



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIOS DE BIORREMEDIACIÓN DE UN SITIO CONTAMINADO CON CROMO
HEXAVALENTE Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y
REDUCCIÓN EN UNA BACTERIA INDÍGENA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

L. en C. PALOMA LARA FIGUEROA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

DR. MARIO VILLALOBOS PEÑALOSA
[Instituto de Geología, UNAM](#)

Ciudad de México. Mayo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A Carlos Ramírez porque tu amor es mi inspiración.

A mi Mamá Alejandra Figueroa por enseñarme a ser valiente y a esforzarme en las cosas importantes.

A mi hermano Cristóbal Lara por ser mi amigo de toda la vida.

A la memoria de mi padre Juan Lara y mis abuelos Blanca Klahr, Paula Castañeda, Othón Lara y Ramón Figueroa.

Este proyecto fue desarrollado bajo la tutoría de la Dra. Katy Juárez, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Katy Juárez por su tutoría en el desarrollo de este proyecto. Gracias por todo el tiempo y dedicación invertidos en mi formación, por todo el conocimiento, dirección y finalmente, por la facultad que me dio para proponer y seguir por caminos nuevos dentro del proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Biotecnología y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por la formación como científica y todos los recursos que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por otorgarme la beca de doctorado número 240024, así como por otorgar el financiamiento CONACYT 179684.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de asuntos del Personal Académico de la UNAM por otorgar el financiamiento al proyecto PAPIIT-DGAPA IN208912.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM por otorgarme recursos económicos para la asistencia 5 congresos, 3 nacionales y 2 internacionales.

A la Dra. Esperanza Martínez y al Dr. Mario Villalobos que fueron miembros de mi comité tutorial, mostrando un gran compromiso en dicha labor, con gran objetividad para cuestionar y proponer vías para desarrollar los objetivos del proyecto.

Al Dr. Enrique Morett por su contribución a mi desarrollo académico, en particular por todos sus consejos para mejorar mis aptitudes como expositor.

Al M.C. Fernando Riveros Mckay por su colaboración en el área bioinformática dentro de este proyecto.

A la Dra. Leticia Vega (USMB) por su apoyo bioinformático en los estudios de RNAseq.

A la Dra. Margarita Gutiérrez por hacer posible el ingreso y muestreo en el sitio de estudio, así como, por permitirnos realizar análisis de muestras de suelo en el Laboratorio de Análisis Químicos y Físicos del Ambiente de la UNAM, también agradezco a los integrantes de dicho laboratorio por todo su asesoría y apoyo para el desarrollo de las técnicas utilizadas.

A la Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopía electrónica del IBT, UNAM por sus servicios brindados para este proyecto.

Al M.C. Raunel Tinoco de la Planta Piloto (IBT, UNAM) por su asesoría y apoyo en los diversos ensayos de HPLC.

Al Dr. Alberto Hernández por su asesoría para el desarrollo de los ensayos de qRT-PCRs.

A la Plata Piloto por permitirnos el uso de varios equipos, a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (IBT, UNAM) y a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN por los servicios prestados para este proyecto.

A los miembros del jurado de examen de grado la Dra. Guadalupe Espín, el Dr. Arturo Guevara, la Dra. Susana Brom, la Dra. Rosario Vera y el Dr. Jorge Luis Folch, por todo el tiempo dedicado a la ardua revisión del manuscrito de tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Ana Lilia, Getzabeth, Fanny, Lizeth, Maricela, Leticia, Armando, Israel, Brenda, Alberto, Italia, Emanuel, Xadeni, Ángel, Rodrigo, Sonia, Evelin Verónica y Joivier por compartir todos estos años y por su ayuda en el laboratorio.

Al consorcio SOS (Saab-Osuna-Soberón) por toda su ayuda en el laboratorio en diversos momentos durante mis estudios de posgrado.

A Delia Caro y los técnicos Corina Mondragón, Antonio Dorantes, Javier Dorantes y José Luis Ramírez, por su valioso trabajo, que contribuyo día a día en la realización de este proyecto.

Al personal de servicios escolares y docencia Antonio Bolaños, Gloria Villa y Jalil Saab por su excelente y valiosa labor.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi esposo y mejor amigo Carlos Ángel Ramírez por motivarme a iniciar mis estudios de posgrado y apoyarme en todos los aspectos durante todos estos años. Por hacerme feliz, enseñarme tantas cosas y compartir esta vida tan fugaz.

A mi mamá Alejandra Figueroa por tantos años de esfuerzo, amor y apoyo incondicional, por poner en mi camino todas las herramientas necesarias para mi desarrollo académico y personal.

A mi hermano Cristóbal por su todo su cariño, apoyo y por ser mi amigo de toda la vida. A mi hermano José por su cariño y por los hermosos sobrinos.

A toda mi familia por su cariño, en particular agradezco a mi tío Francisco por estar siempre al pendiente, brindándome un gran apoyo moral aun en la distancia. También agradezco de corazón a mis suegros por su apoyo y motivación para culminar mis estudios de posgrado.

A mis queridas amigas Tania, Lizeth y Fanny por su apoyo y cariño, gracias por estar en mi vida.

A mis queridos perros Olivia y Blaky por borrar el estrés de los malos días.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	10
II.	ABSTRACT.....	11
III.	INTRODUCCIÓN.....	12
IV.	ANTECEDENTES.....	14
V.	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	17
VI.	OBJETIVOS.....	18
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
	VII.1 Medios de cultivo.....	19
	VII.2 Sitio de muestreo.....	19
	VII.3 Aislamiento de microorganismos de agua subterránea.....	19
	VII.4 Secuenciación de los genes <i>parC</i> , <i>gyrA</i> y <i>rpoB</i>	20
	VII.5 Métodos analíticos.....	20
	VII.6 Análisis estadísticos.....	20
	VII.7 Resistencia a Cr(VI) en medio líquido.....	21
	VII.9 Preparación de extractos celulares para cuantificar actividad reductasa de Cr(VI).....	21
	VII.10 Cuantificación de la actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares.....	22
	VII.11 Microscopía de transmisión electrónica.....	22
	VII.12 Secuenciación, ensamble y anotación del genoma completo de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	22
	VII.13 Análisis del genoma.....	23
	VII.14 Perfil plasmídico de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	23
	VII.15 Eliminación de genes por doble recombinación homóloga en <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	23
	VII.16 Construcción del vector pIJ790 Ω Sp.....	26
	VII.17 Construcción del vector pCP20 Ω Sp.....	26
	VII.18 Preparación de células de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr para electrotransformación.....	27
	VII.20 Adaptación metabólica de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr a Cr(VI).....	27
	VII.21 Aislamiento, purificación y secuenciación de RNA mensajero de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	27
	VII.22 Procesamiento bioinformático de los datos de RNAseq.....	28
	VII.23 Validación de los datos de RNAseq: Síntesis de cDNA y qRTPCRs.....	28
	VII.24 Análisis de resistencia a arsenato y arsenito en las mutantes <i>ars</i>	29

