indica que está funcionando un sistema de expulsión y demuestra que éste es el mecanismo responsable de la resistencia al anión.

Con el fin de ahondar en las propiedades del sistema de expulsión de cromato, se determinaron las constantes cinéticas del transporte en las vesículas de membrana invertidas de la cepa PAO1(pCRO616). La expulsión de $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ mostró una cinética típica de Michaelis-Menten con una K_m aparente de 0.12 ± 0.05 mM de cromato y una V_{max} de 0.5 ± 0.23 nmol de cromato/min/mg de proteína (ver **Figura 1B del anexo 2**). Es interesante que este valor de K_m fue similar al reportado (0.14 mM) para la acumulación de otro oxianión, arsenito, en vesículas de *E. coli* en las que se expresó la proteína ArsB del plásmido R773 (Kuroda y col., 1997); como se mencionó antes, ArsB y ChrA muestran también similitud a nivel estructural.

La captación de cromato por las vesículas de la cepa PAO1(pCRO616) se abatió hasta en un 67% en ausencia del sustrato respiratorio NADH (ver **Figura 1A y Tabla 1 del anexo 2**). La participación del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria en los procesos de transporte membranar ha sido ampliamente documentada (Ramos y col., 1976), y es la base de algunos sistemas de expulsión de sustancias tóxicas en bacterias (Paulsen y col., 1996; Lolkema y col., 1998), incluyendo arsenito (Broer y col., 1993; Dey y Rosen, 1995; Kuroda y col., 1997). El requerimiento de NADH por las vesículas de PAO1(pCRO616) para la captación de cromato indica que la fuerza protomotriz que genera el potencial de membrana es necesaria para la expulsión del anión por la proteína ChrA.

El tratamiento de las vesículas con los ionóforos desacoplantes CCCP y nigericina disminuyó significativamente la captación de cromato por las vesículas de membrana de la cepa PAO1(pCRO616) (ver **Tabla 1 del anexo 2**). Por otra parte, los inhibidores respiratorios NaCN, NaN₃ y HQNO también redujeron la captación de cromato por las vesículas de la cepa resistente (ver **Tabla 1 del anexo 2**). Así, con la participación de la cadena respiratoria en la formación de la fuerza

protomotriz, se confirmó la intervención del potencial de membrana como base de la expulsión membranal de cromato por la proteína ChrA.

Con base en los resultados mostrados, en este trabajo se concluye que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* funciona como un transportador secundario de cromato que utiliza el gradiente de protones como fuente de energía para expulsar este anión del citoplasma (Figura 1). Este es el primer reporte que define las bases de un mecanismo plasmídico de resistencia a cromato en bacterias (Alvarez y col., 1999).

Se ha propuesto que ChrA y sus homólogos posiblemente funcionen como sistemas de intercambio sulfato/cromato, expulsando el cromato bajo condiciones fisiológicas (Nies y col., 1998). No existen datos experimentales que apoyen dicha hipótesis, pero el hecho de que las vesículas de membrana de *P. aeruginosa* empleadas en este trabajo fueron capaces de translocar al cromato, aun en ausencia de sulfato, parece indicar que tal intercambio no ocurre. Más aún, Ohtake y col. (1987) encontraron que no hay alteraciones en la cinética del transporte de sulfato en una cepa de *P. fluorescens* que posee un plásmido de resistencia a cromato, en comparación con la cepa sensible sin el plásmido. Nuestros resultados permiten concluir que la expulsión de cromato, causada por la proteína ChrA de *P. aeruginosa*, no se encuentra relacionada con el transporte de sulfato.

Por otra parte, en este trabajo se encontró que el sulfato sí ejerce un efecto inhibitorio sobre la captación de cromato por las vesículas de membrana de la cepa PAO1(pCRO616)(ver **Tabla 1 del anexo 2**): el transporte de cromato disminuyó 69 a 82% a concentraciones de 0.25 a 10 mM de sulfato. Como ChrA no expulsa el ion esencial sulfato, estos datos sugieren que la proteína posee sitios de unión para cromato que pueden ser reconocidos por el sulfato. En *Salmonella typhimurium* se ha reportado que el sulfato se une a su transportador de la membrana, la proteína Sbp, por medio de puentes de hidrógeno (Pflugrath y Quioco, 1985); con base en la analogía del sulfato con el cromato, es probable que la unión del cromato a la proteína ChrA ocurra por este mismo tipo de interacciones. Por medio de mutagénesis se podría conocer cuáles son los aminoácidos de ChrA involucrados en la unión del cromato. Varios residuos polares (principalmente de carácter básico) presentes en ChrA son candidatos para estos sitios de unión (ver **Figura 3 del anexo 1**). El análisis del efecto del sulfato sobre la cinética de transporte de cromato por ChrA, en células intactas o en vesículas de membrana, podría ser una estrategia experimental útil para el entendimiento de las interacciones de ChrA con estos oxianiones.

Nies y col. (1990) identificaron un homólogo de ChrA (29% de identidad a nivel de aminoácidos) en el determinante de resistencia a cromato del plásmido pMOL28 de la bacteria Gram negativa *A. eutrophus* (ver **Figura 3.7 del anexo 3**). Dada la gran similitud de los perfiles hidropáticos de las proteínas ChrA de *P. aeruginosa* y de *A. eutrophus*, se puede inferir que ésta última confiere resistencia a cromato por un mecanismo de expulsión similar al descrito en este trabajo. Por otra parte, Nicholson y Laudénbach (1995) encontraron homología entre la proteína SrpC, codificada por el

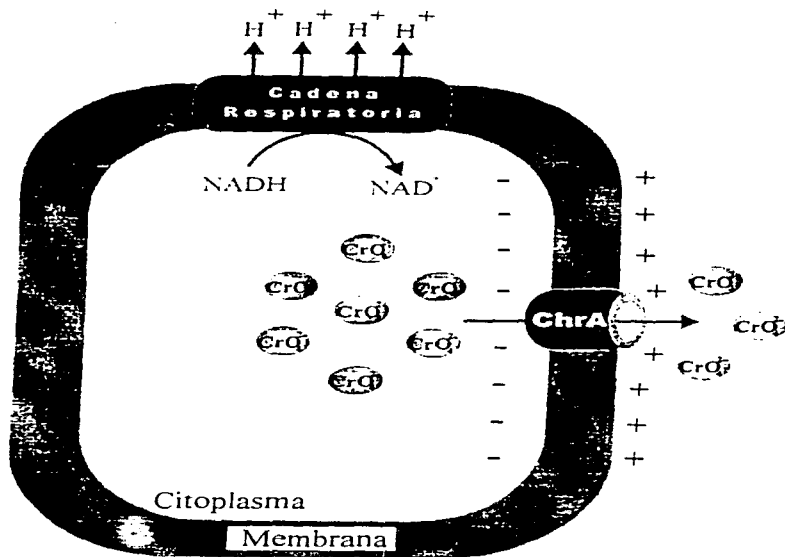


Figura 1.-Mecanismo de resistencia a cromato conferido por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. El esquema muestra a ChrA como un transportador de la membrana que expulsa cromato del citoplasma. También se indica la participación del gradiente de protones, formado por la cadena respiratoria, en el mecanismo de expulsión.

plásmido pANL en la cianobacteria *Synechococcus*, y las proteínas ChrA de *A. eutrophus* (63% de identidad) y *P. aeruginosa* (23% de identidad)(ver **Tabla 2 del anexo 1**); a SrpC se le asignó una función en el transporte de sulfato y no se considera un determinante de resistencia a cromato. Más genes similares a los genes *chrA* plasmídicos se han encontrado en la secuencia de los genomas de la arquea *Methanococcus janaschii* (Bult y col., 1996), la cianobacteria *Synechocystis* (Kaneko y col., 1996), la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* (Presecan y col., 1997) y el agente responsable de la enfermedad de Lyme *Borrelia burgdorferi* (Fraser y col.,1997)(ver **Tabla 2 del anexo 1**); sin embargo, en todos estos casos la función del gen relacionado con *chrA* es hasta ahora desconocida. En un análisis por PCR, empleando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *chrA* de *P. aeruginosa*, recientemente localizamos posibles homólogos del gen *chrA* en el DNA total de bacterias ambientales resistentes a cromato (García y Cervantes, en preparación). Estos hallazgos indican que los genes *chrA* se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, situación que probablemente se relaciona con la presencia de cromatos en el ambiente; una extensa distribución de los genes bacterianos *ars*, que confieren resistencia a arsénico, ha sido también descrita (Silver y col., 1993).

Hemos encontrado que ChrA de *P. aeruginosa* contiene varios aminoácidos básicos que se conservan en los homólogos citados arriba y que podrían participar en la unión del cromato (ver **Figura 3 del anexo 1**). La alteración de dichos residuos por mutagénesis dirigida es una estrategia accesible para corroborarlo. Por otra parte, para localizar aminoácidos involucrados en la resistencia, el gen *chrA* puede transferirse a una cepa de *E. coli* que causa mutaciones al azar (Stratagene). Los segmentos mutados serían recuperados por PCR, subclonados y se seleccionarían mutantes sensibles a cromato. Los genes *chrA* de las mutantes serían secuenciados y los cambios en la proteína analizados.

Se han reportado varios determinantes bacterianos que confieren resistencia mediante sistemas de expulsión de cationes inorgánicos, como Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} (Cervantes y Silver, 1996; Silver y Phung, 1996); no obstante, la expulsión de cromato por la proteína ChrA de *P. aeruginosa* es apenas el segundo ejemplo reportado en bacterias de un sistema de translocación de un anión inorgánico (el primer sistema descrito fue la familia de los ya mencionados genes *ars* que causan la expulsión de arsenito; Silver y col., 1993).

En este trabajo se ha demostrado que la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa* confiere resistencia a cromato mediante la expulsión de este oxianión tóxico del citoplasma. Sin embargo, varios aspectos importantes de la estructura y la función de ChrA quedan aún por resolver con el fin de comprender con detalle este sistema de transporte.

6.1.-BIBLIOGRAFIA

(Referencias citadas en **Discusión y Perspectivas**).

Alvarez, A.H., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (1999) Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.

Bröer, S., Ji, G., Bröer, A. y Silver, S. (1993) Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. J. Bacteriol. 175:3480-3485.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., Fitzgerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.-F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Roberts, K.M., Hurst, M.A., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H.-P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. y Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschi*. Science 273:1058-1073.

Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J.L. y Silver, S. (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 15:355-367.

Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988) Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 56:173-176.

Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. y Silver, S. (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172:287-291.

Cervantes, C. y Silver, S. (1992) Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27:65-71.

Cervantes, C. y Silver, S. (1996) Metal resistances in Pseudomonads, p. 398-416. En: T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas y S. Silver (Eds.) Molecular Biology of Pseudomonads. ASM Press, Washington, DC.

Dey, S. y Rosen, B.P. (1995) Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. J. Bacteriol. 177:385-389.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.-F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fujii, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., y Venter, J.C. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. Nature 390:580-586.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of

the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136.

Kuroda, M., Dey, S., Sanders, O.I. y Rosen, B.P. (1997) Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the ArsA anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:326-331.

Lolkema, J.S., Poolman, B. y Konings, W.N. (1998) Bacterial solute uptake and efflux systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:248-253.

Nies, A., Nies, D.H. y Silver, S. (1989) Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:5065-5070.

Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M.H. Jr. (1998) CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.

Nikaido, H. y Saier, M.H. Jr. (1992) Transport proteins in bacteria: Common themes in their design. *Science* 258:936-941.

Ohtake, H., Cervantes, C. y Silver, S. (1987) Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169:3853-3856.

Ohtake, H., Komori, K., Cervantes, C. y Toda, K. (1990) Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:85-88.

Paulsen, I.T., Brown, M.H. y Skurray, R.A. (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.

Pflugrath, J.W. y Quijcho, F.A. (1985) Sulphate sequestered in the sulphate-binding protein of *Salmonella typhimurium* is bound solely by hydrogen bonds. *Nature* 314:257-260.

Presecan, E., Moszer, I., Boursier, L., Cruz-Ramos, H., de la Fuente, V., Hullo, M.-F., Lelong, C., Schleich, S., Sekowska, A., Song, B.H., Villani, G., Kunst, F., Danchin, A. y Glaser, P. (1997) The *Bacillus subtilis* genome from gerBC (3110) to licR (3340). *Microbiology* 143:3313-3328.

Ramos, S., Schuldiner, S. y Kaback, H.R. (1976) The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1892-1896.

Rosen, B.P. (1986) Ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 125: 328-336.

Scheibel, T., Bell, S. y Walke, S. (1997). *S. cerevisiae* and sulfur: a unique way to deal with the environment. *FASEB J.* 11:917-921.

Silver, S., Ji, G., Bröer, S., Dey, S., Dou, D. y Rosen, B.P. (1993) Orphan enzyme or patriarch of a new tribe: the arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 8:637-642.

Silver, S. y Phung, L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.

Soloz, M. y Odermatt, A. (1995) Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270:9217-9221.

Tisa, L.S. y Rosen, B.P. (1990) Molecular characterization of an anion pump: the ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* 265:190-194.

Tsai, K.-J., Yoon, K.P. y Lynn, A.R. (1992) ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174:116-121.

Vargas, E., Alvarez, A.H. y Cervantes, C. (1998) Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 40:53-71.

Wu, J., Tisa, L.S. y Rosen, B.P. (1992) Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 267:12570-12576.

7.-APENDICES

7 .1.-MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A METALES TOXICOS

Las bacterias han tenido que coexistir en el ambiente con los metales (y metaloides) tóxicos. El desprendimiento de iones a partir de los suelos y rocas debido a causas geológicas, o por la misma actividad geomicrobiana, ha sido una fuente importante de la presencia de metales en el habitat microbiano. Sin embargo, más recientemente, son las actividades humanas las que han modificado considerablemente los niveles de iones metálicos tóxicos en el ambiente debido al amplio uso industrial de los derivados de metales y metaloides, la extensa explotación de los recursos minerales, y el vasto empleo de pesticidas de origen inorgánico. Por su parte, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que les permiten tolerar los efectos tóxicos de los metales. Los determinantes bacterianos de resistencia a metales pueden residir en el cromosoma, aunque con frecuencia se encuentran localizados en plásmidos.

En el ANEXO 3 se resumen las características generales de estos mecanismos de resistencia.

ANEXO 3

Contaminación ambiental por metales pesados

Impacto en los seres vivos

Editado por:

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad
Michoacana, Morelia, Mich., México

Y

Rafael Moreno-Sánchez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología,
México, D.F.

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Morelia, Mich., México

Rafael Moreno-Sánchez
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología México, D. F.

Coordinador Editorial: Abelardo Rojas Flores
Tipografía y Diagramación: Entelekia
Corrección de estilo: Antonio Lemus Gamboa

La presentación y arreglo en conjunto de *CONTAMINACION AMBIENTAL POR METALES PESADOS. Impacto en los seres vivos, son propiedad del editor. Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida o transmitida mediante ningún sistema o medio electrónico o mecánico (incluyendo el fotocopiado, la grabación o cualquier método para recuperar y almacenar información), sin autorización por escrito del editor.*

Derechos reservados
© 1999, A. G. T. Editor, S. A.
Progreso 202-Planta Alta, Col. Escandón
México 11800, D. F.

Primera edición: 1999
ISBN 968-463-093-X

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

Capítulo

3

Resistencia bacteriana a los metales pesados

Luis Cervantes

Introducción

La presencia de metales pesados en el ambiente suele ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, pero, por otra lado, posibilita la selección de variantes resistentes al efecto tóxico del ión. Por lo general, los determinantes genéticos que confieren resistencia a los iones inorgánicos se localizan en plásmidos y no en el cromosoma bacteriano. Estos plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se han encontrado en la mayoría de los especies bacterianas estudiadas hasta la fecha, 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 las bacterias en situaciones de emergencia y por ello se consideran elementos importantes en la evolución de las células bacterianas. La localización de los determinantes de resistencia a los metales pesados en plásmidos ha facilitado la clonación molecular de varios de ellos, en algunos casos se ha determinado además su secuencia de nucleótidos y se ha deducido la secuencia de aminoácidos de sus productos pépticos (Cervantes *et al.*, 1991; Silver y Waldorhaug, 1992). A continuación se presentan los metales (y metaloides) de los que se tiene mayor información en cuanto a sus interacciones de toxicidad y de tolerancia con las bacterias.

Aluminio (Al)

En comparación con las plantas, se han dirigido pocos estudios de manera directa hacia los efectos del Al en las bacterias, a pesar de que los microorganismos pueden representar un modelo experimental muy importante para el estudio de los mecanismos de toxicidad y tolerancia de sustancias nocivas (Garcidueñas-Piña y Cervantes, 1996).