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
VIII.1 Ensayos en microcosmos de bioestimulación de suelo contaminado con Cr(VI) y aislamiento de microorganismos de suelo y agua subterránea.	30
A) Características del sitio de estudio.	30
B) Bioestimulación con acetato de muestras de suelo contaminado con Cr(VI).	30
C) Aislamiento de microorganismos de suelo y agua subterránea contaminados por Cr(VI).....	32
D) Artículo: “Acetate biostimulation as an effective treatment for cleaning up alkaline soil highly contaminated with Cr(VI)”.....	33
VIII.2 Caracterización de la cepa <i>K. pneumoniae</i> AqSCr aislada de agua subterránea contaminada por Cr(VI).	43
A) Resistencia a Cr(VI).	43
B) Reducción anaeróbica de Cr(VI) por <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	44
C) Reducción aeróbica de Cr(VI) por <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.	45
D) Actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.	47
E) Reducción de Fe(III) a Fe(II) por <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.....	48
VIII.3 Secuenciación del genoma.	51
VIII.4 Identificación genes que codifican posibles reductasas de Cr(VI) y generación de mutantes.	52
VIII.5 Generación y análisis de una mutante en el gen <i>chrA</i>	55
VIII.6 Respuesta global a Cr(VI) de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr.	56
Adaptación metabólica a Cr(VI).	56
Análisis global de expresión diferencial de genes en presencia y ausencia de Cr(VI): estudios de RNAseq.	58
A) Genes relacionados a transporte de electrones.	62
B) Genes asociados a replicación y reparación de ADN.....	63
C) Genes asociados a respuesta a estrés oxidativo.	63
D) Genes asociados a respuesta a limitación de sulfato.	65
E) Genes asociados a respuesta a limitación de hierro.....	66
F) Genes asociados a respuesta a limitación de fosfato.	66
G) Genes asociados a transporte de molibdeno.	67
H) Genes asociados a síntesis y degradación de proteínas.	67
I) Genes asociados a respuesta a estrés osmótico y daño en la envoltura celular.	68
J) Otros genes con expresión diferencial.....	68
VIII.8 Resistencia a otros metales.....	69

VIII.9 Elementos de resistencia a arsénico en <i>K. pneumoniae</i> AqSCr: análisis de mutantes.	72
IX. CONCLUSIONES.	76
X. PERSPECTIVAS.	76
XI. REFERENCIAS.	78
XII. APENDICES.	90
XII. ANEXOS.	103

I. RESUMEN.

El cromo hexavalente es un contaminante ambiental peligroso y altamente soluble, su detoxificación puede llevarse a cabo mediante su reducción a Cr(III), el cual es menos tóxico e insoluble a pH neutro. Diversos microorganismos poseen la capacidad de llevar a cabo dicha reducción y representan una alternativa tecnológica limpia y más económica a los métodos fisicoquímicos tradicionales.

Este proyecto se enfocó en el estudio de la reducción de Cr(VI) por microorganismos autóctonos de un sitio gravemente contaminado por cromatos localizado en León Guanajuato, México. En particular, se profundizó en los mecanismos de resistencia y reducción de Cr(VI) de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr. Para ello, su genoma completo fue secuenciado, posteriormente se generaron mutantes en los genes posiblemente involucrados en resistencia y reducción de Cr(VI). Por otra parte, se analizó la respuesta transcripcional a Cr(VI) mediante estudios de RNAseq.

La cepa AqSCr mostró resistencia a 34mM de Cr(VI), en su genoma fue identificado el gen *chrA* (transportador de salida de iones cromato), pero su eliminación no causó una disminución en su resistencia a Cr(VI). Por otra parte, AqSCr también mostró la capacidad de reducir Cr(VI) tanto aeróbica como anaeróbicamente. La actividad enzimática fue encontrada en la fracción soluble, sin embargo, la eliminación de seis genes que codifican para proteínas con homología a reductasas de Cr(VI) solubles no disminuyó su capacidad de reducción. Los estudios de respuesta transcripcional a Cr(VI), mostraron la sobreexpresión de elementos específicos de cadena de transporte de electrones, así como de elementos de sistemas de reparación de ADN, respuesta a estrés oxidativo y respuesta a limitación de hierro, azufre, fósforo, entre otros.

Finalmente, se encontró que la cepa AqSCr es capaz de reducir Fe(III) y de resistir altas concentraciones de selenio, uranio y arsénico. Estos resultados apuntan a un gran potencial biotecnológico en esta bacteria.

II. ABSTRACT.

Hexavalent chromium is highly soluble and a dangerous environmental contaminant. Its detoxification could be performed by reduction to Cr(III), which is less toxic, and insoluble at neutral pH. Several bacterial species have been found to possess mechanisms to reduce Cr(VI) and represent a clean and economically feasible alternative to traditional physicochemical methods.

This project was aimed on the study of microbial Cr(VI) reduction by autochthonous bacteria from a heavily Cr(VI)-polluted place located in León Guanajuato, México. Particularly, the mechanisms of Cr(VI) resistance and reduction of the *K. pneumoniae* strain AqSCr were studied. The whole genome of this strain was sequenced and genes encoding putative Cr(VI) reductases as well as a chromate transporter were deleted. Moreover, the transcriptional response to Cr(VI) was assayed through global transcriptional RNAseq studies.

The AqSCr strain showed resistance to 34mM Cr(VI), however the deletion of its chromosomally encoded *chrA* gene (chromate transporter) had no effect over its Cr(VI)-resistance. In other hand, AqSCr showed the ability to reduce Cr(VI) to Cr(III), both under aerobic and anaerobic conditions and the NADH-dependent Cr(VI) reductase activity was found in the soluble cell fraction. However, the deletion of six genes encoding putative soluble Cr(VI) reductases, had no effect over Cr(VI) reduction by *K. pneumoniae* AqSCr. The transcriptional Cr(VI)-response assays showed up-regulation of genes encoding elements of electron chain transport, as well as in genes belong to DNA repair systems, oxidative stress response, and iron, sulfate and phosphate starvation responses among others, allowing to generate a view of the global response to Cr(VI) of *K. pneumoniae* AqSCr strain.

Finally, it was found that AqSCr strain is also able to reduce Fe(III) and to resist high concentrations of selenium, uranium, arsenic metals. These results point to a great biotechnological potential from this bacterium.

III. INTRODUCCIÓN.

El cromo es un metal del grupo de transición VI-B, es el elemento más abundante en la litosfera junto con el zinc, y el 21° más abundante en la corteza terrestre. El cromo puede adquirir varios estados de oxidación, sin embargo, bajo condiciones ambientales únicamente el cromo trivalente Cr(III) y el cromo hexavalente Cr(VI) son estables. Estas dos especies tienen diferentes características químicas. En la litosfera y en la corteza terrestre el cromo se encuentra en estado de oxidación trivalente en minerales como la cromita (Fe-, Mg- Cr₂O₄) principalmente en rocas ultramáficas, así como en rocas metamórficas de algunas serpentinitas (Burns y Burns, 1975).

El cromo puede ser introducido en la biósfera por fenómenos naturales tales como erupciones volcánicas, incendios forestales e intemperización de rocas, sin embargo, en la actualidad la mayor contribución es resultado de actividades antropogénicas ya que este metal tiene un gran número de aplicaciones industriales. Su uso extensivo, así como la baja eficiencia de los procesos industriales y el manejo inadecuado de residuos, han generado severos problemas de contaminación en suelos y acuíferos con un grave impacto ecológico, en la salud pública y en la producción agrícola. Los desechos antropogénicos de este metal constituyen principalmente sales de Cr(VI) y en menor grado compuestos de Cr(III) (Shi y Dalal, 1990).