Guida *et al.* (1991) estudiaron la toxicidad del Al en *Escherichia coli*, y encontraron que la inhibición del crecimiento depende notablemente del pH, registrando sensibilidad a 0.9 y 2.25 mM de Al, a pH 5.4 y 6.6, respectivamente. También obser-

Contaminación ambiental por metales pesados

varon que aumente la toxicidad cuando se omite el Fe del medio o por el uso de cultivos en fase exponencial de crecimiento. De estos resultados concluyeron que el transporte de Al hacia el interior de la célula, implica los vías de transporte del Fe(III).

En una cepa de *Pseudomonas fluorescens* se ha encontrado que la exposición al Al provoca la producción de sustancias lipídicas extracelulares que probablemente unen al metal (Apponna et al., 1994). Sin embargo, recientemente se observó que bacterias tanto sensibles como resistentes al Al, secretan sustancias lipídicas similares (Garcidueñas-Piña y Cervantes, en preparación). Ciertas cepas de *Pseudomonas* asociadas con plantas y resistentes al Cu, acumulan Cu y Al, pero no otros metales, cuando se inducen con Cu (Cooksey y Aziz, 1992). En algunos de estos cepas, el EDTA, un compuesto quelante de cationes metálicos, no remueve al Al, lo que sugiere que el metal tiene una ubicación intracelular.

Se han comunicado efectos inhibitorios del Al sobre el crecimiento, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, y se encontró que el ion se capta y acumula rápidamente en gránulos de polifosfato y en las paredes celulares. A partir de estos estudios, se sugiere que la toxicidad se debe al Al intracelular y no a sus interacciones con los nutrientes en el medio de cultivo (Patterson et al., 1986). Husaini y Rai (1992) encontraron que aumenta la toxicidad del Al en la cianobacteria *Nostoc linckia*, al disminuir el pH de 7.5 a 4.5, y que el contenido de ATP y otros procesos fisiológicos se ven seriamente afectados por una combinación de Al y bajo pH.

Estudios en *Rhizobium* han mostrado que el Al se incorpora a la célula y se une al DNA de las cepas tanto sensibles como tolerantes al ion, sin embargo, no se afecta la replicación del DNA en las cepas tolerantes (Johnson y Wood, 1990). La nodulación parece ser un proceso muy sensible a la presencia del Al. Richardson et al. (1988) han encontrado que concentraciones tan bajas como 7.5 μM de Al inhiben la expresión de los genes *nod* de la nodulación.

Arsénico (As)

La resistencia al arsénato resulta por lo general de alteraciones en el transporte de fosfato. Las bacterias captan el arsénato mediante los sistemas de transporte de fosfato; algunas de ellas poseen dos vías distintas de transporte de fosfato (Rosenberg, 1987): un sistema capta tanto fosfato como arsénato con afinidades similares (llamado el sistema Pit en *E. coli*), mientras que la otra vía (el sistema Pst) es muy específica para fosfato y transporta arsénato con muy baja afinidad. Los mutantes alterados en el sistema Pit por lo común son resistentes al arsénato.

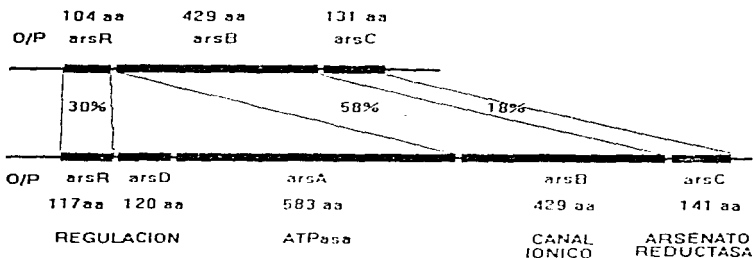
La oxidación de As(III) a As(V) es un proceso de detoxificación que les permite a los microorganismos tolerar elevadas concentraciones de arsénito. Se han comunicado varios ejemplos de oxidación bacteriana de arsénito a arsénato (Summers y Silver, 1978; Newman et al., 1997). De manera reciente, Anderson et al. (1992) purificaron y caracterizaron una arsenito oxidasa a partir de una cepa de *Alicycobacter faecalis*. Esta enzima se localiza en la parte exterior de la membrana interna y oxida al arsénito en presencia de azurina y citocromo c como aceptores electrónicos. Otros transformaciones biológicas del As implican metilación y desmetilación (Summers y Silver, 1978; Craig, 1989) y aunque estos procesos no son mecanismos de resistencia, se considera que tienen una función importante en el reciclamiento biogeoquímico del metaloide (Cervantes et al., 1994).

Resistencia bacteriana a los metales pesados

Las cianobacterias parecen ser resistentes de manera natural al arsenato (Thiel, 1988); a diferencia de lo que sucede en otras bacterias, en las cianobacterias el arsenato podría no ser transportado por las vías del fosfato. En *Anabaena variabilis*, el arsenato es tóxico a muy altas concentraciones, pero a valores bajos sólo se inhiben las células desprovistas de fosfato (Thiel, 1988). Se cree que las cianobacterias toleran el arsenato porque poseen mecanismos de resistencia que incluyen tanto sistemas membranales de expulsión como vías metabólicas intracelulares (Thiel, 1988).

Novick y Roth (1968) descubrieron la resistencia bacteriana a los iones de As conferida por plásmidos en *Staphylococcus aureus*. Los determinantes de resistencia a As son muy comunes en los plásmidos de estafilococos, pero también se han identificado en bacterias gramnegativas. Los plásmidos de resistencia al As confieren tolerancia al arsenato, arsenito y antimonio (Novick y Roth, 1968; Silver *et al.*, 1981; Cervantes y Chavez, 1992). La resistencia a los tres iones es inducible y cada uno de ellos es capaz de inducir resistencia a los demás (Silver *et al.*, 1981). Los determinantes de resistencia a As de *E. coli* y de *S. aureus* se han clonado y secuenciado (Chen *et al.*, 1986; Rosenstein *et al.*, 1992). El operón *ars* del plásmido R773 de *E. coli* consta de cinco genes denominados *arsA*, *arsD*, *arsR*, *arsB* y *arsC*. En contraste, los operones *ars* del plásmido p1258 de *S. aureus* y del plásmido pSX267 de *S. typhimurium* sólo tienen tres genes: *arsA*, *arsB* y *arsC* (Ji y Silver, 1992; Rosenstein *et al.*, 1992). La figura 3.1 muestra la comparación entre los operones *ars* de *E. coli* y de *Staphylococcus*.

Staphylococcus spp.



Escherichia coli

Figura 3.1. Comparación de los operones de resistencia a As de los plásmidos de *Staphylococcus* y *Escherichia coli*. Se muestran los genes *ars* en el orden de transcripción, los tamaños de sus productos (no. de aminoácidos, aa), el porcentaje de homología de las secuencias de aa y la función de cada uno de las proteínas. O/P, operador/promotor. Adaptado de Cervantes *et al.* (1992)

Contaminación ambiental por metales pesados

En las bacterias gramnegativas y grampositivas, los operones *ars* son regulados por el gen *arsR* que codifica un represor dimérico; *ars* puede inducirse *in vivo* por arsenato, arsenito, antimonio o bismuto (Ji y Silver, 1992a; Rosenstein et al., 1992). Además de *arsR*, el operón *ars* de *E. coli* tiene un segundo gen regulador, *arsD*. *ArsD* parece ser una proteína reguladora independiente del inductor que controla el nivel de expresión de los genes *ars* (Wu y Rosen, 1993).

La proteína *ArsA* de *E. coli* codifica una ATPasa, como se infirió al principio por su homología significativa con otras proteínas que unen ATP, esta homología sólo se presenta en las regiones de unión al ATP y no en el resto de la cadena polipeptídica (Chen et al., 1986). *ArsA* ha sido purificada y se ha demostrado que se encuentra fuertemente unida a la proteína membranal *ArsB* (ver más adelante) (Rosen et al., 1988). *ArsA* expulsa arsenito, pero es incapaz de eliminar arsenato pues, en caso contrario, la ATPasa expulsaría también el análogo esencial fosfato, con serias consecuencias metabólicas para la célula.

La proteína *ArsB* de *E. coli* consta de 429 aminoácidos, forma parte integral de la membrana interna y posee 12 segmentos transmembranales que la capacitan para actuar como un poro iónico (Wu et al., 1992), además, *ArsB* funciona como un anclaje en la membrana para la ATPasa *ArsA* (Tisa y Rosen, 1989) (figura 3.2). El complejo *ArsA-ArsB*, primer ejemplo de una ATPasa que transporta aniones, funciona como una bomba primaria para la expulsión de arsenito (Silver et al., 1993a). Como se verá

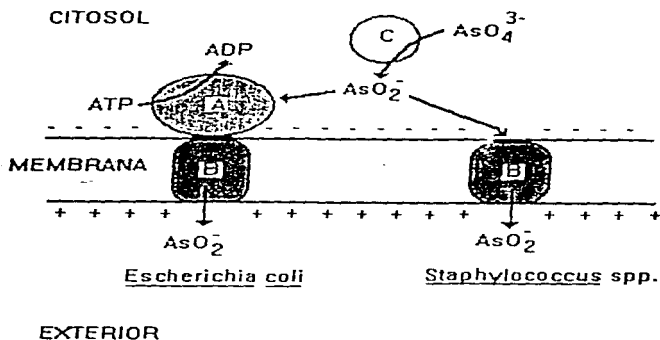


Figura 3.2. Funcionamiento de las proteínas del operón *ars* de plásmidos bacterianos. La proteína membranal *ArsB* expulsa los iones arsenito (AsO_2^-) empleando la energía del potencial de membrana (*S. aureus*) o de la ATPasa *ArsA* (*E. coli*). El arsenato (AsO_4^{3-}) es transformado a arsenito por la reductasa *ArsC*. Modificado de Cervantes et al. (1994)

Resistencia bacteriana a los metales pesados

más adelante, la resistencia a Cd conferida por plásmidos también se basa en un mecanismo de expulsión por una ATPasa, pero no existe homología entre esta enzima que elimina cationes y la ATPasa ArsA que expulsa arsenito (Silver *et al.*, 1989).

El gen *arsB* de *S. aureus* codifica una proteína muy hidrofóbica que es 58% idéntica a la proteína ArsB de *E. coli* (Ji y Silver, 1992a); la homología entre ambas proteínas es uniforme a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos. En *S. aureus*, sólo es necesaria la proteína ArsB para la resistencia al As y para la expulsión del arsenito, sin requerir de ATPasa (cuyo gen no se encuentra en el operón *ars* de los estafilococos), en este caso, el potencial de membrana proporciona la energía para la expulsión (Ji y Silver, 1992a; Broer *et al.*, 1993) (figura 3.2).

El último gen del operón, *arsC*, codifica en ambas bacterias una proteína soluble (de 141 aminoácidos en *E. coli* y de 131 en *S. aureus*), que es una arsenato reductasa capaz de transformar el arsenato intracelular a arsenito, el cual se expulsa entonces de las células por la bomba aniónica (Ji y Silver, 1992b) (figura 3.2). Al contrario de lo que sucede con la arsenato oxidasa, la reductasa convierte un ion relativamente poco tóxico (arsenato) a una forma mucho más tóxica (arsenito); sin embargo, la rápida expulsión del arsenito por la ATPasa, impide que aumente a valores dañinos su concentración citoplásmica.

Genes cromosómicos que confieren resistencia a As fueron identificados en *E. coli*. Estos genes fueron denominados *arsA*, *B* y *C* por su similitud con sus homólogos en el plásmido A773 y confieren un nivel bajo de resistencia a As (Carin *et al.*, 1995; Diario *et al.*, 1995). Secuencias similares han sido localizadas en el cromosoma de otras especies bacterianas (Takemaru *et al.*, 1995; Mizuno *et al.*, 1996; Esquivel *et al.*, en preparación).

Cadmio (Cd)

En *S. aureus*, el Cd penetra a la célula por la vía de transporte del ion esencial manganeso, mientras que en *E. coli* lo hace por el sistema de transporte del Zn. En bacterias gramopositivas y gramnegativas existen sistemas de resistencia al Cd codificados por plásmidos que se han estudiado con detalle (Ji y Silver, 1995). En tanto que para el Hg hay un solo mecanismo bacteriano de resistencia (ver más adelante), son diversos los mecanismos bioquímicos de resistencia a Cd.

El sistema plásmidico más conocido es el del operón *cadA* de *S. aureus* (Nucifora *et al.*, 1989). La resistencia a Cd en estas bacterias gramopositivas resulta de la expulsión del Cd por CadA, una ATPasa del tipo P codificada por el plásmido (Nucifora *et al.*, 1989; Silver *et al.*, 1989). Esta proteína muestra homología significativa con otras ATPasas del tipo P, tanto bacterianas como de organismos superiores. La enzima CadA consta de 6 a 8 dominios transmembranales que funcionan como un poro para la expulsión del Cd (Silver y Woldemark, 1992) (figura 3.3). La ATPasa posee además regiones Cis-X-X-Cis en el extremo amino que probablemente participan en la unión del metal (Soloz y Vulp, 1990).

Las bacterias gramnegativas tienen diferentes mecanismos de resistencia al Cd. El plásmido pGU100, de un aislado de *Pseudomonas putida* a partir del suelo, confiere la resistencia por un mecanismo que implica una captación disminuida, aparentemente debido a la expulsión acelerada del Cd (Heritsu *et al.*, 1985).

Un tipo diferente de resistencia a Cd se encontró en *Alicycigenes eutrophus* CH34, la cual posee el operón *czc* en el plásmido pMOL30. Este operón *czc* confiere resistencia a la vez al Cd, Zn y Co (Nies *et al.*, 1989; Diels *et al.*, 1995) y consta de

Contaminación ambiental por metales pesados

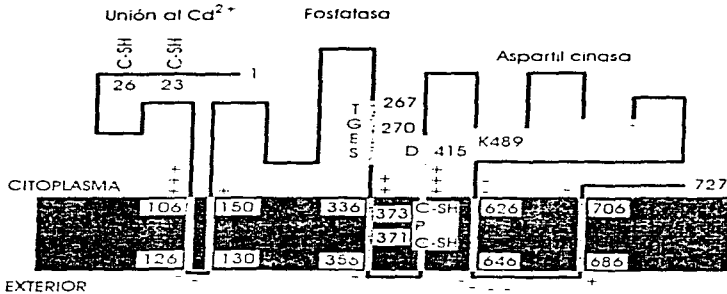


Figura 3.3. Membrana de la *E. coli* que expulsa Ca^{2+} (Stein, 1980). Se muestran los distintos regiones y divisiones de la proteína a las que se han asignado funciones específicas. El papel de algunas regiones de esta proteína (como las cisteínas, SH) no está identificada por ahora, a lo que se refiere a las abreviaturas: C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; G, glicina; K, lisina; P, prolina; S, serina; T, treonina. Tomado de Silver y Waldemarug (1992).

tres genes estructurales, *czcCBA*, que se han estudiado con detalle, y uno o más genes reguladores, de los cuales se conoce poco (Nies, 1992; Diels et al., 1995). Las proteínas que participan en la expulsión de los cationes son: el transportador de la membrana interna, CzcA, la proteína de la membrana externa CzcC y un polipeptido que atraviesa las dos membranas, CzcB (figura 3.4), que en el modelo actual funciona como un puente que asegura que los cationes sean expulsados al exterior de la célula y no sólo al espacio periplásmico, dando lugar a ser capturados por los sistemas de transporte de cationes divalentes fisiológicos (Diels et al., 1995). Aunque no se tienen datos directos acerca de la localización celular de estas proteínas, se ha establecido que la expulsión del Cd ocurre por un sistema antiportador cation/protonas (Nies, 1995; Nies y Silver, 1995). El gen *czcD* localizado antes de los genes estructurales *czcCBA* junto con otros gen(es) regulador(es) (Nies, 1992; Nies y Silver, 1995; Diels et al., 1995) controla el funcionamiento del sistema Czc de manera aún desconocida.

Otro mecanismo de resistencia bacteriana al Cd, no conferido por plásmidos, se basa en la síntesis de proteínas ricas en cisteína capaces de captar Cd, que se han encontrado en *P. putida* (Higham et al., 1984). Estas proteínas, similares a las metalotioninas presentes en células animales (ver capítulo 2), son capaces también de capturar iones, disminuyendo así su efecto tóxico.

Cobalto, níquel y zinc (Co, Ni y Zn)

La mayoría de las especies bacterianas requiere de los iones metálicos Co, Ni y Zn como micronutrientes esenciales, sin embargo, concentraciones elevadas de estos

Resistencia bacteriana a los metales pesados

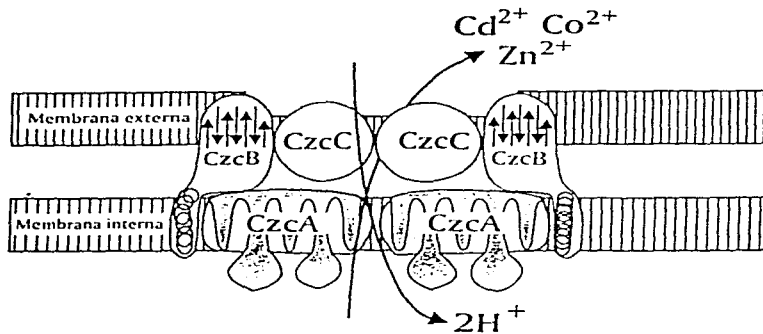


Figura 3.4. Modelo del sistema Czc de *Alcaligenes eutrophus* para la expulsión de Co, Zn y Cd. El mecanismo consiste de un antiportador proton/cation formado por proteínas de las membranas interna (CzcA) y externa (CzcC) y de una proteína transmembranal (CzcB), que funcionan como dímeros. Tomado de Cervantes y Silver (1996)

metales ejercen efectos tóxicos sobre los microorganismos. Estos iones se incorporan al citoplasma bacteriano mediante sistemas específicos de captación o bien por las vías de transporte del Mg (Nies y Silver, 1989). Los determinantes de resistencia más estudiados son los de los plásmidos de *A. eutrophus* CH34, ya mencionados. Esta cepa contiene dos plásmidos pMOL28, que confiere resistencia al Ni y a Co, y pMOL30 con resistencias al Zn, Cd y Co (Mergéay et al., 1985). Las células resistentes, inducidas en presencia de estos metales, expulsan del citoplasma cualquiera de los cationes mencionados por un mecanismo similar al utilizado, para el Cd (Nies et al., 1989). Un determinante cromosómico que confiere resistencia a Ni fue descrito en una cepa de *Halobacterium* (Stappal et al., 1995). Beard et al., (1997) identificaron un ATPasa, codificada por el cromosoma de *E. coli*, que participa en la expulsión del Zn.

Cobre (Cu)

En virtud de la función biológica dual del Cu, como un metal esencial y tóxico a la vez, las bacterias deben poseer delicados mecanismos para conservar el Cu intracelular a valores tales que no interfieran con la homeostasis del metal, ni que representen un riesgo de toxicidad (Cervantes y Gutiérrez-Corona, 1994). Las concentraciones elevadas de Cu ejercen una presión selectiva sobre los microorganismos, que puede resultar en la aparición de variantes que tengan determinantes genéticos de resistencia al metal. Los genes relacionados con el metabolismo del Cu residen en el cromosoma mientras que los genes de resistencia a este elemento se localizan en plásmidos (Rouch et al., 1989).

Contaminación ambiental por metales pesados

Lee et al. (1990) aislaron mutantes de *E. coli* alterados en el transporte de Cu e identificaron dos sistemas de captación de Cu, designados CutA y CutB. También se describieron dos proteínas que participan en el almacenamiento y/o el transporte del Cu (CutE y CutF) (Lee et al., 1990) y que tal vez originan la protección de las células bacterianas a la toxicidad del Cu(I), y transportan el metal a los sitios de síntesis de las proteínas que contienen Cu (Brown et al., 1994) (figura 3.5). A los genes estructurales *cutC* y *cutD* se les ha asignado una función en la expulsión del Cu. Las proteínas CutC y CutD son probablemente ATPasas que expulsan Cu (Brown et al., 1994) (figura 3.5).

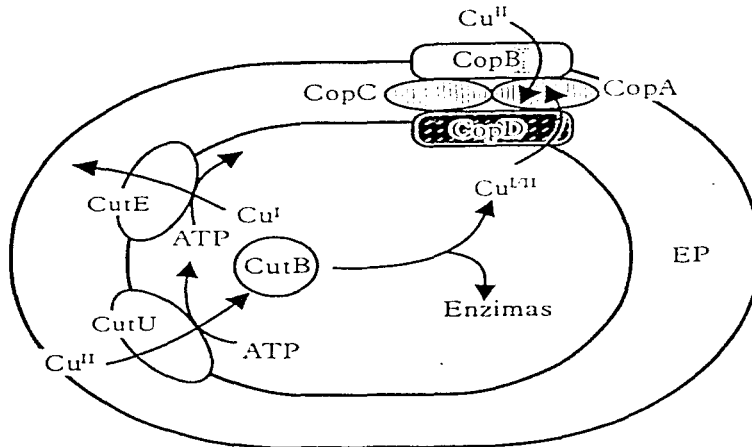


Figura 3.5. Transporte y acumulación de Cu en *Pseudomonas*. Modelo hipotético de la captación (CutU) y expulsión (CutE) por ATPasas tipo P según resultados de Solioz y Odermatt (1995) en *Enterococcus hirae* y datos más limitados en otras bacterias. También se muestran CutB, propuesta como una proteína que une Cu (Brown et al., 1994), y CopABC, los productos del sistema plasmídico de resistencia a Cu de *P. syringae* (Cooksey, 1994).

El transporte y la resistencia al Cu en las bacterias se han relacionado con ATPasas del tipo P (ya mencionados para la resistencia al Cd) (Silver et al., 1993b). Estos enzimas constituyen una familia de proteínas membranales capaces de translo-

Resistencia bacteriana a los metales pesados

car cationes y se han ubicado, tanto en procariontes como en eucariontes, mostrando una conservación significativa de sus secuencias de aminoácidos (Silver *et al.*, 1993b). Odermatt *et al.* (1993) identificaron en una cepa de la bacteria grampositiva *Enterococcus hirae* los genes para dos ATPosas del tipo *P. copA* y *copB*, la alteración de cualquiera de estos genes produce sensibilidad al Cu, sugiriendo que codifican para ATPosas que expulsan el metal. Enzimas similares fueron localizados en la bacteria gramnegativa *Helicobacter pylori* (Ge *et al.*, 1995).

Las bacterias reductoras de sulfato, *Desulfovibrio* spp., toleran elevadas concentraciones de Cu al producir sulfuro que forma complejos con el metal (Temple y LeRoux, 1984). Se ha demostrado que las cepas capsuladas de *Klebsiella aerogenes* toleran mayores concentraciones de Cu que las variantes no capsuladas (Bilton y Freihofer, 1978), se considera que los polisacáridos capsulares secuestran los iones tóxicos.

En cianobacterias se ha comunicado de la acumulación intracelular del Cu por una proteína similar a las metalotioninas (MT, mencionadas antes para la resistencia a Cd, ver capítulo 2). Los genes de una MT del cromosoma de la cianobacteria *Synechococcus* se clonaron (Huckle *et al.*, 1993) y se encontró que varios iones (notablemente Zn, Cu y Cd) estimulan específicamente la transcripción del determinante de la MT. Harwood-Sears y Gordon (1990) han demostrado que la bacteria marina *Vibrio alginolyticus* sintetiza proteínas extracelulares que unen Cu en respuesta a la exposición al metal, se propuso la quelación del Cu como el mecanismo de detoxificación de los iones cupricos. La resistencia plasmídica al Cu se ha encontrado en diversas especies de bacterias gramnegativas y dos determinantes de resistencia (*cop* y *pro*) se han estudiado a nivel molecular.

Al amplio uso de soluciones de Cu para controlar enfermedades microbianas en vegetales, se la considera como el factor selectivo para la aparición de resistencia al Cu en bacterias relacionados con plantas. El primer determinante bacteriano de resistencia al Cu estudiado, se originó de un plásmido identificado en una cepa del patógeno del tomate, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Berider y Cooksey, 1986). Este plásmido, denominado pPT23, confiere resistencia inducible a Cu y se encuentra conservado de manera amplia entre cepas de *P. syringae* (Cooksey, 1990) y en otras *Pseudomonas* (Vargas *et al.*, 1995). El determinante de resistencia a Cu de pPT23, denominado *cop*, se ha clonado y determinado su secuencia de nucleótidos (Mellano y Cooksey, 1988). Cha y Cooksey (1991) expresaron el operón *cop* y encontraron que *CopA* y *CopC* son proteínas periplásmicas capaces de unir 11 y 1 átomos de Cu por polipeptido, respectivamente. *CopB* es una proteína de la membrana externa también capaz de unir al Cu (Cha y Cooksey, 1991) y que puede estar implicado en el transporte de Cu (figura 3.5). La quelación del Cu es la base del mecanismo de resistencia al Cu en las bacterias relacionadas con plantas (Cha y Cooksey, 1991).

El plásmido pRJ1004, que confiere resistencia al Cu, se identificó en una cepa de *E. coli* aislada del drenaje de una zafra donde se empleaba sulfato de Cu como complemento alimenticio (y que posiblemente actuó como agente selectivo; Tetaz y Luke, 1983). Luego se encontró que es inducible la resistencia a Cu conferida por el plásmido pRJ1004 y que se debe a una captación disminuida del metal (Rouch *et al.*, 1985). Lee *et al.* (1995) clonaron el determinante *pro* del plásmido pRJ1004. El sistema *pro* es el equivalente en *E. coli* del sistema *cop* de *Pseudomonas*; los genes se encuentran en el mismo orden: *proABCDASE* (Lee *et al.*, 1995) (figura 3.6) y son casi del mismo tamaño. Los productos génicos de *pro* presentan homología significativa

Contaminación ambiental por metales pesados

con los del operón *cop*, pero, sorprendentemente, el sistema de *E. coli* parece conferir resistencia a Cu por un mecanismo de expulsión de los iones cúpricos (Silver et al., 1993b, Brown et al., 1994) y no mediante su acumulación. La similitud en la secuencia de aminoácidos de los pares proteicos homólogos es: CopF/PcoA, 75%, CopB/PcoB, 54%, CopC/PcoC, 60%, y CopD/PcoD, 58% (Silver et al., 1993b) (figura 3.6).

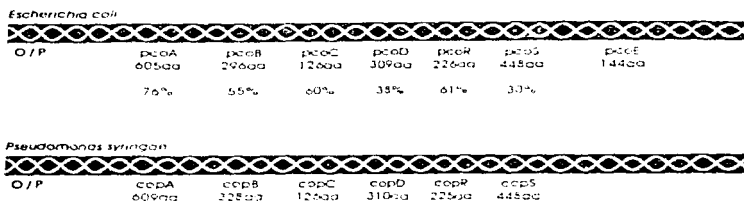


Figura 3.6. Comparación de los genes de los operones *cop* de *Escherichia coli* y *cop* de *Pseudomonas syringae*. Se muestran los genes en el orden de transcripción, los tamaños de sus productos (aa) de aminoácidos, (aa) y el porcentaje de homología de las secuencias de aa. O/P: operador/promotor. Adaptada de Brown et al., 1994.

La proteína PcoA conserva el dominio potencial de unión al Cu de CopB, por lo que podría funcionar como una proteína que une al metal; la proteína PcoB no retiene los sitios de unión al Cu y tendría una función no relacionada con la unión al metal (Brown et al., 1994). El dominio de unión al Cu de la proteína PcoC es similar al de CopB, sugiriendo una función en la unión del Cu para PcoC. El análisis de las secuencias de nucleótidos ha mostrado que PcoD tiene segmentos transmembranales potenciales y residuos de metionina e histidina localizados en la cara externa de la membrana interna, que también existen en CopD (Brown et al., 1994).

Recientemente se encontró que cepas de *Pseudomonas* aisladas de zonas contaminadas con metales pesados en el centro de México, y seleccionadas por poseer resistencia inducible a Cu, muestran homología con el determinante *cop* en el DNA cromosómico (Vargas et al., 1995). Más aun, las cepas estándar de *P. aeruginosa* derivadas de la PAO, presentaron también un nivel moderado de resistencia inducible a Cu e hibridaron a baja especificidad con los genes *cop* (Vargas et al., 1995).

Cromo (Cr)

El cromato penetra fácilmente las membranas biológicas y puede funcionar como un análogo del sulfato debido a su similitud química. Se ha demostrado en *Pseudomonas*, que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato (Ohtake et al., 1987). Una vez en el citoplasma, el Cr(VI) es reducido a Cr(III), que interactúa con el DNA ejerciendo sus efectos tóxicos. En contraste, el Cr(III) extracelular no sólo es una sustancia relativamente inocua (en parte porque las membranas

Resistencia bacteriana a los metales pesados

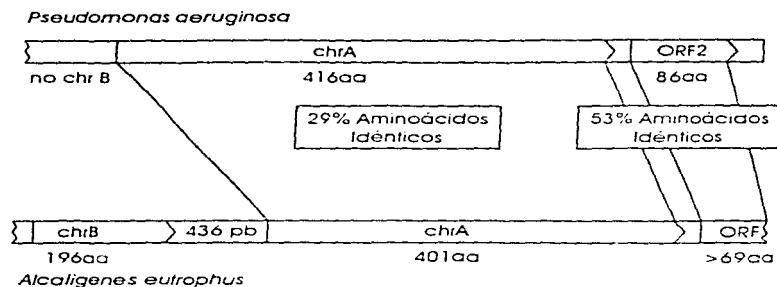


Figura 3.7. Comparación de los genes de resistencia a cromato de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes eutrophus*. Se muestran los genes en el orden de transcripción, los tamaños de sus productos (no de aminoácidos, aa) y el porcentaje de homología de las secuencias de aa. Tomado de Cervantes y Silver (1992).

biológicas son impermeables al Cr trivalente), sino que se la considera como un micronutriente esencial (Offenbacher y Pi-Sunyer, 1958).

La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, pero puede seleccionar variantes resistentes al ion. La resistencia bacteriana al cromato puede deberse a mutaciones cromosómicas (que afectan por lo general al transporte de sulfato) o a la presencia de plásmidos. Ha quedado establecido que: la resistencia al cromato se basa en una acumulación reducida del ion por parte de las células resistentes (Ohtake et al., 1987; Cervantes y Ohtake, 1988).

Los determinantes de resistencia de plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes et al., 1990) y *Alcaligenes eutrophus* (Nies et al., 1990) se han clonado y secuenciado (figura 3.7). La expresión de los determinantes de resistencia permitió identificar una proteína de la membrana, denominada ChrA, que se dice origina la translocación de los iones cromato (Cervantes y Silver, 1992). La proteína ChrA de *Pseudomonas* mostró un 29% de aminoácidos idénticos con respecto a la proteína de *Alcaligenes* (Nies et al., 1990).

La reducción del Cr(VI) por las bacterias puede considerarse como un mecanismo cromosómico de resistencia al cromato y parece ser una reacción secundaria de una vía metabólica aún desconocida (Ishibashi et al., 1990). En numerosas especies bacterianas se ha identificado la capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Cervantes y Silver, 1992). Se han caracterizado y purificado reductasas de cromato, solubles y dependientes de NAD(P)H en *P. putida* (Ishibashi et al., 1990), *P. ambigua* (Suzuki et al., 1992) y *Bacillus sp.* (Compos et al., 1995, 1997). Reductasas diferentes, unidas a la

Contaminación ambiental por metales pesados

membrana, se identificaron en *P. fluorescens* (Bopp y Ehrlich, 1988) y en *Enterobacter cloacae* (Wang et al., 1989). La reducción biológica de Cr(VI) a Cr(III) representa un proceso de detoxificación potencialmente útil para la recuperación de aguas residuales y otros desechos contaminados con cromato (Cervantes y Silver, 1992; Ontake y Silver, 1994) (ver capítulo 7).

Mercurio (Hg)

De los mecanismos de resistencia bacteriana a los iones inorgánicos, el más estudiado es el de Hg. La resistencia se debe a la reducción del mercurio inorgánico (Hg^{2+}) a la forma metálica, menos tóxica y volátil, Hg^0 . Esta transformación constituye un eficiente proceso mediante el cual los microorganismos se deshacen del ion tóxico (Summers y Silver, 1978).

Se han clonado y secuenciado los genes plasmídicos que confieren resistencia al Hg de muy diversas fuentes, incluyendo los dos primeros obtenidos del transposón Tn501 de *Pseudomonas* y del plásmido R100 (que contiene el transposón Tn21) de *Shigella* (Brown et al., 1986). Todos los sistemas bacterianos estudiados emplean un mismo mecanismo de resistencia: la reducción enzimática del Hg^{2+} a Hg^0 por la reductasa mercurica codificada por el gen *merA*. Todos los sistemas de resistencia también codifican proteínas que transportan específicamente al Hg hacia el citoplasma bacteriano, donde se encuentra la reductasa (Silver y Waldermayr, 1992).

Los determinantes *mer* inician con un gen regulador, *merR*, que es transcrito a partir de la cadena opuesta con respecto a los demás genes *mer*. La proteína MerR se une como un homodímero al sitio adyacente operador/promotor del operón *mer* (Summers, 1992), funcionando tanto como un represor (en ausencia de Hg) como en forma de inductor (en presencia de Hg). En los determinantes *mer*, la región operador/promotor es seguida por los genes implicados en el transporte del Hg al interior de las células. En el caso del transposón Tn501 y del plásmido pDU1358, estos genes son *merT* y *merP*, que originan una proteína de la membrana interna y una proteína periplásmica que une mercurio, respectivamente (figura 3.8).