El Cr(VI) es la especie más peligrosa, ya que es altamente soluble, muy oxidante y es capaz de entrar a las células a través de los sistemas de transporte de sulfato debido a su analogía química (Roberts y Marzluf, 1971; Pereira et al., 2008). Una vez dentro de la célula el Cr(VI) es reducido a Cr(III) con intermediarios de Cr(V) y Cr(IV), lo cuales son muy inestables y donan los electrones a las moléculas cercanas, incluyendo al oxígeno, generando así especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jones et al., 1991; Shi et al., 1991). Además, el Cr(III) intracelular tiende a formar compuestos de coordinación con DNA y proteínas. En conjunto la reducción intracelular inespecífica de Cr(VI) a Cr(III) conduce a la generación de rupturas de doble cadena de DNA, entrecruzamientos en el DNA, entrecruzamientos DNA-proteína y oxidación de bases (Kortenkamp et al., 1996; Slade et al., 2005; Casadevall et al., 1999). Debido a esto el Cr(VI) es considerado un potente mutágeno (Figura 1). Además, genera estrés por limitación de hierro y azufre debido a que inhibe su transporte.

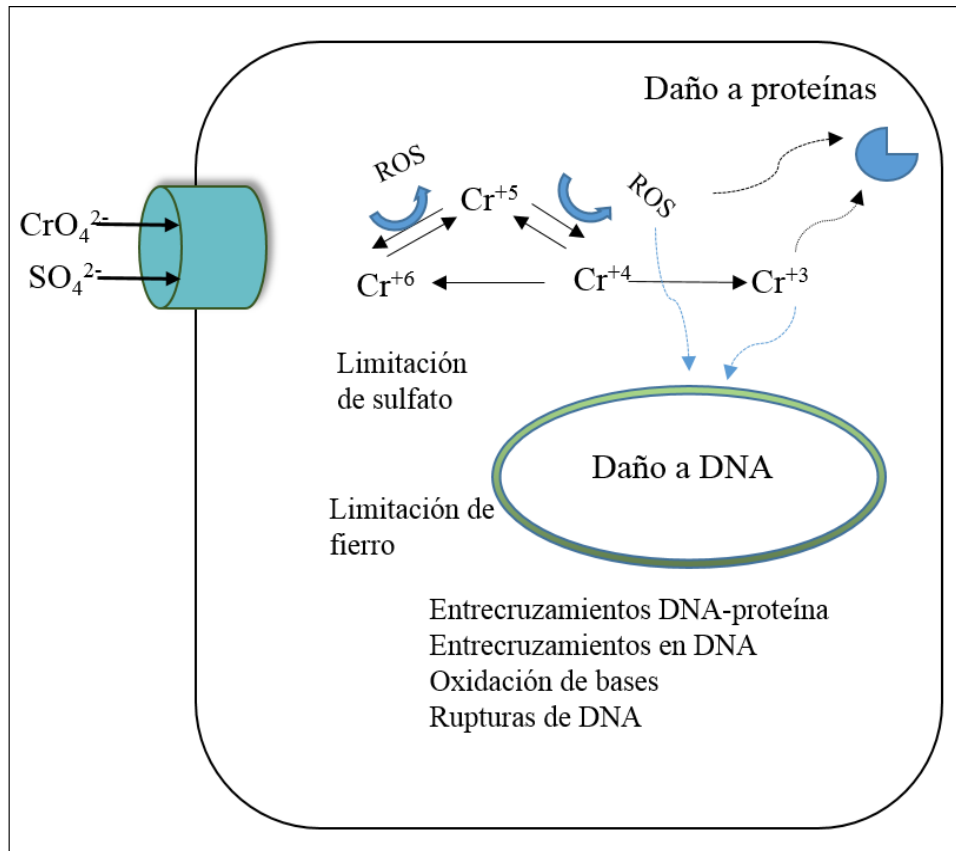


Figura 1. Vías de toxicidad del Cr(VI). Incluyen la inhibición competitiva del transporte de sulfato a través de permeasas de sulfato, posteriormente, su reducción indirecta resulta en la generación de intermediarios inestables [Cr(V) y Cr(IV)] que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y finalmente a la aparición de Cr(III) intracelular. Todos estos subproductos provocan severos daños tanto a DNA como a proteínas resultando en mutagénesis.

Las estrategias de remediación ambiental de Cr(VI) están enfocadas en su reducción a Cr(III), el cual es muy estable y mil veces menos tóxico debido a que es incapaz de permear las membranas celulares, además de ser menos soluble a pH neutro, formando precipitados de $\text{Cr}(\text{OH})_3$, por lo cual dicha reducción conduce a la inmovilización del cromo en suelos y ambientes acuáticos en un estado menos biodisponible (Narayani y Shetty, 2013; Sass y Ray, 1987). Hasta hace algunos años, las estrategias de remediación de suelos y acuíferos involucraban la excavación o extracción de agua seguidos de tratamientos químicos para reducir el Cr(VI) a Cr(III). Sin embargo, en los últimos años los microorganismos capaces de reducir Cr(VI) han recibido gran interés para ser utilizados como una tecnología de biorremediación, más segura y económica que los procesos fisicoquímicos tradicionales (Xiao et al., 2014).

IV. ANTECEDENTES.

Los microorganismos reductores de Cr(VI) son filogenéticamente y metabólicamente diversos, debido a ello, los mecanismos que estos utilizan para la reducción son muy diferentes. Algunos microorganismos anaerobios (estrictos o facultativos) como *Enterobacter cloacae* HO1, *Desulfotomaculum reducens* MI-1, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough y *Desulfuromonas acetoxidans*, utilizan el Cr(VI) como aceptor final de electrones de cadena respiratoria acoplada a la oxidación de hidrógeno o ácidos orgánicos como el acetato o el lactato, en dichos organismos la reducción de Cr(VI) se ha asociado principalmente a citocromos tipo c, hidrogenasas u otras reductasas unidas a membrana (Wang et al., 1991; Tebo y Obratsova et al., 1998; Chardin et al., 2003; Assfalg et al., 2002). En otros microorganismos como *Escherichia coli* ATCC 33456, *Ochrobactrum intermedium* BCR400, *Bacillus firmus* KUCr1, *Pseudomonas fluorescens* LB30, *Shewanella alga* y *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09, la reducción no está relacionada a la generación de energía, se considera un mecanismo fortuito asociado a detoxificación (véase más adelante) y lo llevan a cabo bajo condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas (Bopp y Ehrlich 1988; Guha et al., 2001; Xu et al., 2012), mediante reductasas solubles o unidas a membrana (Shen y Wang, 1993; Kavita y Keharia, 2012; Sau et al., 2010). Una tercera vía general es la reducción indirecta (no enzimática) a través de mediadores redox como quinonas solubles (Brose y James 2010), sulfuro de hidrógeno (bacterias sulfatoreductoras; Battaglia-Brunet et al., 2002) o Fe(II) (bacterias reductoras de Fe(III); Fuller et al., 2015). En algunos organismos como *Shewanella oneidensis* MR-1, los estudios indican la presencia de más de una vía de reducción de Cr(VI) (Viamajala et al., 2002). Los microorganismos con alguno de estos mecanismos generales de reducción son de gran interés, ya que pueden ser bioestimulados *in situ* mediante la adición de donadores de electrones para la reducción de Cr(VI) a Cr(III) o pueden ser utilizados en biorreactores, para el tratamiento de aguas residuales industriales para separar el metal y prevenir contaminación ambiental.