A continuación se encuentra el gen *merA* que codifica la reductasa mercurica (figura 3.8), una enzima homodimérica que contiene FAD y que es dependiente de NADPH. El funcionamiento del sistema es simple: un par de cisteínas de la proteína periplásmica MerP atrapa el Hg^{2+} del exterior y lo transfiere a otro par de cisteínas de la proteína membranar MerT, esta le pasa a las cisteínas de la reductasa que, a su vez, lo transfieren finalmente al sitio activo de la enzima (figura 3.8). En este modelo, el Hg^{2+} intracelular nunca se encuentra libre, sino que es transferido de un par de cisteínas a otro, protegiendo así el ambiente citoplásmico de la toxicidad del ion.

El plásmido pDU1358 contiene el gen *merB* que codifica para una enzima liasa organomercurial (que amplía el espectro de resistencia de Hg inorgánico a compuestos organomercuriales). La liasa rompe el enlace entre el carbono y el Hg del organomercurial, liberando el Hg iónico, que luego se detoxifica por la reductasa. Se considera que los genes *merB* son comunes, ya que se ha encontrado actividad de la liasa organomercurial en más de la mitad de los determinantes *mer* de las *Pseudomonas* analizadas inicialmente (Clark et al., 1977).

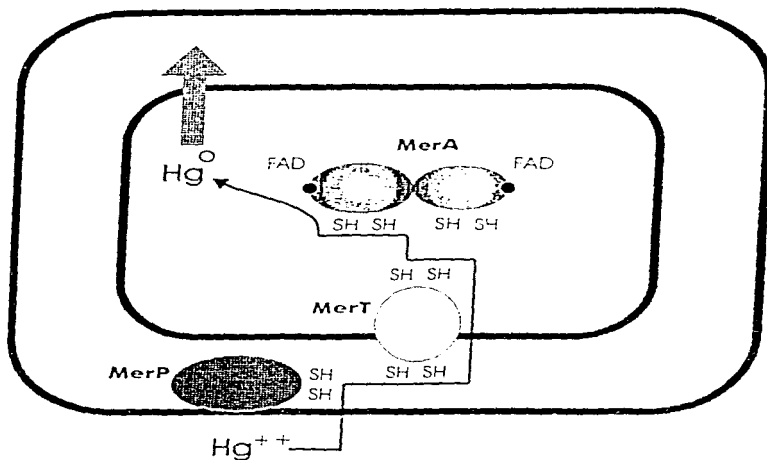


Figura 3.8. Mecanismo de resistencia bacteriana a Hg. El esquema muestra una célula bacteriana que posee los productos de los genes *mer*, los cuales contienen grupos sulfhidrilo que captan al Hg . La proteína MerP del espacio periplásmico transporta inicialmente al ion mercurio al citoplasma, donde MerT lo une y lo lleva a la reductasa MerA que, finalmente, lo convierte en Hg metálico, forma volátil e inerte.

Plata (Ag)

Dado que tanto las bacterias sensibles como las resistentes son capaces de reducir la Ag iónica (Ag^+) a la forma metálica menos tóxica, Ag^0 , se ha descartado a la reducción como el mecanismo de resistencia plasmídico. Aunque se ha informado de resistencia a la plata conferida por plásmidos en diversas especies bacterianas (Summers et al., 1978; Silver, 1981; Hoefeli et al., 1984), en ningún caso se conoce su mecanismo. Belly y Kydd (1982) describieron un aislado de *Pseudomonas* resistente a Ag, sugiriendo que detoxificaba el ion por reducción a Ag^0 o mediante su unión a componentes celulares. Sin embargo, no se ha comunicado de las bases genéticas de la resistencia. Se localizó un sistema de resistencia a Ag en el plásmido *pHK1* de una cepa de *P. stutzeri* aislada de una mina de Ag. Slawson et al. (1992a) estudiaron la resistencia y la captación de Ag en cepas que poseían *pHK1*, pero no lograron comprender el mecanismo de resistencia. Silver (1981) informó que la resistencia a Ag en una cepa de *E. coli* con un plásmido (aislado originalmente de *Citrobacter*), podría

Contaminación ambiental por metales pesados

deberse a una baja extracción de los iones tóxicos Ag^+ de AgCl del medio por las células resistentes, en comparación con la avidéz con la que las bacterias sensibles, carentes del plásmido, extraen los iones tóxicos.

Deshpande y Chopade (1994) describieron un determinante de resistencia a Ag^+ de un plásmido de *Acinetobacter baumannii* que puede tener como base la expulsión de la Ag^+ de las células resistentes. Otro sistema de expulsión de Ag^+ en este caso codificado por genes cromosómicos, se ha identificado en la bacteria grampositiva *Enterococcus hirae* cuantificando la captación de Ag^+ en vesículas membranales (Soliöz y Odematt, 1995). Éste es el conocimiento más avanzado acerca de un sistema bacteriano de transporte de Ag^+ . El gen que controla la expulsión de la Ag^+ codifica una ATPasa del tipo P, que también expulsa Cu^+ y da origen a una resistencia moderada a ambos cationes. Esta ATPasa cromosómica muestra una gran similitud con la ATPasa que expulsa Cd codificada por plásmidos en otras bacterias grampositivas. También existe evidencia de una interacción de los sistemas de transporte de Ag^+ y de Cu^+ en bacterias gramnegativas (Ghandour et al., 1988). Un operón multicéntrico, denominado *si*, fue recientemente secuenciado de un plásmido de *E. coli* (S. Silver, comunicación personal). Los datos preliminares sugieren que se trata de un sistema de resistencia basado en ATPasas que expulsan los iones tóxicos Ag^+ del citoplasma.

Otros sistemas de tolerancia a metales

Se ha informado de la resistencia a otros metales menos estudiados en diversas especies bacterianas, incluyendo la tolerancia al boro (Summers y Jacoby, 1978), germanio (Slawson et al., 1992b), galio (Al-Roukayy et al., 1992), estaño (Miller et al., 1995), plomo (Diels et al., 1995), talio (Diels et al., 1995) y tungsteno (Premakumar et al., 1996). Es muy claro que además de los sistemas de resistencia determinados por los plásmidos y comprendidos con detalle, existen interesantes ejemplos adicionales de tolerancia a metales para los que no se tienen actualmente evidencias suficientes que permitan conocer los mecanismos de resistencia involucrados.

Agradecimientos

Para la elaboración de este capítulo se recibió apoyo de la Coordinación de Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de CONACYT (donativo 0945-P).

Bibliografía

- Al-Roukayy A, Appanna V, Falter H (1992) Gallium toxicity and adaption in *Pseudomonas fluorescens* FEMS Microbiol Lett 92265-272.
- Anderson GL, Williams J, Hillis R (1992) The purification and characterization of arsenite oxidase from *Piscibacterium foveolus*, a molybdenum-containing hydroxylase. J. Biol. Chem. 267, 23674-23682.
- Appanna VD, Kepes M, Racion P (1994). Aluminum tolerance in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525: Involvement of a gelatinous lipid-rich residue. FEMS Microbiol. Lett. 119, 295-302.
- Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernández J, Hugues MN, Poole RK (1997) Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *ZntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. Molec. Microbiol. 25, 883-891.

Resistencia bacteriana a los metales pesados

- Belly RT, Kydd GC (1982). Silver resistance in microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 567-577
- Bender CL, Cooksey DA (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* 165, 534-541
- Bitton G, Freilhofer V (1978). Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.* 4, 119-125
- Bopp LH, Ehrlich HL (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* B300. *Arch. Microbiol.* 150, 426-431
- Broer S, Ji G, Broer A, Silver S (1993). Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 175, 3840-3845
- Brown NL, Barret SR, Camakaris I, Lee BT, Rouch DA (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pcr*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Molec. Microbiol.* 17, 1153-1166
- Brown NL, Lee BT, Silver S (1994). Bacterial transport of and resistance to copper. p. 405-435. En: H. Sigel (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 30. Marcel Dekker, Nueva York
- Brown NL, Misra TK, Winnie JN, Schmidt A, Seiff M, Silver S (1986). The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.* 202, 143-151
- Campos J, Martínez-Cadena G, Álvarez-González R, Cervantes C (1997). Purification and partial characterization of a chromate reductase from *Bacillus*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 39, 73-81
- Campos J, Martínez-Pacheco M, Cervantes C (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. Strain Antonie van Leeuwenhoek 68, 203-208
- Carlin A, Shi W, Dey S, Rosen BP (1995). The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177, 981-986
- Cervantes C, Chávez J (1992). Plasmid-determined resistance to arsenic and antimony in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 61, 333-337
- Cervantes C, Chávez J, Vaca S (1991). Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 33, 61-70
- Cervantes C, Gutiérrez-Corona F (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 121-138
- Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, Silver S (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 355-357
- Cervantes C, Ohtake H (1988). Plasmid-determined chromate resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 173-176
- Cervantes C, Ohtake H, Chu L, Misra TK, Silver S (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172, 287-291
- Cervantes C, Silver S (1992). Bacterial chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27, 65-71
- Cha J-S, Cooksey DA (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8915-8919

Contaminación ambiental por metales pesados

- Chen C, Misra TK, Silver S, Rosen BP (1986) Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump: the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261, 15030-15038
- Clark D, Weiss AF, Silver S (1977) Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 132, 186-196
- Cooksey DA (1990). Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 201-219
- Cooksey DA (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 381-386.
- Cooksey DA, Azad HR (1992) Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 274-278
- Craig PJ (1989) Biological and environmental methylation of metals, p. 437-463 En: F.R. Hartley (Ed.) *The Chemistry of the Metal-Carbon Bond*, Vol. 5. John Wiley and Sons, Londres.
- Deshpande UM, Chopade BA (1994) Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *BioMetals* 7, 49-56
- Diels L, Dong Q, van der Lelie D, Baeyens W, Mergaey M (1995) The *ccr* operon of *Alicycobaculum putrophys* CH34: from resistance mechanism to removal of heavy metal. *J. Indust. Microbiol.* 14, 142-153
- Diano C, Cai J, Marmor J, Shindler R, Dubow MS (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2050-2056
- Garcidueñas-Piña R, Cervantes C (1996). Microbial interactions with aluminium. *BioMetals* 9, 311-316
- Ge Z, Hidratsuka K, Taylor DE (1995) Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. *Molec. Microbiol.* 15, 97-106
- Ghandour WJ, Hubbard JA, Deistung JA, Hughes MN, Poole RK (1988) The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: toxic effects and interactions with copper ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 559-565
- Guida L, Sardi Z, Hughes MN, Poole RK (1991) Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli* Finc. *Microbiol.* 156, 507-512
- Haefeli C, Franklin C, Hardy K (1984) Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158, 389-392
- Harwood-Sears V, Gordon AS (1990). Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1327-1332
- Higham DP, Sadler PJ, Scowen MD (1984) Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* 225, 1043-1046
- Hontsu H, Yamamoto K, Wachi S, Kawai K, Fukuchi A (1986) Plasmid-determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GRM-1 isolated from soil. *J. Bacteriol.* 165, 334-335
- Huckle JW, Morby AP, Turner JS, Robinson NJ (1993). Isolation of a prokaryotic metallothionein and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Molec. Microbiol.* 7, 177-187.
- Husaini Y, Rai LC (1992). pH dependent aluminium toxicity to *Nostoc linckia*: Studies on phosphate uptake, alkaline and acid phosphatase activity, ATP content, photosynthesis and carbon fixation. *J. Plant Physiol.* 139, 703-707.

Resistencia bacteriana a los metales pesados

- Ishibashi Y, Cervantes C, Silver S (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2268-2270
- Ji G, Silver S (1992a). Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 174, 3684-3694.
- Ji G, Silver S (1992b). Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7974-7978.
- Ji G, Silver S (1995). Plasmid resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Indust. Microbiol.* 14, 61-75.
- Johnson AC, Wood M (1990). DNA, a possible site of action of aluminum in *Arizabium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3629-3633.
- Lee BTO, Brown NL, Rogers S, Bergemann A, Camchakis J, Rauch D (1990). Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. *NATO ASI Ser. G* 23, 625-632.
- Mallano MA, Cooksey DA (1988). Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 170, 2870-2883.
- Mergeay M, Nies D, Schlögel HG, Gerts J, Charles P, von Gijsegem F (1985). *Alicigenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162, 328-334.
- Miller CE, Wuerzt S, Cooney J, Pfister RM (1995). Plasmids in tributyltin-resistant bacteria from fresh and estuarine waters. *J. Indust. Microbiol.* 14, 337-342.
- Mizuno M, Masuda S, Takemaru K, Hosono S, Sato T, Takeuchi M, Kobayashi Y (1996). Systematic sequencing of the 283 kb 210⁺-232⁺ region of the *Bacillus subtilis* genome containing the skin element and many sporulation genes. *Microbiology* 142, 3103-3111.
- Newman DK, Beveridge TJ, Morel FMM (1997). Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2022-2028.
- Nies DH (1992). CzcA and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (ztc system), in *Alicigenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 174, 8102-8110.
- Nies DH (1995). The cobalt, zinc, and cadmium efflux system from *Alicigenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 2707-2712.
- Nies DH, Nies A, Chu L, Silver S (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alicigenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7351-7355.
- Nies A, Nies DH, Silver S (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alicigenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265, 5648-5653.
- Nies DH, Silver S (1989). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alicigenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171, 896-900.
- Nies DH, Silver S (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Indust. Microbiol.* 14, 185-199.
- Novick RP, Roth C (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 95, 1335-1342.
- Nucifora G, Chu L, Silver S (1989). Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *codA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3544-3548.

Contaminación ambiental por metales pesados

- Odermatt A, Suter H, Kropf R, Solioz M (1993). Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae* J. Biol. Chem. 268, 12775-12779.
- Offenbacher EG, Pi-Sunyer FX (1988) Chromium in human nutrition. Annu. Rev. Nutr. 8, 543-563.
- Ohtake H, Cervantes C, Silver S (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. Bacteriol. 169, 3853-3856.
- Ohtake H, Silver S (1994). Bacterial reduction of toxic hexavalent chromium, p. 403-415. En: G.R. Chaudry (éd.) Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Dioscorides Press, Portland.
- Pettersson A, Hailbom L, Bergman B (1983). Aluminium uptake by *Anabaena cylindrica* J. Gen. Microbiol. 132, 1771-1774.
- Premakumar R, Jacobitz S, Rickle SC, Bishop AE (1996) Phenotypic characterization of a tungsten-tolerant mutant of *Azotobacter vinelandii* J. Bacteriol. 178, 691-696.
- Richardson AE, Simpson RJ, Djordjevic MA, Rolfe BJ (1988) Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* by *trifolium* is affected by low pH and by Ca and Al ions. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2541-2548.
- Rosen BP, Weigel U, Harkness C, Gangula P (1988). Molecular characterization of an anion pump. The ArsA gene product is an arsenite (antimonite)-stimulated ATPase. J. Biol. Chem. 263, 3057-3070.
- Rosenberg H (1987). Phosphate transport in prokaryotes, p. 205-248. En: B. P. Rosen y S. Silver (Eds.) Ion Transport in Prokaryotes. Academic Press, San Diego.
- Rosenstein R, Peschel A, Wieland B, Gatz F (1992). Expression and regulation of the antimite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosum* plasmid pSX267. J. Bacteriol. 174, 3676-3683.
- Rouch D, Camakaris J, Lee BTO, Luke RJK (1985). Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli* J. Gen. Microbiol. 131, 939-943.
- Rouch D, Lee BTO, Camakaris J (1989). Genetic and molecular basis of copper resistance in *Escherichia coli*, p. 439-446. En: D.H. Hamer y D.R. Winge (Eds.) Metal Ion Homeostasis. Molecular Biology and Chemistry. Alan R. Liss, Nueva York.
- Silver S (1981). Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances, p. 179-189. En: S.B. Levy, R.C. Clowes y E.L. Keonig (Eds.), Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids. Plenum Press, Nueva York.
- Silver S, Budd K, Leahy KVA, Snow WM, Hammond D, Novick RP, Willisky GR, Molamy MH, Rosenberg H (1981). Inducible-plasmid determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 146, 983-996.
- Silver S, Ji G, Brogar S, Dey S, Dou D, Rosen BP (1993a). Orphan enzyme or patriarch of a new tribe: the arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. Molec. Microbiol. 8, 637-642.
- Silver S, Lee BTO, Braoun NL, Cooksey DA (1993b). Bacterial plasmid resistances to copper, cadmium and zinc, p. 38-53. En: A.J. Welch y S.K. Chapman (Eds.) The Chemistry of the Copper and Zinc Triads. Royal Society of Chemistry, Londres.
- Silver S, Nucifora G, Chu L, Misra TK (1989). Bacterial resistance ATPases: Primary pumps for exporting toxic cations and anions. Trends Biochem. Sci. 14, 76-80.

Resistencia bacteriana a los metales pesados

- Silver S, Wolderhaug M (1992). Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* 56, 1-33.
- Slawson RM, Trevors JT, Lee H (1992a). Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri* Fitch. *Microbiol.* 158, 398-404.
- Slawson RM, van Dyke MI, Lee H, Trevors JT (1992b). Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 27, 72-79.
- Soloz M, Odermatt A (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 9217-9221.
- Soloz M, Vulpe C (1996). Cpx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* 21, 237-241.
- Stapel R, Meyer M, Schlegel HG (1995). The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Mitobisella oxytoca*: conjugational transfer, expression regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. *BioMetals* 8, 70-79.
- Summers AO (1992). Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 174, 3097-3101.
- Summers AO, Jacoby GA, Swartz MN, McHugh G, Sutron L (1978). Metal cation and oxyanion resistances in plasmids of Gram-negative bacteria, p. 128-131. En D. Schlessinger (ed.) *Microbiology-1978*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Summers AO, Silver S (1978). Microbial transformations of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 32 637-672.
- Suzuki T, Miyata N, Horitsu H, Hsuai K, Takamizawa K, Tai Y, Okazaki M (1992). NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174, 5340-5345.
- Takemaru KI, Mizuno M, Sato T, Takeuchi M, Kobayashi Y (1995). Complete nucleotide sequence of a skin element excised by DNA rearrangement during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 141, 323-327.
- Temple KL, LeRoux NLW (1964). Symbiosis of sulfida ares: sulfate-reducing bacteria and copper toxicity. *Econ. Ecol.* 59, 271-278.
- Tetaz TJ, Luke RKJ (1983). Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154, 1263-1268.
- Thiel T (1988). Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 170, 1143-1147.
- Tiso LS, Rosen BP (1989). Molecular characterization of an anion pump: the ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* 265, 190-194.
- Vargas E, Gutierrez S, Ambriz ME, Cervantes C (1995). Chromosome-encoded inducible copper resistance in *Pseudomonas* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 225-232.
- Wang PC, Mori T, Kamori K, Sasatsu K, Tada K, OnTake H (1989). Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1665-1669.
- Wu J, Rosen BP (1993). The *arsD* gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Molec. Microbiol.* 8, 615-623.
- Wu J, Tiso LS, Rosen BP (1992). Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 12570-125.

7.2.-SISTEMAS BACTERIANOS QUE EXPULSAN METALES TOXICOS

Los sistemas de resistencia bacteriana a metales pesados tóxicos pueden dividirse en cuatro grupos de mecanismos que incluyen: 1) la actividad de enzimas que convierten las formas tóxicas de los metales en especies químicas menos tóxicas; 2) el atrapamiento de los iones nocivos en la cubierta bacteriana o mediante componentes intracelulares; 3) la precipitación de los metales tóxicos por medio de sustancias extracelulares; y, 4) la expulsión de los metales del interior celular una vez que aquellos han ingresado al citoplasma. En los últimos años se ha establecido que las estrategias bacterianas más eficientes para resistir a los metales tóxicos son las que promueven la expulsión del ion metálico, disminuyendo su acumulación y reduciendo así su toxicidad. Las bacterias poseen en las membranas, además de las diversas vías de transporte para capturar los nutrientes inorgánicos, sistemas igualmente eficaces para expulsar iones inorgánicos tóxicos.

El ANEXO 4 muestra las propiedades generales de los sistemas bacterianos de expulsión.

ANEXO 4

SISTEMAS BACTERIANOS DE EXPULSIÓN DE METALES TÓXICOS

ERÉNDIRA VARGAS, ÁNGEL H. ÁLVAREZ Y CARLOS CERVANTES.

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas Universidad Michoacana; Morelia, Mich., 58030 México.

E-mail : Cvega@zeuz.ccu.umich.mx

ERÉNDIRA VARGAS, ÁNGEL H. ÁLVAREZ Y CARLOS CERVANTES *Sistemas Bacterianos de Expulsión de Metales Tóxicos Rev Lat Amer Microbiol* 40: 53-71, 1998.

ABSTRACT: Bacteria have developed diverse resistance strategies towards toxic metals with which they interact in the environment. The mechanisms of tolerance include extracellular precipitation, sequestration by cell envelopes, intracellular accumulation, redox transformations and membrane efflux systems. Genes responsible for these processes may be encoded by the chromosomes or by plasmids. Since some toxic metals are also essential micronutrients (i.e. copper, cobalt, zinc, nickel), bacteria must precisely adjust the functioning of uptake and efflux systems to maintain their adequate intracellular levels in the case of metals with no biological function (i.e. cadmium, silver). transport systems must be oriented only to the extrusion of the toxic ions. In the last few years, several bacterial systems devoted to the efflux of toxic metals were analyzed at the molecular level resulting in a detailed understanding of the biochemical mechanisms of resistance. Among these are the membrane pathways that extrude cations derived from copper, cadmium, zinc, nickel, cobalt and silver. Two general mechanisms have been found: those involving P-type ATPases, and some using proton antiporter systems.

Key words: toxic metals, efflux systems, plasmids

ERÉNDIRA VARGAS, ÁNGEL H. ÁLVAREZ Y CARLOS CERVANTES *Sistemas Bacterianos de Expulsión de Metales Tóxicos Rev Lat Amer Microbiol* 40: 53-71, 1998.

RESUMEN: Las bacterias han desarrollado diversas estrategias de resistencia a los metales tóxicos con los que interactúan en el ambiente. Los mecanismos de tolerancia incluyen precipitación extracelular, atrapamiento por las cubiertas celulares, acumulación intracelular, transformaciones redox o sistemas membranales de expulsión. Los genes responsables de estos procesos pueden estar localizados en el cromosoma o en plásmidos. Debido a que algunos metales tóxicos son micronutrientes esenciales (por ejemplo cobre, cobalto, zinc, níquel), las bacterias deben ajustar con precisión las funciones de los sistemas de captación y de expulsión para mantener niveles intracelulares adecuados. Para otros metales sin función biológica (como cadmio y plata), los sistemas de transporte deben estar orientados solo hacia la expulsión de los iones nocivos. En los últimos años, varios sistemas bacterianos de expulsión de iones metálicos tóxicos han sido analizados a nivel molecular, por lo que se han dilucidado los detalles de los mecanismos bioquímicos de la resistencia. Entre estos se encuentran las vías membranales que expulsan a los cationes derivados de cobre, cadmio, zinc, níquel, cobalto y plata. Dos mecanismos generales destacan: los que emplean ATPasas tipo P y los basados en sistemas antiportadores que intercambian a los iones tóxicos por protones.

Palabras clave: metales pesados tóxicos, expulsión membranar, ATPasa plasmídica.

INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo sus funciones metabólicas los microorganismos requieren de la presencia de ciertos iones inorgánicos esenciales, como los metales calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso. Algunos metales presentes también en el ambiente, sin embargo, son intrínsecamente tóxicos y carecen de actividad biológica (como los denominados metales pesados: plomo, mercurio, cadmio, plata), o bien son esenciales pero presentan toxicidad cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas, como cobre, zinc, cobalto, níquel. Aunque los mecanismos de toxicidad de los metales son diversos, los sistemas más comunes involucran una interferencia con el transporte y la función de los iones fisiológicos esenciales, o la interacción con las macromoléculas celulares tales como las enzimas y los ácidos nucleicos.

Los metales tóxicos se encuentran de manera natural en la biosfera normalmente en niveles bajos, de tal manera que no representan un factor de toxicidad para los organismos vivos. Sin embargo, en ciertas áreas, como algunos yacimientos minerales o en zonas con una elevada actividad industrial, los niveles de dichos metales pueden llegar a ser elevados. En esta última situación, los organismos son afectados, y sólo aquellos que desarrollan mecanismos eficaces de resistencia permanecen en los ambientes alterados por la presencia de los metales nocivos.

Los principales mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con los metales tóxicos son:^{13,33} a) la precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancias excretadas por las bacterias; b) la unión de los cationes metálicos en las cubiertas celulares, por lo general basada en las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular; c) la acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes citoplásmicos; d) las transformaciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos tóxicas; y, e) los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones nocivos.

Estos sistemas con frecuencia proporcionan a las bacterias tolerancia a concentraciones elevadas de los metales tóxicos, aunque se han postulado otras funciones adaptativas para ellos, como su participación en propiedades de virulencia.¹ Los genes responsables de los mecanismos de interacción bacterias-metales pueden estar codificados en el cromosoma o en plásmidos.³⁸ En los últimos años, varios sistemas bacterianos de expulsión de metales se han descrito a nivel molecular, dilucidándose en algunos casos los mecanismos bioquímicos involucrados.^{3,12,14,42,61} En este trabajo se resumen los aspectos relacionaños con los mecanismos bacterianos de expulsión de metales tóxicos, con énfasis en los sistemas que han sido analizaños con mayor detalle (Tabla 1).

EXPULSIÓN DE COBRE

1.-Papel biológico del cobre en las bacterias

El cobre es un micronutriente esencial para todos los microorganismos, ya que es constituyente de muchas metaloenzimas y de proteínas involucradas en el transporte de electrones, transformaciones redox y otras reacciones importantes.^{11,14} Debido a la capacidad del cobre para sufrir transiciones entre las especies Cu(I) y Cu(II), este

metal puede actuar como donador o aceptor de electrones en las cadenas transportadoras de electrones.

La toxicidad del cobre se debe principalmente a la alteración de sitios activos de enzimas y a la oxidación de componentes de membranas, procesos relacionados con su capacidad para generar radicales libres hidróxido mediante una reacción tipo Fenton; estos radicales pueden inducir la peroxidación de lípidos, causando interrupción en las membranas, oxidación de proteínas y otros daños celulares.⁸ El cobre también puede unirse y modificar grupos funcionales en proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, alterando la estructura y función de estas macromoléculas.⁹

El cobre tiene un papel dual en los organismos vivos: es esencial en bajas concentraciones pero a concentraciones elevadas es tóxico; debido a esto, las bacterias deben poseer mecanismos que les permitan mantener el cobre intracelular dentro de ciertos niveles que no interfieran con su homeostasis pero que no produzcan daño celular. Por estas razones los microorganismos han desarrollado delicados sistemas que les permiten mantener las concentraciones adecuadas de cobre en el interior celular; algunos de ellos se basan en la captación y otros en la expulsión del metal.¹⁷

2.- ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P son una clase importante de proteínas involucradas en el transporte de iones y cuya función se relaciona con el mantenimiento de concentraciones iónicas adecuadas en el interior celular. Se han identificado más de 100 ATPasas tipo P que participan en la homeostasis de iones en organismos tan diversos como bacterias y humanos, donde conservan elevados grados de similitud en secuencia y probablemente en función.⁶¹ Existen tres características importantes que se encuentran en todas las ATPasas tipo P: 1) Están formadas por un monómero de 70-200 kDa; 2) Se inhiben a concentraciones micromolares de avanza-

TABLA 1. Sistemas bacterianos de expulsión de metales.

Especie bacteriana	Sistema (Localización) *	Metales Expulsados	Mecanismo de expulsión	Referencia No.
<i>Escherichia coli</i>	Cut (C)	Cu	ATPasa?	31
<i>E. coli</i>	Pco (P)	Cu	??	32
<i>Helicobacter pylori</i>	Hpcop (C)	Cu	ATPasa P	2
<i>Enterococcus hirae</i>	Coo (C)	Cu (Ag)	ATPasa P	59
<i>Synechococcus</i> sp.	Pac (C)	Cu (Ag)	ATPasa P	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	CadA (P)	Cd	ATPasa P	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Czc (P)	Cd Zn Co	Antiportador/H ⁺	39
<i>E. coli</i>	ZntA (C)	Zn Cd	ATPasa P	3
<i>A. eutrophus</i>	Cnr (P)	Co Ni	Antiportador/H ⁺	4
<i>E. coli</i>	Sil (P)	Ag	Antiportador/H ⁺	
			ATPasa P	b

* C, cromosoma; P, plasmídico

^b Gupta *et al.*, enviado para publicación.

do y, 3) Durante su funcionamiento, se forma un intermediario acilfosfato por la transferencia de un grupo fosfato del ATP a un residuo de ácido aspártico de la enzima.⁶¹

Todas las ATPasas tipo P funcionan como bombas de cationes, ya sea para la captación, la expulsión o el intercambio de los iones.⁵⁴ En esta revisión sólo se tratarán las ATPasas involucradas en sistemas de expulsión. Estas enzimas, ya sea de procariontes o de eucariontes, muestran varios dominios conservados, como son los involucrados en la función de fosfatasa, en la transducción del ion, en la fosforilación, y en la unión al ATP. La región de transducción del ion contiene un residuo de prolina localizada en un dominio hidrofóbico y conservado en todas las ATPasas tipo P; en algunas enzimas, como en la ATPasa de cadmio, esta prolina se encuentra flanqueada por cisteínas.⁶⁰ La desfosforilación del acilfosfato por la actividad del dominio de fosfatasa

coincide con un cambio conformacional y con el transporte de uno o dos iones a través de la membrana.⁶¹

Existen dos enfermedades hereditarias en humanos causadas por defectos en el metabolismo del cobre, el síndrome de Menkes y la enfermedad de Wilson.⁴⁷ El gen afectado en el síndrome de Menkes codifica para una ATPasa tipo P que ha sido descrita como una proteína que transporta cobre.^{57,60} La deficiencia de esta enzima causa una acumulación del metal en diversos tejidos. El gen responsable de la enfermedad de Wilson también codifica para una ATPasa tipo P.^{6,60} La alteración de esta ATPasa produce una excesiva acumulación de cobre en el hígado. Estas ATPasas tienen la característica de que en su extremo amino terminal contienen seis copias de una secuencia muy similar a las secuencias previamente encontradas en ATPasas tipo P de origen bacteriano que confieren resistencia a metales (por ejemplo, cada de

Staphylococcus aureus) y en ATPasas tipo P del sistema bacteriano homeostático del cobre (como las enzimas CopA y CopB de *Enterococcus hirae*⁶¹ (ver más adelante). Estas dos ATPasas humanas son las primeras proteínas transportadoras de metales tóxicos descritas en eucariotes.¹⁰

3.-Mecanismos de expulsión de cobre

mosoma en cepas de *E. coli* resistentes al metal; este sistema fue denominado *cut*. Induciendo mutaciones que causan hipersensibilidad a cobre, se identificaron ocho genes: *cutABCDEFGHIRS*. Mediante el análisis de las funciones de las proteínas codificadas por este operón, se concluyó que el mecanismo de resistencia a cobre consiste en la expulsión del catión (Figura 1).

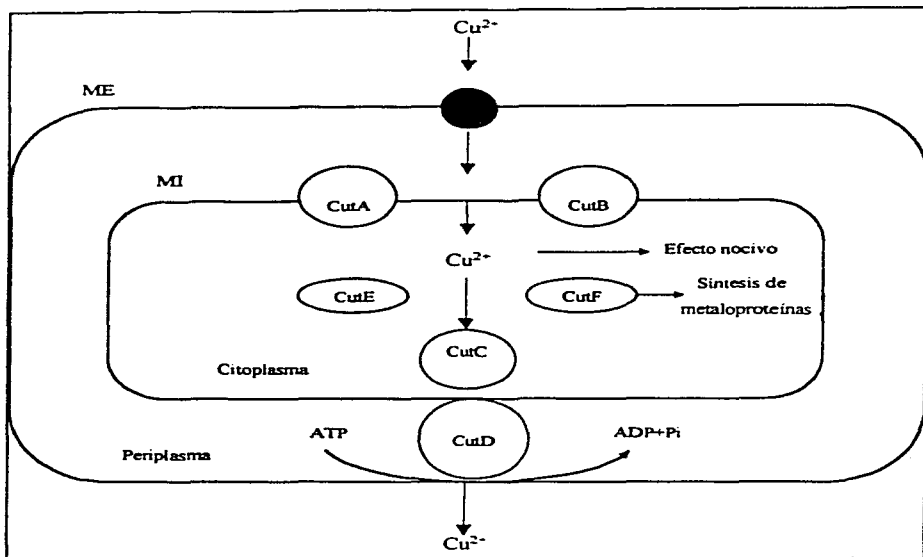


Figura 1. Modelo propuesto para el sistema Cut de captación, transporte y expulsión de cobre codificado por el cromosoma de *Escherichia coli*. El cobre es inicialmente captado por las porinas de la membrana externa. Las proteínas CutA y CutB transportan el cobre hacia el interior celular y lo ceden a las proteínas citoplásmicas CutE y CutF, las cuales a su vez transportan el metal a los sitios de síntesis de proteínas. El exceso del metal es expulsado hacia el exterior celular mediante las proteínas CutC y CutD que tal vez funcionan como ATPasa. ME=membrana externa; MI= membrana interna. Adaptado de Lee *et al.*³¹

a) Sistema *cut* de *Escherichia coli*. Lee *et al.*³¹ identificaron un sistema de transporte y utilización de cobre codificado por el cro-

mosoma en cepas de *E. coli* resistentes al metal; este sistema fue denominado *cut*. Induciendo mutaciones que causan hipersensibilidad a cobre, se identificaron ocho genes: *cutABCDEFGHIRS*. Mediante el análisis de las funciones de las proteínas codificadas por este operón, se concluyó que el mecanismo de resistencia a cobre consiste en la expulsión del catión (Figura 1).