El estudio de los mecanismos bacterianos de reducción de Cr(VI) es fundamental para el diseño de procesos de biorremediación o tratamiento de residuos. Dicha reducción, es influenciada por diversos factores, incluyendo las condiciones ambientales o de cultivo, así como características intrínsecas del microorganismo. Uno de los principales factores limitantes es la resistencia del microorganismo al Cr(VI).

En bacterias, se han reportado 6 mecanismos generales de resistencia a Cr(VI), los cuales se describen a continuación: 1) Expulsión de iones cromato mediante transportadores de membrana denominados ChrA, que comúnmente se encuentran codificados en operones junto a un regulador transcripcional (ChrB), este mecanismo de resistencia es el mejor estudiado y se ha encontrado ampliamente distribuido, localizado principalmente en plásmidos y en algunos casos dentro de transposones (Branco et al., 2008), aunque en algunos microorganismos se ha encontrado codificado cromosomalmente (Caballero-Flores et al., 2012). 2) Exclusión por barreras de permeabilidad, principalmente mediante la producción de exopolisacáridos capsulares que actúan como adsorbentes secuestrando el metal extracelularmente (Lin et al., 2006; Ozdemir et al., 2003). 3) Respuesta a estrés oxidativo, el cual incluye la participación de catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas, quinona reductasas, entre otras. Aunque este mecanismo puede ser activado de manera inespecífica, en algunos casos la localización de los genes indica que son específicamente inducidos por Cr(VI), tal es el caso de la superóxido dismutasa ChrF codificada dentro del operón *chrBACF* en el transposon *TnOtChr* de *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (Branco et al., 2008). 4) Reparación de daños a DNA, este mecanismo incluye el sistema de reparación SOS (LexA, RecA, RecX, RecN, DinP y HumuD; Brown et al., 2006), el sistema MMR (por sus siglas en inglés, mismatch repair system), el sistema NER (por sus siglas en inglés, nucleotide excision repair system) (Viti et al., 2014) así como el sistema GO (por sus siglas en inglés, error prevention oxidized guanine; Santos-Escobar et al., 2014). 5) Detoxificación enzimática de Cr(VI) a Cr(III) con baja o nula generación de los intermediarios Cr(V) y Cr(IV). En todas las bacterias varias enzimas solubles son capaces de reducir Cr(VI) (por ejemplo, las reductasas de glutatión), sin embargo, estas enzimas transfieren electrón a la vez, generando Cr(V) (Goodgame y Joy, 1986) el cual genera ROS al reoxidarse a Cr(VI), generando un ciclo fútil y una drástica disminución del potencial reductor de la célula. Por otra parte, se ha encontrado que *in vitro* algunas enzimas (indicadas en la Tabla 3) son capaces de transferir dos electrones a la vez, por lo que en estado dimérico pueden convertir Cr(VI) a Cr(III) en un solo paso, generando únicamente un radical libre. Por lo tanto, la actividad de estas enzimas puede disminuir la toxicidad de Cr(VI) ya que minimiza su reducción por enzimas que transfieren un solo electrón. YieF de *Escherichia coli* es una de las cromato reductasas mejor estudiadas y es la que genera menor cantidad de ROS (Cheung y Gu, 2007). En muchos microorganismos la función de la reducción de Cr(VI) no es clara, por ejemplo, en *Pseudomonas fluorescens* LB300 se ha demostrado que la resistencia y la

reducción de Cr(VI) no están relacionadas (Bopp y Ehrlich, 1988). 6) Mecanismos de respuesta a limitación de hierro y sulfato mediante la activación de sistemas de captura, transporte y asimilación. Estos mecanismos han sido descubiertos en los últimos años principalmente gracias a análisis transcripcionales en presencia de Cr(VI) (Viti et al., 2014). En *Neurospora crassa* se generaron mutantes espontáneas deficientes en el transporte de sulfato, y se encontró que en presencia de metionina estas mutantes exhiben una resistencia a cromo superior a la que posee la cepa silvestre. Por lo que, se ha propuesto que la disrupción, modificación o represión de las permeasas de sulfato y/o la activación de vías alternativas de adquisición de azufre pueden ser un mecanismo importante de resistencia a Cr(VI) (Marzluf, 1970). Estos 6 mecanismos pueden tener mayor o menor influencia sobre la resistencia a Cr(VI), además, los elementos particulares involucrados en estas vías generales varían entre los diferentes microorganismos estudiados (Viti et al., 2014).

Con excepción de los transportadores de salida, todos los otros mecanismos de resistencia y reducción de Cr(VI) pueden incluir elementos esenciales para otras funciones celulares, debido a ello, el estudio mediante generación de mutantes puede estar limitado. Por lo tanto, los estudios de respuesta global a Cr(VI) son de gran importancia para estudiar estos mecanismos, así como, para la identificación de reguladores globales que orquestan las vías de respuesta.

Sitio de estudio y origen de los aislados bacterianos.

El Valle de León Guanajuato, México, tiene varias fuentes de contaminación por cromo, entre ellas un depósito de residuos industriales que ha conducido a altas concentraciones de Cr(VI) en el suelo y acuífero cercanos. El contenido de Cr(VI) en el agua subterránea en esta zona ha sido monitoreado mediante pozos y piezómetros desde su detección en 1975. Las concentraciones de Cr(VI) han mostrado fluctuaciones, sin embargo, en un área de 5 km² en la vecindad del depósito se han registrado concentraciones por encima del límite permitido para agua potable (0.05mg/l, NOM-127-SSA1-1994), alcanzando valores de hasta 95.1mg/l en las últimas décadas (Armienta y Rodríguez-Castillo, 1995; Villalobos-Aragón et al., 2012).

Durante este proyecto se realizó el aislamiento de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, a partir de una muestra de agua subterránea tomada en la zona donde inicia la pluma de contaminación del acuífero mencionado. Posteriormente, este microorganismo fue estudiado para determinar sus

mecanismos de resistencia y reducción de Cr(VI) mediante la generación de mutantes, secuenciación del genoma, estudios de RNAseq (Wang et al., 2009) y validación por RT-qPCR.

Existen diversos reportes de resistencia a metales por microorganismos del género *Klebsiella* y unos pocos de reductores de metales. Los más importantes incluyen a la cepa *Klebsiella oxytoca* BAS-10 (Baldi et al., 2001) y a *Klebsiella pneumoniae* L17 (Li et al., 2009), los cuales son capaces de llevar a cabo la reducción de Fe(III) a Fe(II). *Klebsiella oxytoca* BAS-10 ha sido ampliamente estudiada debido a que produce exopolisacárido capsular con alta afinidad por hierro. Por su parte, *Klebsiella pneumoniae* L17 es capaz de reducir óxidos de hierro hidratado, goethita, lepidocrocita y hematita (óxidos de hierro insolubles) durante la fermentación de citrato, glicerol, glucosa y sacarosa, además, es capaz de declorinar tetracloruro de carbono a cloroformo, este proceso es acelerado en presencia de óxido de Fe(III) y AQDS (antraquinona-2,6-disulfonato) (Li et al., 2009). Adicionalmente, esta bacteria ha sido utilizada como catalizador anódico en celdas microbianas de combustible, ya que es capaz de colonizar los electrodos y de realizar electrocatálisis directa con glucosa y almidón como donadores de electrones (Zhang et al., 2008; Zheng et al., 2010). Sin embargo, en estos microorganismos no se ha determinado el mecanismo de reducción de metales.

V. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.

Justificación: Los metales tienen un extenso número de aplicaciones industriales, aunado a esto, la baja eficiencia en los procesos de manufactura, así como en el manejo de residuos, conducen a una grave contaminación de suelos y acuíferos. El cromo hexavalente es uno de los contaminantes de mayor prioridad debido a su alta toxicidad y movilidad en el ambiente. Los microorganismos fermentadores reductores de Cr(VI) son muy comunes en suelos y acuíferos contaminados con este metal, por lo cual tienen un gran potencial en procesos de biorremediación, particularmente en estratos con concentraciones fluctuantes de oxígeno. Esta versatilidad también resulta atractiva cuando son utilizados en plantas tratadoras de aguas residuales. Sin embargo, los mecanismos de reducción de metales en estos microorganismos son pobremente comprendidos. Debido a ello, el estudio de los mecanismos de resistencia y reducción de Cr(VI) por la cepa *K. pneumoniae* AqSCr aislada de un acuífero contaminado por Cr(VI) resulta de gran relevancia.

Hipótesis: La capacidad de reducir Cr(VI) en *K. pneumoniae* AqSCr podría ser resultado de la actividad de enzimas relacionadas a reductasas de Cr(VI) reportadas en otros microorganismos. Por otra parte, el alto grado de resistencia de esta cepa podría deberse tanto a la actividad de dichas enzimas, como a la presencia de ChrA (transportador de Cr(VI)).

VI. OBJETIVOS.

Generales:

1. Realizar estudios en microcosmos de bioestimulación en muestras de suelo contaminado con Cr(VI) utilizando acetato como donador de electrones y llevar a cabo el aislamiento de microorganismos indígenas.
2. Estudiar los mecanismos de reducción y resistencia de Cr(VI) en el aislado *K. pneumoniae* AqSCr e identificar los elementos de reducción y resistencia a otros metales.

Particulares:

1. Caracterizar la capacidad de reducción y la resistencia a Cr(VI) por el aislado *K. pneumoniae* AqSCr.
2. Estudiar la actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares de *K. pneumoniae* AqSCr obtenidos de cultivos aeróbicos y anaeróbicos en presencia o ausencia de Cr(VI) y determinar su localización subcelular.
3. Identificar los genes de *K. pneumoniae* AqSCr posiblemente involucrados en resistencia y reducción de Cr(VI) y otros metales mediante secuenciación y análisis de su genoma.
4. Generación y análisis de mutantes sencillas y múltiples en los genes codificantes para proteínas homólogas a reductasas de Cr(VI) reportadas en otros microorganismos.
5. Estudiar la respuesta global a Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr mediante el análisis del perfil de transcripción en presencia y ausencia de Cr(VI).
6. Estudiar los límites de resistencia de *K. pneumoniae* AqSCr a otros metales.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.1 Medios de cultivo.

Para los ensayos aeróbicos se utilizaron dos medios de cultivo: medio LB y medio citrato de sodio que contiene 2.5g/l de NH_4Cl , 1.5g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g/l de KCl , 0.06g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y casa-aminoácidos al 0.2% (adicionados después de esterilización). El pH deseado fue ajustado con $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Para ensayos anaeróbicos se utilizaron tres medios de cultivo: medio NBAF (Nutrient Broth Acetate-Fumarate) (Coppi et al., 2001), medio citrato férrico (Coppi et al., 2001) y medio citrato de sodio anaeróbico que contiene 15.146g/l de $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5g/l de NH_4Cl , 1.5g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g/l de KCl , 0.06g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y casa-aminoácidos al 0.2%. Los tres medios de cultivo fueron burbujeados con N_2 y CO_2 50:20 (por cada 10 ml de medio se burbujea 8 min en la fase líquida y 8 min en la fase gaseosa) y finalmente fueron esterilizados calentando a 120°C por 20 minutos.

VII.2 Sitio de muestreo.

La muestra de agua subterránea utilizada para los enriquecimientos bacterianos fue tomada del acuífero localizado en el área de confinamiento de desechos con cromatos localizada a $21^\circ 04' 27''\text{N}$, $101^\circ 79' 10''\text{W}$ en León Guanajuato, México.

VII.3 Aislamiento de microorganismos de agua subterránea.

Una muestra de agua colectada a 30m de profundidad del acuífero contaminado por $\text{Cr}(\text{VI})$ fue inyectada en un tubo anaeróbico con medio NBAF (por sus siglas en inglés, Nutrient broth acetate-fumarate) (Coppi et al., 2001) suplementado con 0.05% de extracto de levadura y 0.5mM de $\text{Cr}(\text{VI})$. Este cultivo fue incubado a 30°C para enriquecer los microorganismos resistentes a $\text{Cr}(\text{VI})$. A partir del cultivo enriquecido se realizaron ensayos para estudiar crecimiento y reducción con diferentes concentraciones iniciales de $\text{Cr}(\text{VI})$. Por otra parte, diluciones seriadas del cultivo enriquecido fueron esparcidas sobre medio sólido NBAF con 2mM de $\text{Cr}(\text{VI})$. Las placas de cultivo fueron incubadas a 30°C . Las colonias obtenidas fueron purificadas mediante varios pases de estriado en placas NBAF-agar y finalmente preservadas a -65°C en glicerol al 20%. El gen rRNA 16S de las cepas aisladas fue amplificado y secuenciado utilizando los oligonucleótidos universales 27F y 1492R (Lane, 1991). Las secuencias obtenidas fueron

ensambladas utilizando Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), a continuación, fueron analizadas en CHIMERA-CHECK (<http://rdp.cme.msu.edu>) y depositadas en el GenBank (KU951443 a KU951465). Las secuencias con mayor homología obtenidas del GenBank fueron utilizadas para realizar la reconstrucción filogenética utilizando el método de Maximum Likelihood basado en el modelo Kimura 2-parameters (Kimura, 1980), con un test 1000 réplicas de bootstrap.

VII.4 Secuenciación de los genes *parC*, *gyrA* y *rpoB*.

Los genes *parC*, *gyrA* y *rpoB* de la cepa AqSCr fueron amplificados utilizando los pares de oligonucleótidos *parC-R1* y *parC-A*, *gyrA-A* y *gyrA-C* (Brisse y Verhoef, 2001) y *rCM31b* y *fCM7* (Mollet et al., 1997) respectivamente. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en un dispositivo Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer/ABI PRISM (Unidad de síntesis y secuenciación, IBT, UNAM). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas utilizando Bioedit, analizadas en CHIMERA-CHECK (<http://rdp.cme.msu.edu>). Posteriormente fueron comparadas mediante BLAST en el servidor NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

VII.5 Métodos analíticos.

La densidad celular fue determinada espectrofotométricamente a 600nm. La concentración de Cr(VI) fue determinada mediante la reacción con difenilcarbazida en solución ácida, seguida de la medición de la absorbancia a 540nm (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation 1999). El Fe(II) fue cuantificado mediante la reacción con ferrozina (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p*, *p'*-disulfonic acid monosodium salt), seguida de la medición de la absorbancia a 562nm (Viollier et al., 2000). Los ácidos orgánicos citrato, acetato y formato fueron cuantificados a 210nm en un equipo Agilent series 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Albany, NY) utilizando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA) para su separación. La concentración de proteína de los extractos celulares fue cuantificada por el método de Bradford (1976).