CutA y CutB son proteínas membranales involucradas en la captación de cobre; CutA transporta cobre y zinc mientras que CutB sólo transporta cobre.⁹ La expresión de

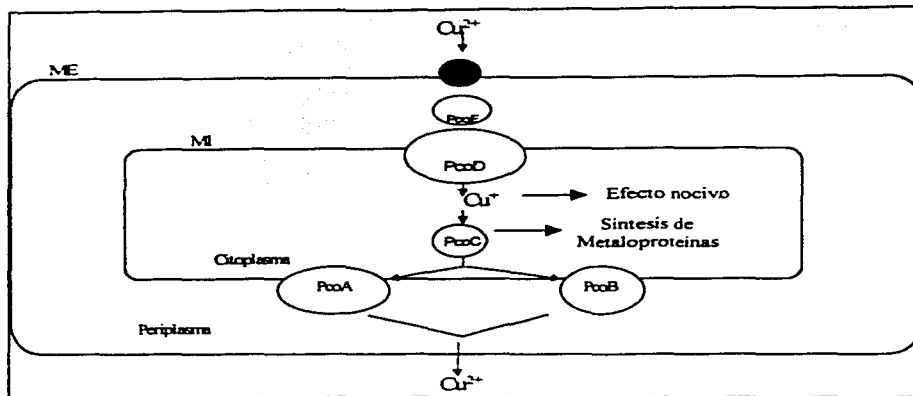


Figura 2. Modelo propuesto para el funcionamiento de las proteínas Pco de plásmidos de *Escherichia coli*. El cobre es inicialmente captado por las porinas de la membrana externa. PcoE es una proteína de la membrana externa que funciona como un sensor de la concentración de cobre. PcoC participa en el almacenamiento y transporte de cobre hacia lugares de síntesis de metaloproteínas. Finalmente, PcoA y PcoB son responsables de la expulsión del metal. ME= membrana externa, MI= membrana interna. Adaptado de Brown *et al.*⁹

CutA se induce por la exposición a sales de cobre, zinc, níquel, cobalto y, en menor grado, por cadmio, manganeso y plata.²¹ Se postula que las proteínas citoplásmicas CutE y CutF secuestran al cobre y lo llevan a los sitios de síntesis de proteínas que contienen cobre⁸ (Figura 1). La secuencia de CutE ha sido determinada; contiene 512 aminoácidos (aa), con una región de siete residuos (His-Fen-Gli-Met-Ala-Arg-Met) que se cree es un dominio para unión de cobre.³⁰

Las proteínas CutC y CutD expulsan el exceso de cobre del interior celular; probablemente son ATPasas que translocan el metal. La secuencia de aminoácidos de CutC (146 aa) indica que es una proteína hidrofílica que presenta en su extremo amino terminal un dominio de unión a cobre similar al de la ATPasa CopB de *Enterococcus hirae* (ver más adelante).

Finalmente, las proteínas CutS y CutR regulan la expresión del operón *cut* manteniendo las concentraciones adecuadas de cobre en el interior celular. CutS es una

proteína sensora de la concentración de cobre en la membrana citoplásmica y CutR regula la transcripción de los genes *cut*.³¹ CutS y CutR pertenecen a los sistemas reguladores de dos componentes comunes en diversos organismos, como las parejas PcoS/PcoR, CopS/CopR (ver más adelante), en los cuales la proteína sensora (CutS) responde a un estímulo externo (la concentración de cobre) con la autofosforilación de un residuo específico de histidina, el cual se encuentra conservado en estas proteínas sensoras de la membrana. La proteína sensora, una vez fosforilada, transfiere el grupo fosfato a un residuo específico de aspartato de la proteína transductora CutR. El transductor es activado por la fosforilación y entonces se une a la región del operador en el DNA para iniciar la transcripción del operón.³⁴

b) Sistema *pco* de *Escherichia coli*

Lee *et al.*³² clonaron un determinante de resistencia a cobre, denominado *pco*, a

partir del plásmido conjugativo pRJ1004 (122 kilobases; kb) identificado en una cepa de *E. coli* aislada de una granja de cerdos en Australia.⁶⁵ Las cepas que contienen el plásmido acumulan menos cobre que las cepas que no lo contienen, indicando que el mecanismo de resistencia podría consistir en la expulsión del metal.⁵¹

Por análisis genético-molecular, se identificaron inicialmente cuatro genes, denominados *pcoABC*R; estudios posteriores demostraron la presencia de genes *pco* adicionales, originando el operón *pcoABCDKSE*.⁷ Se ha propuesto que el mecanismo de resistencia a cobre consiste en la unión intracelular del cobre seguida por un incremento en la velocidad de expulsión del metal de la célula (Figura 2).

La función de las proteínas Pco no se conoce con exactitud, sin embargo, por su similitud con las proteínas Cop de *Pseudomonas syringae* (que acumulan cobre en la membrana externa y el espacio periplásmico¹⁵), se puede inferir acerca de sus posibles funciones. La proteína PcoD tiene segmentos transmembranales y residuos conservados de metionina e histidina localizados en la cara externa de la membrana interna; por lo que se cree que su función está relacionada con el transporte de cobre⁸ (Figura 2). La secuencia del producto del gen *pcoE* sugiere que PcoE es una proteína periplásmica con una región señal en el extremo amino-terminal y que posee similitud con las secuencias de octapéptidos repetidos en PcoA y PcoB (ver más adelante). La proteína PcoC (126 aa) es probablemente una proteína citoplásmica que participa en el transporte y almacenamiento del cobre (Figura 2).

Por otra parte, se sugiere que las proteínas de la membrana interna PcoA (605 aa) y PcoB (296 aa) están involucradas en la expulsión del cobre; estas proteínas tienen un octapéptido conservado (Asp-His-X₂-Met-X₂-Met) que se postula funciona como un dominio que une al cobre⁸ (Figura 2).

Los productos de los genes *pcoS* y

pcoR participan en la regulación de la expresión de los genes *pco*.⁷⁷ La secuencia de PcoS sugiere que se trata de una proteína que se fosforila al detectar concentraciones elevadas de cobre; esta proteína, a su vez, fosforila a la proteína PcoR, la cual actúa como un activador de la expresión de los genes *pco*. PcoS/PcoR pertenecen a los sistemas de dos componentes como los ya mencionados CutS/CutR.⁷

El sistema *pco* de *E. coli* es equivalente al sistema *cop* de *Pseudomonas*,¹⁷ y los genes se encuentran organizados en el mismo orden: *pcoABCDKSE*.⁸ La similitud entre las secuencias de aminoácidos de los pares de proteínas es: PcoA/CopA, 76%; PcoB/CopB, 54%; PcoC/CopC, 66% y PcoD/CopD, 38%.⁵⁵ Sin embargo, a pesar de esta semejanza, el mecanismo de resistencia del sistema *pco* de *E. coli* difiere notablemente del sistema *cop* de *Pseudomonas*, ya que el primero confiere resistencia a cobre mediante un mecanismo de expulsión (Figura 2) mientras que el segundo lo hace por la acumulación del metal¹⁵. El hecho de que proteínas tan parecidas funcionen en forma diferente no ha sido aún entendido; una posible explicación es que los determinantes *cop* y *pco* tienen un origen común pero han divergido después de su diseminación a especies bacterianas de distintos ambientes, originando un diferente mecanismo de interacción con el cobre.⁸

c) Sistema *hpcopAB* de *Helicobacter pylori*

En un fragmento de 2.7 kb del cromosoma de la bacteria Gram negativa, patógena de humanos, *Helicobacter pylori* se encontraron tres marcos de lectura abiertos designados ORF 1,2 y 3²². La secuencia de aminoácidos deducida del ORF1 mostró que éste origina una ATPasa tipo P denominada hpCopA (611 aa) que contiene regiones conservadas típicas de las ATPasas encontradas desde bacterias hasta humanos. La interrupción del ORF1 produce mutantes de *H. pylori* susceptibles a cobre;²³ en estas mutantes no se encontró alteración de la susceptibili-

dad a níquel, cadmio, o mercurio. ORF2 codifica para una proteína de 66 aa designada hpCopP; esta proteína muestra similitud con MerP, la proteína periplásmica involucrada en la resistencia a mercurio. hpCopP contiene también una región de unión a metales pesados. Los resultados obtenidos indican que ORF1 y ORF2 forman un sistema de transporte de cationes asociado con la expulsión de cobre en células de *H. Pylori*.²²

Recientemente, Bayle *et al.*² clonaron los operones *cop* de las especies relacionadas *H. pylori* y *H. felis*, mediante el escrutinio de bancos de genes. Ambos operones contienen un marco de lectura abierto para una ATPasa tipo P, CopA, la cual muestra similitud con las ATPasas tipo P de cadmio, CadA, y de cobre, CopA y CopB. También se encontró un marco de lectura abierto que codifica para CopP, que presenta similitud con la proteína CopZ del operón *copyZAB* de *Enterococcus hirae* (ver más adelante). Estas ATPasas contienen una región amino terminal que une al cobre. Se determinó, por otra parte, que CopA contiene cuatro pares de segmentos transmembranales, además de las regiones de unión del ATP y de fosforilación.³⁵ Estos datos sugieren que la resistencia a cobre en *H. pylori* y *H. felis* ocurre por un mecanismo conservado de expulsión, que es dependiente de ATPasas.

d) Sistema *cop* de *Enterococcus hirae*

Odermatt *et al.*⁴⁵ describieron un mecanismo homeostático para cobre codificado en el cromosoma de la bacteria Gram positiva *Enterococcus hirae*. Este sistema es dependiente de la actividad de dos ATPasas tipo P, CopA y CopB, cuya expresión es regulada por la concentración de cobre. Aunque CopA y CopB son muy similares en su secuencia de aminoácidos, los primeros 100 residuos del extremo amino terminal son diferentes. La porción amino terminal de CopB contiene tres secuencias consenso repetidas: Met-X-His-X-X-Met-Ser-Gli-Met-X-His-Ser.⁴⁵ Estas secuencias se encuentran

también en la proteína CopA de *P. syringae* que une al cobre, lo que sugiere que la región amino terminal de CopB es un dominio que participa en la unión del metal.⁸

CopA y CopB muestran un 33% de aminoácidos idénticos y tienen un bajo contenido de cisteínas: CopA tiene cuatro, mientras que CopB presenta sólo una.⁴⁵ Los perfiles hidropáticos de CopA y CopB son muy similares; basados en estos perfiles y en la distribución de los residuos cargados en las dos caras de la membrana, Odermatt *et al.*⁴⁵ propusieron un modelo topológico para CopB, con ocho hélices transmembranales y los extremos C y N terminales en la región de la proteína expuesta al citoplasma (Figura 4). Estos autores concluyeron que las proteínas CopA y CopB de *E. hirae* son ATPasas que llevan a cabo la translocación del cobre y de otros iones metálicos, como plata y cadmio, a través de la membrana celular.

Empleando vesículas membranales invertidas de *E. hirae*, se demostró la acumulación de cobre por CopB, por lo que se concluyó que CopB es una ATPasa que funciona como una bomba que puede expulsar cobre del citoplasma;⁵⁹ así, el papel fisiológico de CopB parece ser el control de la concentración de cobre citoplásmico, expulsando el exceso al exterior celular.

CopA, por otra parte, muestra gran similitud (43%) con la proteína humana cuya deficiencia produce el síndrome de Menkes⁶⁰ (Figura 3). CopA posee una región conservada en el extremo amino-terminal, Gli-X-Tre-Cis-X-X-Cis, que se encuentra repetido seis veces en la región amino terminal en la proteína de la enfermedad de Menkes.⁶⁰ Esta región parece ser un sitio general de unión a metales tóxicos. También relacionada con CopA se encuentra la ATPasa de cadmio CadA de *Staphylococcus aureus*, con un 35% de similitud; CopB tiene un 26% de similitud con CadA.⁴⁵

Para identificar las regiones reguladoras involucradas en la inducción del operón *cop* de *E. hirae*, fue clonada y secuenciada la región 3' de *copA*.⁴⁴ Se encontró una región que contiene dos genes, *copy* y *copZ*,

que codifican para proteínas de 145 y 69 aa, respectivamente. Ambas proteínas contienen dominios de unión al metal y muestran similitud de secuencia con proteínas reguladoras conocidas. La interrupción del gen *copY* produce una sobreexpresión de CopA y CopB generando un fenotipo dependiente de cobre, por lo que se deduce que CopY actúa como un represor inducible del operón *cop*. En contraste, la interrupción de *copZ* suprime la expresión de las dos ATPasas generando células sensibles a cobre, ya que CopZ es un activador del operón *cop*.⁶³ Ambas mutaciones pueden ser complementadas *in trans* con plásmidos que contienen *copY* o *copZ*. Así, *copY* y *copZ* codifican para proteínas metalorreguladoras que son requeridas para la inducción por cobre del operón *cop*. La expresión de los cuatro genes está regulada a su vez por la concentración extracelular del metal.⁶³

diseñados a partir de secuencias conservadas en otras ATPasas, fueron clonados dos genes que codifican para ATPasas tipo P específicas para cobre; estas enzimas fueron denominadas PacS y PacL.²⁷

PacS (747 aa) muestra similitud con las ATPasas tipo P procarionóticas, mientras que PacL (926 aa) es similar a las ATPasas eucarióticas, particularmente a la ATPasa de calcio. Las secuencias de aminoácidos de PacS y PacL sugieren que son proteínas integrales de la membrana, ya que contienen múltiples regiones hidrofóbicas capaces de atravesar la membrana varias veces, como sucede en todas las ATPasas.²⁷

Kanamaru *et al.*²⁸ encontraron que la síntesis del RNA mensajero de *pacS* aumenta con la exposición de células de *Synechococcus* al cobre y que la interrupción de ese gen causa una hipersensibilidad al metal, confirmando el papel de la ATPasa en la expulsión de cobre inducida por éste. Estos au-

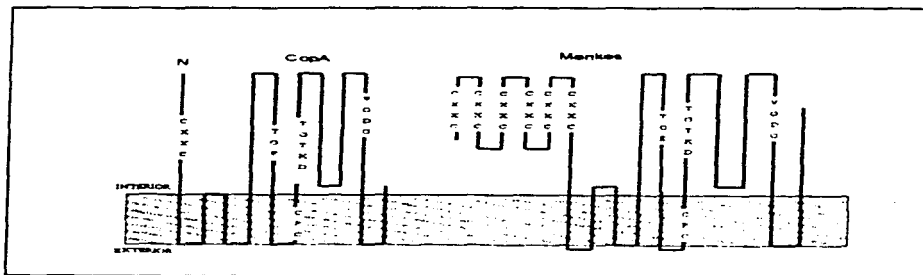


Figura 3. Comparación de las estructuras de la proteína CopA de *Enterococcus hirae* y la proteína de la enfermedad humana de Menkes. La mayor parte de las proteínas se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana. CXXC indica los sitios de unión a cobre, TGE El dominio de fosfatasa; TGTKD el dominio de aspartil cinasa, VGDK el dominio de unión del ATP y CPC la región de transducción del ion. Tomado de Solis *et al.*⁶⁰

e) Sistema *pac* de *Synechococcus*

Synechococcus es una cianobacteria que tiene un aparato fotosintético (tilacoide) similar en estructura y función al localizado en los cloroplastos. Mediante la amplificación por PCR del cromosoma de una cepa de *Synechococcus* con oligonucleótidos

tores demostraron también que la proteína PacS se encuentra localizada en la membrana tilacoide, donde probablemente actúa como una bomba de expulsión de cobre y cuya función es proteger al tilacoide de las concentraciones elevadas del metal.²⁸ Éste es el primer ejemplo descrito de una ATPasa

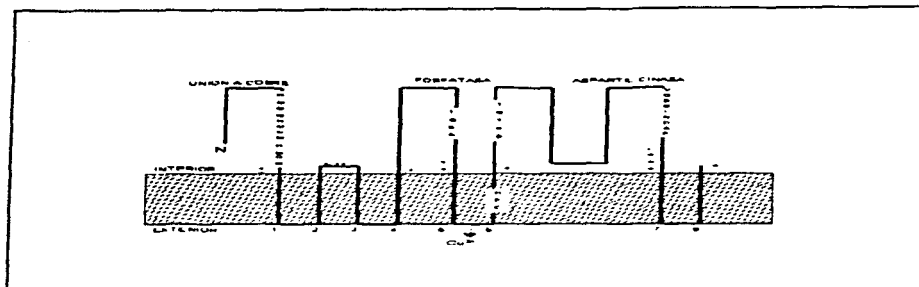


Figura 4: Estructura tentativa de la ATPasa CopB de *Enterococcus hirae* en su perfil hidropático. Se muestran las ocho hélices transmembranales (numeradas 1-8). Las regiones H.M., GM indican tres sitios probables de unión a cobre. La región característica a todas las ATPasa tipo P está indicada como TGES, que es parte del dominio de fosfatasa. TGTKD es el sitio de formación del aspartato fosfato y VGDGINDAP es parte del dominio de aspartato cinasa. En la hélice número seis se muestra la región conservada de una prolina flanqueada por histidina y cisteína (HPC). Tomado de Ocdmatt *et al.*⁴⁵

de expulsión que controla la concentración de iones en un compartimento intracelular.