VII.6 Análisis estadísticos.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los resultados fueron expresados como medias \pm desviación estándar. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA)

utilizando Minitab 17 (<https://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando la probabilidad (p-value) fue menor que 0.05.

VII.7 Resistencia a Cr(VI) en medio líquido.

K. pneumoniae AqSCr fue cultivada durante 24 horas a 30°C y 250 rpms en el medio líquido correspondiente adicionado con diferentes concentraciones de Cr(VI). De cada cultivo se realizaron diluciones seriadas, de las cuales 10µl se esparcieron sobre placas de Petri con LB sólido y se incubaron a 30°C por 48 hrs para determinar las unidades formadoras de colonia (UFCs) de cada cultivo.

VII.8 Concentración mínima inhibitoria de diferentes metales.

El crecimiento de *K. pneumoniae* AqSCr fue ensayado en microplacas con medio LB-agar adicionado con concentraciones ascendentes de K₂Cr₂O₇, CoCl₂, ZnSO₄, CuCl₂, AgNO₃, KAl(SO₄)₂, NiSO₄, Na₂SeO₄, NaHAsO₄, NaAsO₂, CdCl₂ y Na₂PdCl₄. La concentración mínima inhibitoria de cada metal fue determinada como aquella en la que no se observó crecimiento después de 10 días de incubación.

VII.9 Preparación de extractos celulares para cuantificar actividad reductasa de Cr(VI).

Cultivos de *K. pneumoniae* AqSCr fueron cosechados después de 24 horas de incubación, para ello, fueron centrifugadas a 4000g por 15 min y a continuación, se realizaron dos lavados con Tris-HCl 10mM (pH 7) frío, posteriormente se realizó la lisis celular aplicando 900psi en una prensa French. El lisado celular fue centrifugado a 1460g durante 15 min para obtener el extracto celular crudo libre de células no lisadas. Para realizar el fraccionamiento celular, el extracto crudo fue ultracentrifugado durante 143 min a 45000 rpms a 4°C en un rotor SW 50.1. El sobrenadante (fracción soluble) fue transferido a un tubo anaeróbico y la pastilla (fracción membranal) fue re-suspendida en solución Tris-HCl 10mM (pH 7). 1ml de la fracción soluble fue transferido a un tubo de ultrafiltración (Amicon Ultra 10K y 50K; Millipore, Germany) y centrifugado a 11,000g a 4°C durante 10 min para separar proteínas (Fracción retenida) de posibles transportadores de electrones solubles.

VII.10 Cuantificación de la actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares.

La actividad reductasa de Cr(VI) fue ensayada anaeróbicamente a 30°C en un volumen de 2.2ml, la mezcla de reacción incluyó 100µl de extracto celular, 100µl de NADH 4.4mM (donador de electrones) y 0.025mM de K₂Cr₂O₇ (aceptor de electrones) en solución 10mM Tris-HCl pH 7, la concentración de Cr(VI) fue monitoreada como se describe en la sección de métodos analíticos.

VII.11 Microscopía de transmisión electrónica.

Cultivos de *K. pneumoniae* AqSCr en medio citrato férrico fueron cosechados a las 192 horas de incubación (después de la separación de fases). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5%, lavadas con cacodilato de sodio al 0.16M pH=7.2 y deshidratadas gradualmente con etanol al 70% hasta etanol absoluto. Posteriormente, se realizó la inmersión en óxido de propileno-Epon para realizar cortes de 60nm. Cortes con y sin tratamiento con acetato de uranilo al 3% fueron examinados bajo un microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM 900 (Zeiss, Oberkochen, Germany) a 80kV. Las células de cultivos en LB con Cr(VI) o U(V) fueron tratadas de manera similar, pero se utilizaron cultivos de 24 horas de incubación, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 3% y los cortes fueron examinados bajo un microscopio de transmisión electrónica Zeiss LIBRA 120 (Zeiss, Oberkochen, Germany) a 120 kV.

VII.12 Secuenciación, ensamble y anotación del genoma completo de *K. pneumoniae* AqSCr.

A partir de cultivo fresco de *K. pneumoniae* AqSCr se purificó DNA total con el kit Master Pure (Epicentre, Madison, WI, USA). A partir de éste, fueron generadas bibliotecas de extremos pareados (paired-end y mate-pair), la secuenciación fue realizada en un dispositivo Illumina GAIIX (Unidad de secuenciación masiva de ADN, Instituto de Biotecnología UNAM). Las lecturas obtenidas fueron filtradas y ensambladas mediante Spades 3.0.0 (Nurk et al., 2013) utilizando como genoma de referencia el de *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Posteriormente la anotación funcional de los genes predichos fue realizada utilizando el servidor RAST (Rapid Anotación using Subsystem Technology; <https://rast.nmpdr.org>) (Aziz et al., 2008).

VII.13 Análisis del genoma.

El análisis del genoma fue realizado en el servidor SEED ([http:// rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi](http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi)). Los genes con homología a genes involucrados en resistencia y reducción de metales fueron identificados mediante el análisis de la anotación automática y mediante búsqueda con secuencias específicas utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los análisis con secuencias de aminoácidos fueron realizados con el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013).

VII.14 Perfil plasmídico de *K. pneumoniae* AqSCr.

Para obtener el perfil plasmídico de *K. pneumoniae* AqSCr fue utilizada la técnica de Eckhardt (1978) que consiste en realizar una electroforesis en gel de agarosa, realizando una lisis suave dentro de los pozos del gel. Para ello 0.5 ml de células de *K. pneumoniae* AqSCr fueron adicionadas con 1ml de lauril sarcosina al 0.1% en TE 50:20 y posteriormente con 40µl ficol 20% en TE 10:1, la mezcla fue incubada a 4° C durante 15 min, a continuación, fueron adicionados 20µl de lisozima. 20µl de la mezcla fueron cargados en un gel al 0.75% de agarosa en TBE 1X (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM) (cargado con 15µl de SDS 10% en H₂O- Xilen cianol en los pozos y pre-corrido con el polo positivo en la parte superior de los pozos del gel durante 15min a 100 volts) a continuación se aplicó una corriente de 40 volts durante 90 min y posteriormente una de 100 volts durante 12 horas. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV, en un trans-iluminador.

VII.15 Eliminación de genes por doble recombinación homóloga en *K. pneumoniae* AqSCr.

De manera general esta estrategia consistió en remplazar una región cromosomal por un gen de resistencia a un antibiótico. Para cada gen eliminado, se obtuvo un producto de PCR híbrido compuesto por el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios de recombinación FRT y por secuencias de 400pb a 600pb correspondientes a las regiones río arriba y río abajo del gen blanco (Figura 2). Para ello fueron utilizados los oligonucleótidos indicados en el apéndice 1. El producto de PCR híbrido fue introducido por electroporación a *K. pneumoniae* AqSCr previamente transformada con el plásmido pIJ790ΩSp (que contiene el sistema red recombinasa del fago lambda). Posteriormente, las mutantes fueron seleccionadas en placas de LB con km 30mg/µl y analizadas mediante PCR para confirmar la eliminación del gen blanco. El vector

pIJ790ΩSp fue eliminado cultivando las mutantes a 42°C durante 12 horas. Finalmente, el casete de resistencia a kanamicina fue eliminado transformando las mutantes con el plásmido pCP20-ΩSp el cual contiene el gen de la FLP recombinasa, la cual cataliza la recombinación entre las regiones FRT que flanquean el casete de kanamicina (Figura 3). Para generar las mutantes múltiples este proceso fue repetido de manera secuencial utilizando el producto de PCR híbrido correspondiente para cada gen blanco. Este protocolo fue adaptado del descrito originalmente por Datsenko y Wanner 2000. En dicho protocolo las regiones que flanquean el casete de kanamicina (homólogas a los extremos de gen blanco) son de alrededor de 40pb, en el caso de *Klebsiella* se requiere que estos extremos sean de 400 a 600pb de longitud para que ocurra la recombinación (Wei et al., 2012).