EXPULSIÓN DE CADMIO

1.- Toxicidad del cadmio en las bacterias

El cadmio es un metal pesado utilizado ampliamente en la industria para una variedad de aplicaciones. En las últimas décadas ha aumentado su uso industrial, produciéndose contaminación por cadmio en el ambiente, incluyendo suelos, agua, plantas, animales y productos alimenticios. El cadmio carece de función biológica y en su forma de catión divalente es altamente tóxico para las bacterias y los organismos superiores. El principal efecto tóxico del cadmio es la inhibición de la respiración bacteriana causada por su gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de la cisteína en proteínas esenciales.

2.- Sistemas de expulsión de cadmio

Varios sistemas bacterianos que confieren resistencia a cadmio han sido estudiados con detalle, encontrándose que los

mecanismos bioquímicos para esta resistencia son muy diversos. La mayoría de los mecanismos de tolerancia a cadmio conocidos, sin embargo, se basan en la expulsión del catión, aunque también se han descrito sistemas relacionados con el secuestro del cadmio por proteínas similares a las metalotioninas.³⁸

a) Sistema *cadA* de *Staphylococcus aureus*

La resistencia a cadmio es la característica más común entre los determinantes de resistencia codificados por plásmidos de *S. aureus*; esta resistencia ha sido encontrada con una frecuencia del 80% o más en algunas colecciones de estafilococos de origen clínico.⁶⁹ En *S. aureus*, el cadmio penetra a la célula por el sistema de transporte activo del manganeso^{46,67} y es un inhibidor competitivo de esta vía.⁴¹

En el plásmido pI258 de *S. aureus*, la resistencia a cadmio es conferida por el sistema *cadA* que codifica para una ATPasa tipo P de 727 aa. El mecanismo de resistencia consiste en la expulsión de cadmio que evita la acumulación del catión en el citoplasma.⁴³ En vesículas membranales inverti-

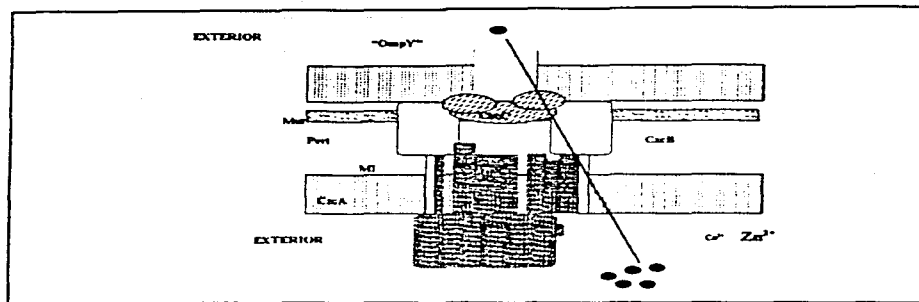


Figura 6. Modelo propuesto para el funcionamiento del sistema *czc* codificado por el plásmido pMOL30 de *Alcaligenes eutrophus*. CzcA transporta los cationes divalentes (●) a través de la membrana interna (MI). CzcB conduce los cationes a través del espacio periplásmico (per), mientras que CzcC se une a una hipotética proteína membranaral ("OmpY"), adyacente al complejo Czc, la cual libera los cationes a través de la membrana externa (ME) hacia el espacio extracelular. Mur indica la capa de mureína. Tomado de Rensing *et al.*²⁴

CadA de *S. aureus* que con las ATPasas de otros organismos superiores.⁵⁵ La ATPasa de Menkes y la ATPasa CadA de *S. aureus* muestran regiones comunes a todas las ATPasas tipo P; una de estas es la región di-tiol amino terminal que se cree es una región que une al metal; hay una o dos copias de esta región en la secuencia de CadA y seis copias en la secuencia de la proteína de Menkes. Otra región conservada en la ATPasa CadA y en la ATPasa de Menkes es la que contiene la secuencia Cis-Pro-Cis, propuesta como un canal de la membrana en CadA y en otras ATPasas de procariontes.⁵⁵

El segundo gen del sistema CadA es *cadC*, el cual codifica para una proteína (CadC) de 122 aa.⁷² La expulsión de cadmio en las células resistentes es inducible, y su expresión requiere de ambas proteínas, CadA y CadC.⁷² Endo y Silver²⁰ demostraron que CadC funciona como un represor de la transcripción de *cadA*. Se ha propuesto que CadC es un miembro de la familia de proteínas reguladoras que se unen al DNA; otro miembro de esta familia es la proteína ArsR (proteína reguladora del sistema de resistencia a arsénico).⁵⁸ CadC, sin embargo, posee tres sitios de unión a cationes,⁴² por

lo que se ha postulado que su papel en la resistencia a cadmio es más compleja; probablemente CadC une al cadmio para transportarlo hacia la bomba de expulsión CadA.

Secuencias de DNA similares a las de los genes *cadA* y *cadC* de *S. aureus* han sido identificadas en el cromosoma de la bacteria alcalofílica Gram positiva *Bacillus firmus*.²⁶ Aunque los genes *cad* se localizaron en una transposición, asignada a un plásmido endógeno, no hay evidencia de que estos genes confieran resistencia a cadmio.

b) Sistema *cadA* de *Listeria monocytogenes*

En cepas de *Listeria monocytogenes*, una bacteria Gram positiva reconocida como un patógeno oportunista en animales y humanos, se identificó un mecanismo plasmídico de resistencia a cadmio similar al sistema de resistencia *cadA* de *S. Aureus*.²⁹ Utilizando los genes *cadAC* de *S. aureus* como sonda, se encontró hibridación con un fragmento *EcoRI* de 3.1 kb del plásmido Lm74 de *Listeria*.²⁹ El análisis de las secuencias sugirió que el mecanismo de resistencia consiste en un sistema de expulsión dependiente

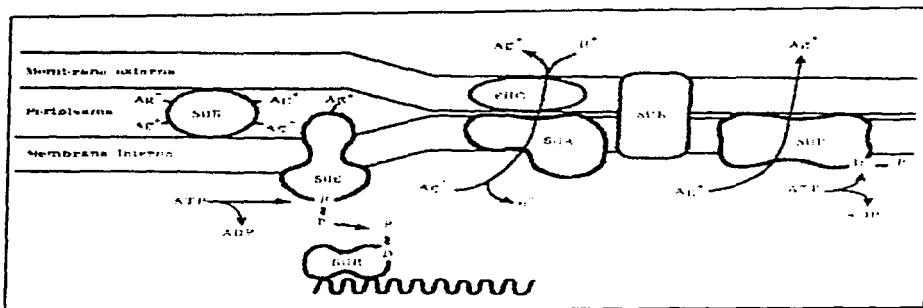


Figura 7. Modelo del funcionamiento del sistema de resistencia a plata Sil de *E. coli*. La función de cada proteína fue deducida por comparación con las secuencias de otras proteínas conocidas. SilE es una proteína cunasa encargada de transducir la señal fosforilando, a expensas del ATP, a SilR, una proteína reguladora que activa la transcripción del operón (línea ondulada). El complejo SilCBA está formado por proteínas de la membrana que actúan expulsando Ag⁺ mediante un mecanismo quimiosmótico antiportador que capta protones, en forma similar al sistema Czc. Finalmente, SilP es una ATPasa tipo P que expulsa a los iones Ag⁺ empleando la energía de la hidrólisis del ATP. Esta ATPasa presenta el residuo de aspartato (D) que es fosforilado. Tomada de Gupta *et al.*, enviado para publicación.

de energía, involucrando las proteínas CadA y CadC, similares a las de *S. Aureus*.²⁹

La mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* provenientes del ambiente, de fuentes clínicas o alimentarias contienen plásmidos de entre 24 y 106 kb.²⁹ Estos plásmidos con frecuencia confieren resistencia a cadmio. La distribución de esta resistencia entre los aislados de *L. monocytogenes* es compleja: muchas cepas diferentes son resistentes, plásmidos de diferentes tamaños confieren la resistencia y, además, algunas cepas que no contienen plásmidos también muestran resistencia, sugiriendo que en estos caños la tolerancia a cadmio se encuentra codificada en el cromosoma.²⁹

Los genes de resistencia a cadmio de los plásmidos de *L. monocytogenes* se encuentran en un transposón denominado Tn5422 de 6.4 kb;³⁰ este transposón es capaz de generar deleciones en los plásmidos, proceso probablemente relacionado con la diversidad de tamaños de los plásmidos de resistencia a cadmio.

c) Sistema *czc* de *Alcaligenes eutrophus*

Un mecanismo diferente de resistencia a cadmio, es el codificado por el operón *czc* localizado en el plásmido pMOL30 (238 kb) de la bacteria Gram negativa *Alcaligenes eutrophus*, el cual proporciona resistencia a cadmio, zinc y cobalto.^{38,39} El operón *czc* consta de tres genes estructurales, *czcABC*, y uno o más genes reguladores.^{39,42} La resistencia a cadmio, zinc y cobalto muestra inducción cruzada; las células inducidas con uno de los tres metales son resistentes a los tres iones.⁴⁰ La resistencia a los iones está codificada en un fragmento *EcoRI* de 9.1 kb del plásmido pMOL30³⁸ que causa un aumento en la expulsión de los tres cationes.⁴⁰

El gen *czcA* codifica una proteína de transporte de la membrana interna, CzcA, que es la proteína central del sistema, ya que una eliminación parcial del gen provoca la pérdida de la resistencia a los tres cationes.³⁶ CzcC es una proteína de la membrana externa y CzcB es una proteína transmembranal que actúa como un puente, asegurando que

los cationes divalentes sean expulsados al exterior de la célula y no sólo depositados en el espacio periplásmico, donde podrían ser recapturados por los sistemas de transporte celulares.¹⁸

Aunque no existen aún daños directos de la localización celular de las proteínas Czc, se ha postulado que la expulsión de cadmio se debe a la generación de un gradiente electroquímico acoplado a un flujo de protones mediante un sistema antiportador: los protones entran a la célula mientras los cationes (cadmio, zinc o cobalto) son expulsados de ella.^{37,42}

Recientemente, Rensing *et al.*⁴⁹ propusieron un modelo para el funcionamiento del sistema Czc basado en la orientación de las proteínas Czc en la membrana y en el análisis de mutantes alteradas en estas proteínas (Figura 6). En este modelo, la proteína CzcA transporta cadmio, zinc y cobalto a través de la membrana citoplásmica como un antiportador catión-protón. CzcB, a su vez, transporta los cationes a través del espacio periplásmico, mientras que CzcC se une a una proteína membranal hipotética (OmpY) adyacente al complejo Czc; esta proteína libera finalmente los iones, a través de la membrana externa, hacia el exterior de la célula⁴⁹ (Figura 6).

Se han identificado dos genes más que podrían actuar como reguladores del operón: *czcD* y *czcR*; se ha postulado que la proteína CzcD, la cual afecta la regulación del sistema pero no está implicada en la resistencia, pertenece a una nueva familia de proteínas llamadas CDF (facilitadoras de difusión de cationes).⁴² CzcR, que contiene tres sitios potenciales de unión a metales, puede ser una proteína asociada al DNA y probablemente actúa como activadora de la transcripción de *czc*; CzcR es esencial para la expresión total de la resistencia a cadmio, zinc y cobalto.³⁶ Se ha informado que el sistema *czc* es controlado, además, por un sistema regulador de dos componentes, CzcS/CzcR, en el cual CzcS es la proteína sensora y CzcR es la proteína activadora del sistema.⁶⁸ Como ocurre en los sistemas regulado-

res de este tipo descritos antes.

Las proteínas involucradas en el sistema *czc* han llegado a ser consideradas el prototipo de una nueva familia de proteínas exportadoras quimiosmóticas de tres componentes, incluyendo miembros que expulsan cationes tóxicos o compuestos orgánicos.^{49,58}

d) Otros sistemas de expulsión de cadmio

Un determinante cromosómico de resistencia a cadmio ha sido descrito en cepas de *S. aureus* resistentes al antibiótico metilicina; este sistema de resistencia expulsa cadmio pero no confiere resistencia a zinc. En experimentos de hibridación, este determinante no mostró similitud con el gen *cadA* de *S. Aureus*.⁷³⁻⁷⁴

La resistencia a cadmio encontrada en una cepa de *Pseudomonas putida*, que contiene el plásmido pGU100, ocurre por una captación disminuida de cadmio, aparentemente debida a la expulsión acelerada del metal.²⁵ Este sistema, sin embargo, no ha sido aún analizado a nivel molecular.

EXPULSION DE ZINC, NIQUEL Y COBALTO

1.- Importancia biológica del zinc, níquel y cobalto

Los metales zinc, níquel y cobalto son considerados micronutrientes esenciales para todos los organismos. Sin embargo, es ampliamente reconocida su toxicidad para las bacterias cuando se encuentran presentes en concentraciones que exceden los niveles requeridos. Así, de manera similar a lo que ocurre con el cobre (ver sección de Papel Biológico del Cobre en las Bacterias), los microorganismos deben poseer sistemas de captación y de expulsión para estos cationes que les permitan evitar sus efectos nocivos sin impedir su utilización como importantes componentes metabólicos en el citoplasma.

2.- Sistemas de expulsión de zinc, níquel o cobalto

Como se mencionó antes (ver sec-

ción de Expulsión de Cadmio) el operón *czc* localizado en el plásmido pMOL30 de *A. eutrophus* confiere resistencia, aparte de cadmio, también a zinc y a cobalto.^{16,38} El mecanismo de resistencia consiste en la expulsión de estos cationes mediante un sistema quimiosmótico antiportador catión/protón³⁷ (ver Figura 6).

Recientemente Beard *et al.*³ aislaron, mediante la inserción de un transposón, una mutante de *E. coli* hipersensible a zinc, a cadmio y, en menor grado, a cobalto y níquel; el gen mutado fue denominado *zntA*. El análisis de la secuencia de DNA reveló que la mutación ocurrió en la región promotora del ORF732 (0732), el cual codifica para una proteína de 732 aa similar a una ATPasa tipo P transportadora de cationes.³ Vesículas membranales invertidas obtenidas de la mutante, acumularon zinc y cadmio utilizando ATP como fuente de energía,⁴⁸ proceso que equivale a la expulsión en células completas, lo cual reforzó la hipótesis de que *zntA* codifica para una ATPasa dependiente de zinc. Rensing *et al.*⁴⁸ propusieron que la ATPasa ZntA tiene un papel dual: por una parte confiere resistencia al metal tóxico cadmio y por otra se encuentra involucrada en la homeostasis del metal esencial zinc.

La cepa de *A. eutrophus* CH34, además del plásmido pMOL30 que contiene el operón *czc* (mencionado en la sección de Expulsión de Cadmio), posee el plásmido pMOL28 (163 kb), en el cual se ha identificado el determinante *cnr* que codifica la resistencia a cobalto y níquel.³⁴ Se ha postulado que el mecanismo de resistencia del sistema *cnr* es la expulsión dependiente de energía de los cationes divalentes. Aunque los operones *czc* y *cnr* no mostraron hibridación en experimentos tipo Southern, los genes estructurales se encuentran en el mismo orden en ambos sistemas y codifican para proteínas de tamaño similar. La proteína más grande, CnrA, muestra un 46% de aminoácidos idénticos con CzCA. Las semejanzas encontradas entre *czc* y *cnr* sugiere que ambos sistemas podrían funcionar de una

manera similar expulsando cationes divalentes.¹⁹

EXPULSIÓN DE PLATA

1.- Resistencia bacteriana a plata

La plata es un metal extremadamente tóxico para las bacterias,⁶⁰ actuando principalmente como un inhibidor de la respiración, por lo cual sus derivados han sido utilizados para controlar el desarrollo bacteriano.⁵² Sin embargo, poco se sabe sobre la interacción del metal con cepas sensibles y resistentes; no se ha identificado, por ejemplo, la vía de captación celular de la plata.