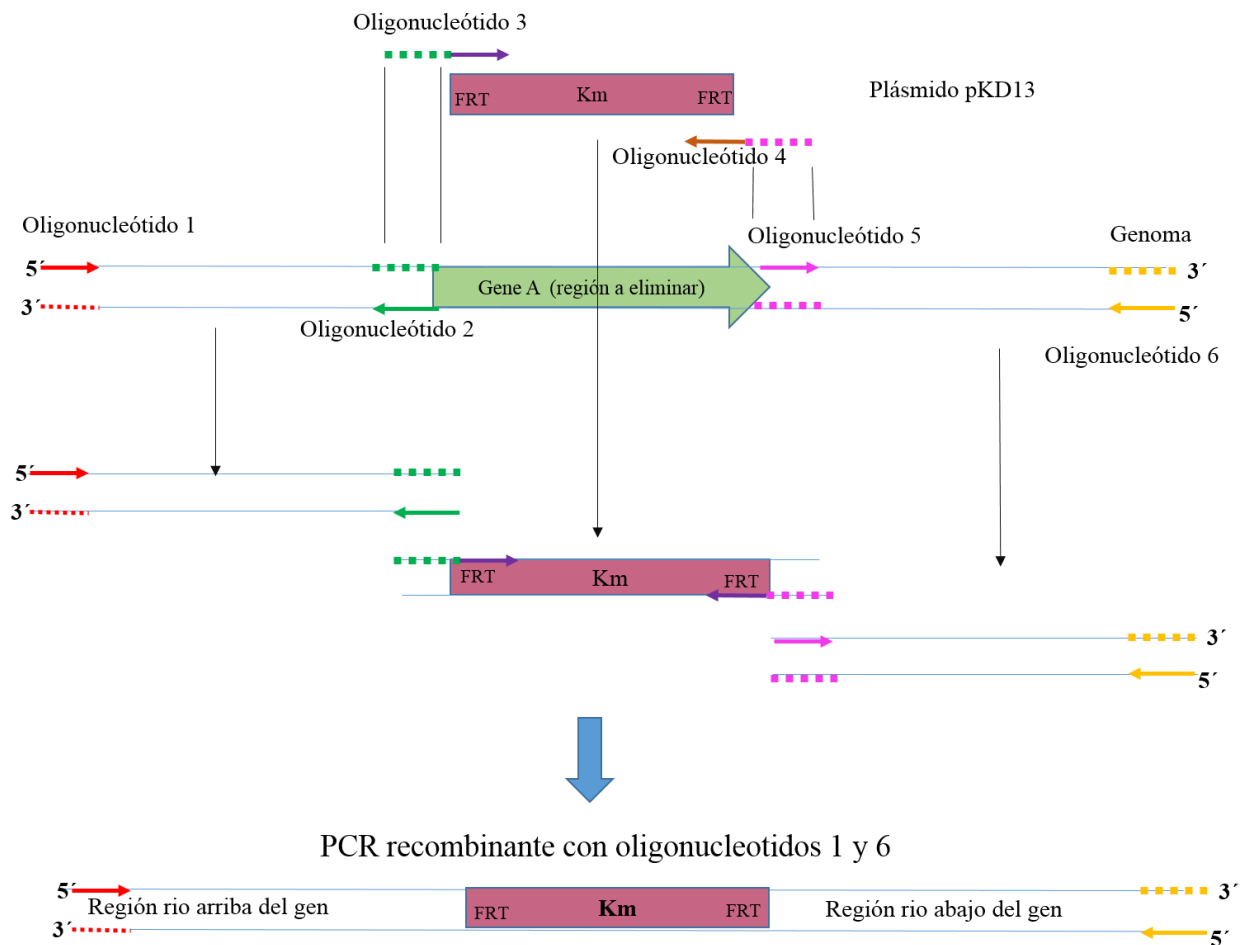


Figura 2. Estrategia experimental para generar el producto de PCR recombinante para la deleción de genes en *K. pneumoniae* AqSCr.