Se ha encontrado tolerancia a plata en bacterias aisladas de muestras de suelos de zonas de desechos fotográficos y domésticos,⁴ así como en aislados clínicos.^{1,64} Se considera que el amplio uso de las sales de plata como antiséptico local en el tratamiento de quemaduras graves ha seleccionado cepas bacterianas resistentes.⁶⁴

2.- Sistemas de expulsión de plata

a) Sistema *sil* de *Escherichia coli*

La codificación plasmídica de la resistencia a plata ha sido descrita en varias especies bacterianas, en la mayoría de los casos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*;^{5,17,24,62} sin embargo, debido a que no se ha efectuado un análisis molecular de los genes involucrados, el mecanismo de tolerancia no ha sido dilucidado.

Recientemente se ha estudiado con detalle un determinante de resistencia a plata localizado en el plásmido pMG101 de *E. coli* (Gupta *et al.*, comunicación personal). De este plásmido se clonó un fragmentativamente un operón de siete genes involucrados en la resistencia a plata. El primer gen del determinante, *silE*, aparentemente codifica para una proteína periplásmica de 143 aa, cuya función parece estar involucrada en la unión de la plata (Figura 7); la expresión de la proteína SilE es inducida por la presencia del metal. La secuencia de SilE

mostró un 47% de aminoácidos idénticos con la proteína PcoE del determinante de resistencia a cobre de *E. coli* (Gupta *et al.*, comunicación personal) (ver sección de Expulsión de Cobre).

En seguida de *silE*, se encuentran los genes *silS* y *silR*. Por su similitud con otras proteínas de sistemas reguladores de dos componentes, *SilS* (497 aa) parece ser una proteína cinasa de la membrana, cuya función sería la de actuar como un sensor de las concentraciones externas del metal, y *SilR* (228 aa) una proteína reguladora (Figura 7); así, probablemente ambas proteínas están involucradas en la transducción de la señal para la expresión del sistema de resistencia a plata (Gupta *et al.*, comunicación personal).

Contiguos a *silSR* se encuentran los marcos de lectura que codifican para tres proteínas de membrana: *SilC*, *SilB* y *SilA*, de 461, 430 y 1048 aa, respectivamente. *SilA* es postulada como una proteína antiportadora de la membrana interna y, mediante *SilB*, que es una proteína de fusión que une a la membrana interna con la externa, *SilA* se une con *SilC*, una proteína de la membrana externa (Figura 7). La función del complejo de las proteínas *SilCBA* parece ser la de un antiportador quimiosmótico Ag^+/H^+ de tres componentes (Gupta *et al.*, comunicación personal) (Figura 7), análogo al determinante *Czc* de resistencia a cadmio, zinc y cobalto de *Alcaligenes* (Figura 6) (ver sección de Expulsión de Cadmio).

El producto del último gen, *silP*, corresponde, por la secuencia deducida, a una ATPasa tipo P de 824 aa (Gupta *et al.*, comunicación personal). *silP* es transcrito junto con *silCBA*, y probablemente es parte del determinante de resistencia, actuando como una bomba de expulsión de Ag^+ dependiente de la hidrólisis de ATP (Figura 7). Éste es el primer estudio a nivel molecular de un determinante bacteriano de resistencia a plata, y aún falta comprobar mediante análisis bioquímicos los detalles del mecanismo de resistencia postulado.

Recientemente encontrados híbrida-

ción de los genes *sil* del plásmido pMG101 de *E. coli* con el DNA total de enterobacterias clínicas resistentes a plata (Calderón Vázquez *et al.*, en comunicación personal); estas cepas poseen plásmidos conjugativos que confieren resistencia a plata, probablemente mediante un sistema de expulsión del metal similar al conferido por el operón *sil* de *E. Coli*.

b) Otros sistemas de expulsión de plata

En cepas de *Enterococcus hirae* resistentes a cobre se observó la expulsión simultánea de cobre y de plata mediada por la ATPasa tipo P, CopB, codificada por genes cromosómicos⁵⁹ (ver sección de Expulsión de Cobre); los autores concluyeron que el sustrato natural de la ATPasa es el cobre, mientras que la plata es expulsada en forma inespecífica por la bomba. Una situación similar ocurre con la ATPasa antes mencionada, PacS, de *Synechococcus*, cuya expresión responde no sólo a cobre (tal vez el sustrato fisiológico) sino también a iones de plata.²⁸

Mediante la exposición a sales de plata de cepas clínicas de *E. coli*, Li *et al.*³³ obtuvieron mutantes resistentes al metal. Las mutantes mostraron una baja acumulación de plata, demostrándose que expulsaron el ion con alta eficiencia; como estas bacterias no contienen plásmidos, se considera que la expulsión es llevada a cabo por un mecanismo de transporte codificado en el cromosoma.³³ En este trabajo se encontró que aun las cepas sensibles expulsan plata con baja eficiencia, y que la expulsión probablemente aumenta en las mutantes alteradas en genes que codifican proteínas de la membrana externa.

El plásmido pJTI, proveniente de una cepa clínica de *E. coli*, es responsable de la resistencia a plata;⁶² esta cepa acumula cinco veces menos plata que una cepa sensible; aunque puede tratarse de un sistema de expulsión, el mecanismo preciso de la resistencia no se conoce. Por otra parte, el plásmido pUPI199, aislado de una cepa ambiental de la bacteria Gram negativa *Acinetobacter baumannii* resistente a varios metales pesados, confiere resistencia a plata en *E.*

coli por un mecanismo que involucra la expulsión del metal.¹⁷ en este caso no se ha realizado aún un estudio molecular de los genes de resistencia.

Agradecimientos

El trabajo de los autores ha sido apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica, UMNSh y por CONACYT (#0945P). Agradecemos al Dr. S. Silver por permitirnos usar la Figura 7 antes de ser publicada. SAHA es becario de CONACYT para estudios de maestría.

REFERENCIAS

1. AGRANOFF, D.D. & S. KRISHNA, 1998. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.* 28:403-412.
2. ANNEAR, D.I., B.J. MEE & M.J. BAILEY, 1976. Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation and colony structure in *Enterobacter cloacae* from burn wounds. *Clin. Pathol.* 29:441-443.
3. BAYLE, D., S. WANGLER, T. WEITZNEGGER, W. STEINHILBER, J. VOLZ, M. PRZYBYLSKI, K.P. SCHAFFER, G. SACHS & K. MELCHERS, 1998. Properties of the P-type ATPases encoded by the *copAP* operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J. Bacteriol.* 180:317-329.
4. BEARD, S. J., R. HASHIM, J. MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, M.N. HUGHES & R. K. POOLE, 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene, (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol. Microbiol.* 25:883-891.
5. BELLIVEAU, B.H., M.E. STARODU, B. C. COTTER & J.T. TREVORS, 1987. Metal resistance and accumulation in bacteria. *Bio-tech. Adv.* 5:101-127.
6. BILLY, R.T. & G.C. KYDD, 1982. Silver resistance in microorganisms. *Dev. Ind. Microb.* 23:567-577.
7. B INGHAM, M. J., T.J. ONG, K.H. SUMMER, R.B. MIDDLETON & H.J. MCARDLE, 1998. Physiologic function of the Wilson disease gene product, ATP7B. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:982S-987S.
8. BROWN, N. L., S.R. BARRET, J. CAMA-KARIS, B.T.O. LEE & D. A. ROUGH, 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pcp*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 17:1153-1166.
9. BROWN, N. L., B.T.O. LEE & S. SILVER, 1994. Bacterial transport and resistance to copper, p. 405-435. En H. Sigel & A. Sigel (Eds.) *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, Nueva York.
10. BROWN, N. L., D.A. ROUGH & B.T.O. LEE, 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27:41-51.
11. BULL, P.C. & D.W. COX, 1994. Wilson disease and Menkes disease. new handles on heavy-metal transport. *Trends. Genet.* 10:246-252.
12. CERVANTES, C., 1990. Bacterial resistance to copper. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 32:321-325.
13. , 1992. Bacterias que expulsan metales pesados. *Información Científica y Tecnológica* 14:13-17.
14. , 1993. El empleo de bacterias en la descontaminación de iones inorgánicos tóxicos. *Biotecnología* 3:30-40.
15. CERVANTES, C. & F. GUTIÉRREZ-CORONA, 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:121-138.
16. CHA, J.S. & D.A. COOKSEY, 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8915-8919.
17. COLLARD, J. M., P. CORBISIER, L. DIELS, Q. DONG, C. JEANTHON, M. MERGEAY, S. TAGHAVI, D. VAN DER LIE, A. WILMOTTE & S. WUERTZ, S., 1994. Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:405-414.
18. COOKSEY, D. A., 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 7:1-5.
19. DESHPANDE, L.M. & B.A. CHOPADE, 1994. Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *BioMetals* 7:49-56.
20. DIELS, L., Q. DONG, D. VAN DER LIE, W. BAHEYENS & M. MERGEAY, 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutro-*

- plus* CH34: from resistance mechanism to removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.* 14:142-153
21. DONG, Q. & M. MERGEAY, 1994. *Czc*/Cnr efflux, a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Mol. Microbiol.* 14:185-187.
 22. ENDO, G. & S. SILVER, 1995. CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 177:4437-4441.
 23. FONG, S. T., J. CAMAKARIS & B.T.O. LEE, 1995. Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 15:1127-1137.
 24. GE, Z., K. HIRATSUKA & D.E. TAYLOR, 1995. Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. *Mol. Microbiol.* 15:97-106
 25. GE, Z. & D.E. TAYLOR, 1996. *Helicobacter pylori* genes *hpcopA* and *hpcopP* constitute a *cop* operon involved in copper export. *FEBS Microbiol. Lett.* 145:181-188.
 26. HAEFELI, C., C. FRANKLIN & K. HARDY, 1984. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas smutzleri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158:389-392.
 27. HORITSU, H., K. YAMAMOTO, S. WACHI, K. KAWAI & A. FUKUCHI, 1986. Plasmid-determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 isolated from soil. *J. Bacteriol.* 165:334-335.
 28. IVEY, D. M., A.A. GUFFANTI, Z. SHEN, N. KUDYAN & T.A. KRULWICH, 1992. The *cadC* gene product of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 partially restores Na⁺ resistance to an *Escherichia coli* strain lacking an Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA). *J. Bacteriol.* 174:4878-4884.
 29. KANAMARU, K., S. KASHIWAGI & T. MIZUNO, 1993. The cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942, possesses two distinct genes encoding cation-transporting P-type ATPases. *FERS Lett.* 330:99-104.
 30. . 1994. A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Mol. Microbiol.* 13:369-377.
 31. LEBRUN, M., A. ANDURIER & P. COSSART, 1994. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.* 176:3040-3048.
 32. . 1994. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *J. Bacteriol.* 176:3049-3061.
 33. LEE, B.T.O., N.L. BROWN, S. ROGERS, A. BERGEMANN, J. CAMAKARIS & D. ROUCH, 1990. Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. *NATO ASI Ser. G.* 23:625-632.
 34. LEE, B.T.O., D.A. ROUCH, S.R. BARRRETT, S.D. ROGERS, J. CAMAKARIS & N.L. BROWN, 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 17:1153-1166.
 35. LI, X., H. NIKAIKO & K.E. WILLIAMS, 1997. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179:6127-6132.
 36. LIESEGANG, H., K. LEMKE, R. SIDDIQUI & H.G. SCHLEGEL, 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 175:767-778.
 37. MELCHERS, K., T. WEITZENEGGER, A. BUHMANN, W. STEINHILBER, G. SACHS & K.P. SCHAFER, 1996. Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 271:446-457.
 38. NIES, D. H., 1992. *CzcR* and *CzcD*, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 174:8102-8110.
 39. . 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system *CzcABC* from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:2707-2712.
 40. NIES, D. H., M. MERGEAY, B. FRIEDRICH & H.G. SCHLEGEL, 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutro-*

- phus CH34. *J. Bacteriol.* 169:4865-4868.
41. NIES, D.H., A. NIES, L. CHU & S. SILVER, 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7351-7355.
 42. NIES, D.H. & S. SILVER, 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:896-900.
 43. , 1989. Metal ion uptake by plasmid-free metal sensitive *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:4073-4075.
 44. , 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14:186-199.
 45. NUCIFORA, G., L. CHU & S. SILVER, 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3544-3548.
 46. ODERMATT, A. & M. SOLIOZ, 1995. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270:4349-4354.
 47. ODERMATT, A., H. SUTER, R. KRAPP & M. SOLIOZ, 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 268:12775-12779.
 48. PERRY, R. D. & S. SILVER, 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 150:973-976.
 49. PETRUKHIN, K. & T. C. GILLIAM, 1994. Genetic disorders of copper metabolism. *Curr. Opin. Pediatr.* 6:698-701.
 50. RENSING, C., B. MITRA & B.P. ROSEN, 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14326-14331.
 51. RENSING, C., T. PRIBYL & D.H. NIES, 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* 179:6871-6879.
 52. ROGERS, S. D., M.R. BHAVE, J.F.B. MERCER, J. CAMAKARIS & B. T. O. LEE, 1991. Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:6742-6748.
 53. ROUCH, D., J. CAMAKARIS, B. T. O. LEE & R.K.J. LUKE, 1985. Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131:939-943.
 54. RUSSELL, A.D. & W.B. HUGO, 1994. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 31:351-370.
 55. SILVER, S., 1983. Bacterial interactions with mineral cations and anions good ions and bad, p 439-457. En P. Westbroek & W. Jong (Eds.), *Biomineralization and Biological Metal Accumulation*. Reidel Publishing Company, Dordrech, Holanda.
 56. SILVER, S. & G. JI., 1994. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environ. Health. Perspect.* 102:107-113.
 57. SILVER, S., B.T.O. LEE, N.L. BROWN & D.A. COOKSEY, 1993. Bacterial plasmid resistances to copper, cadmium and zinc, p. 38-53. En: A. J. Welch & S.K. Chapman (Eds.) *The Chemistry of the Copper and Zinc Triads*. Royal Society of Chemistry, Londres.
 58. SILVER, S., T.K. MISRA & R. LADDAGA, 1989. DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances, p 145-163. En: *Biological Trace Element Research*, Vol. 21. Humana Press, Inc.
 59. SILVER, S., G. NUCIFORA & L.T. PHUNG, 1993. Human Menkes X-chromosome disease and the Staphylococcal cadmium-resistance ATPase, a remarkable similarity in protein sequences. *Mol. Microbiol.* 10:7-12.
 60. SILVER, S. & L.T. PHUNG, 1996. Bacterial heavy metal resistance. new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.
 61. SOLIOZ, M. & A. ODERMATT, 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270:9217-9221.
 62. SOLIOZ, M., A. ODERMATT & R. KRAPP, 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346:44-47.
 63. , 1996. CPx-type ATPases, a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* 21:237-241.

64. STARODUB, M.E. & J.T. TREVORS, 1990. Silver accumulation and resistance in *Escherichia coli* R1. *J. Inorg. Biochem.* 39:317-325.
65. STRAUSAK, D. & M. SOLIOZ, 1997. CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J. Biol. Chem.* 272:8932-8936.
66. SUMMERS, A.O., G.A. JACOBY, M.N. SWARTZ, G. MCHUGH & L. SUTTON, 1978. Metal cation and oxyanion resistances in plasmids of gram negative bacteria, p. 128-131. En: D. Schlessinger (Ed.) *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
67. TETAZ, T. J. & R.K. LUKE, 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154:1263-1268.
68. TREVORS, J.T., 1987. Silver resistance and accumulation in bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 9:331-333.
69. TYNECKA, Z., Z. GOS & J. ZAJAC, 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 127:313-319.
70. VAN DER LELIE, D., T. SCHWUCHOW, U. SCHWIDETZKY, S. WUERTZ, W. BAEYENS, M. MERGEAY & D.H. NIES, 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 23:493-503.
71. WEISS, A., S. SILVER & T.G. KINSCHERF, 1978. Cation transport alteration associated with plasmid-determined resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:856-865.
72. WITTE, W., L. GREEN, T.K. MISRA & S. SILVER, 1986. Resistance to mercury and to cadmium in chromosomally resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:663-669.
73. YOON, K. P., T.K. MISRA & S. SILVER, 1991. Regulation of the *cadA* cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *J. Bacteriol.* 173:7646-7649.
74. YOON, K. P. & S. SILVER, 1991. A second gene in the *Staphylococcus aureus cadA* cadmium resistance determinant of plasmid p1258. *J. Bacteriol.* 173:7636-7642.