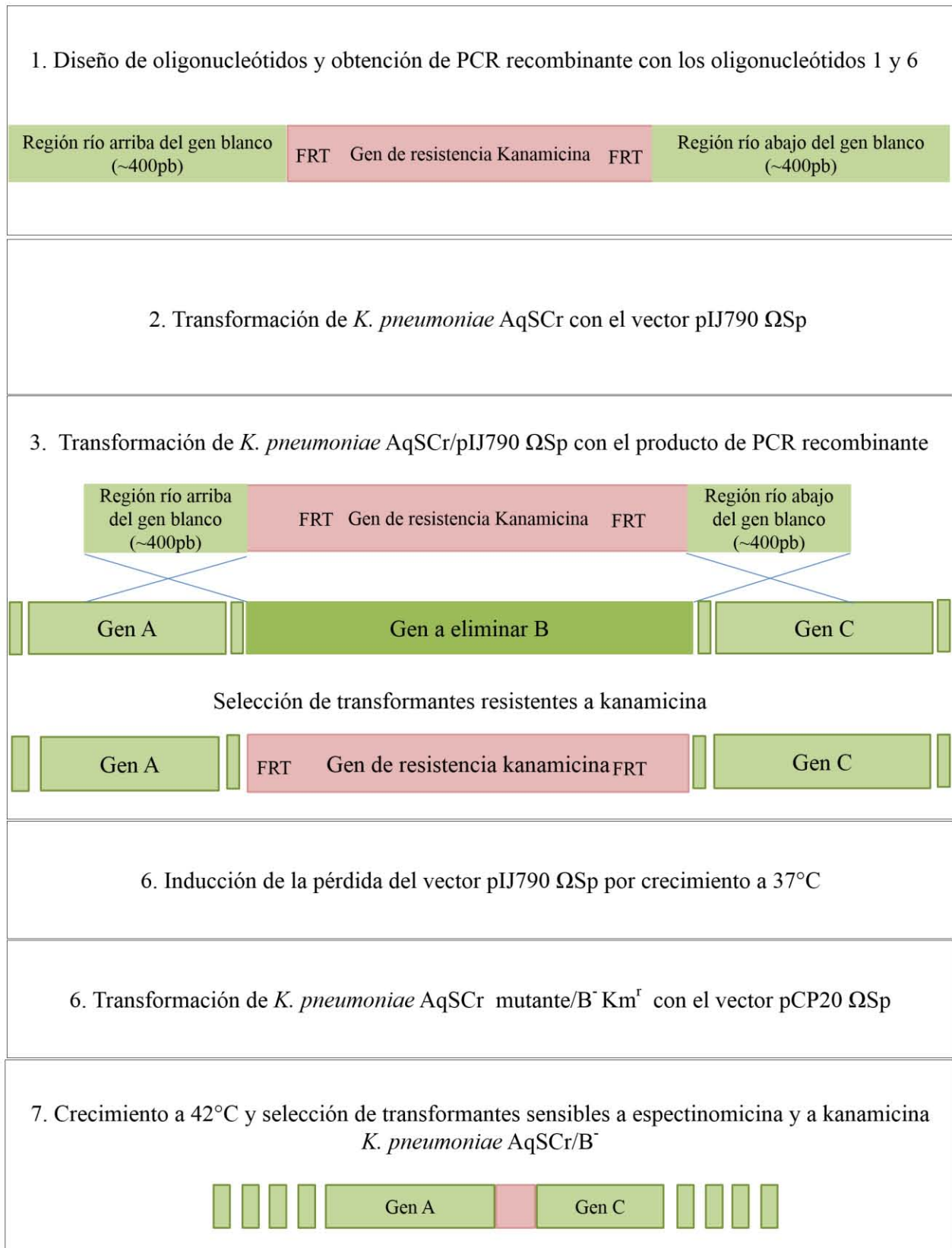


Figura 3. Estrategia experimental para la eliminación de genes en *K. pneumoniae* AqSCr.

VII.16 Construcción del vector pIJ790 Ω Sp.

El vector pIJ790 contiene un origen de replicación sensible a temperatura (sólo se replica a 30°C) y posee el sistema Red que incluye los genes γ , β y exo , cuyos productos son llamados Gam, Bet y Exo, respectivamente (Gust et al., 2003) (Figura 4). Gam inhibe la exonucleasa RecBCD del hospedero de modo que Bet y Exo pueden tener acceso a los extremos del fragmento de DNA lineal y promover recombinación. Adicionalmente, contiene el gen cat de resistencia a cloranfenicol. Ya que *K. pneumoniae* AqSCr es resistente a cloranfenicol fue necesario introducir en pIJ790 el gen de resistencia a espectinomicina. Para ello, se realizó la ligación entre el pIJ790 linearizado [digerido en el sitio *NheI* y tratado con Klenow (Fermentas)] y el fragmento Ω Sp (2000pb) [purificado de la digestión del pHP45 Ω Sp con la enzima *SmaI* (Biolabs®)]. La ligación pIJ790 Ω Sp fue introducida en *E. coli* MC1061 por electroporación. El plásmido fue purificado y transformado en *K. pneumoniae* AqSCr.

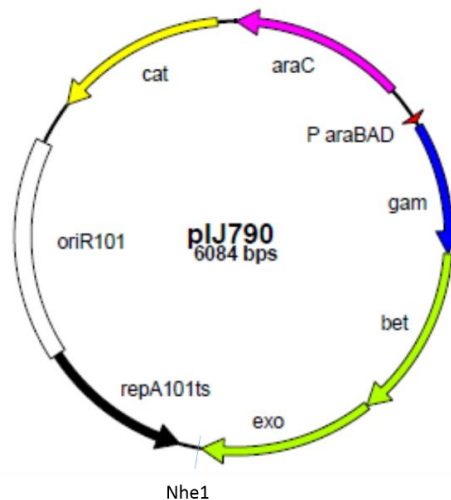


Figura 4. Mapa del vector pIJ790. *araC* codifica el activador por arabinosa, *bet* codifica una proteína de unión a DNA de cadena sencilla, *cat* codifica un determinante de resistencia a cloramfenicol, *exo* codifica para una exonucleasa que junto con Bet promueve la recombinación, *gam* codifica una proteína inhibidora de la exonucleasa V. *oriR101* es el origen de replicación y *P araBAD* es un promotor inducible por arabinosa, *repA101ts* es un origen de replicación sensible a temperatura.

VII.17 Construcción del vector pCP20 Ω Sp.

El vector pCP20 fue utilizado para la eliminación del gen resistencia a kanamicina ya que posee un gen que codifica para la FLP recombinasa bajo un promotor inducible por temperatura (Cherepanov y Wackernagel, 1995). Este vector también posee un inicio de replicación sensible a

temperatura y como medio de selección el gen *cat* de resistencia a cloranfenicol, por ello fue necesario introducir el casete de resistencia a espectinomicina. Para ello, se realizó la ligación entre el pCP20 Ω Sp linearizado (digerido en con la enzima *SmaI* y purificado) y el fragmento Ω Sp (2000pb) [purificado de la digestión del pHP45 Ω Sp (Prentki y Krisch, 1984) con la enzima *SmaI* (Biolabs®)]. La ligación pCP20 Ω Sp fue introducida en *E. coli* MC1061 por electroporación. El plásmido fue purificado para poder utilizarlo en *K. pneumoniae* AqSCr.

VII.18 Preparación de células de *K. pneumoniae* AqSCr para electrotransformación.

K. pneumoniae AqSCr fue cultivada en medio LB mitad de sales (NaCl 5g/l) con EDTA 0.7mM a 30°C y 250rpms. Las células fueron cosechadas al inicio de fase exponencial (D.O. 600= 0.1 a 0.250) mediante centrifugación a 4000g a 4°C durante 20 min. A continuación, se realizaron 3 lavados con glicerol al 10% a 4°C, finalmente las células fueron resuspendidas en glicerol al 10% y preservadas a -65°C hasta su electrotransformación. Para la preparación de células *K. pneumoniae* AqSCr pIJ790 Ω Sp se adicionó arabinosa al 4% al cultivo (para inducir la expresión del sistema red recombinasa), el restó del procedimiento se realizó de la misma manera.

VII.20 Adaptación metabólica de *K. pneumoniae* AqSCr a Cr(VI).

K. pneumoniae AqSCr fue sub-cultivada dos veces en medio de cultivo LB pH 8 (ajustado con H₂CO₃·H₂O) con y sin 11mM de Cr(VI). Estos cultivos fueron utilizados para inocular medio LB pH 8 con 11mM de Cr(VI) (por triplicado) para monitorear crecimiento a 30°C y 250rpms. Las unidades formadoras de colonia en los cultivos fueron determinadas a las 0, 3, 6, 9, 25 y 27 horas de incubación mediante cultivo de diluciones seriadas en placas de medio LB sólido a 30°C.

VII.21 Aislamiento, purificación y secuenciación de RNA mensajero de *K. pneumoniae* AqSCr.

A partir de cultivos de *K. pneumoniae* AqSCr crecidos en LB a pH 8 con y sin 11mM de Cr(VI) a $0.64 \pm .05$ y $1.05 \pm .05$ de absorbancia a 600 nm respectivamente y tratados con RNAlater® (Thermo Fisher Scientific) se realizó la purificación del RNA total utilizando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Posteriormente el RNA total fue tratado con DNase I (Thermo Fisher Scientific) para eliminar totalmente el DNA y finalmente fue tratado con la enzima Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (Epicentre) para eliminar gran parte del RNA ribosomal. Tres replicas biológicas fueron preparadas para cada condición [en presencia y en ausencia de Cr(VI)].

Finalmente, un total de 6 bibliotecas pareadas (Pair-End) fueron realizadas y secuenciadas utilizando un dispositivo Illumina GAIIX [Unidad de secuenciación masiva, Instituto de Biotecnología, UNAM (UUSMD-IBT, UNAM)].

VII.22 Procesamiento bioinformático de los datos de RNAseq.

Las lecturas de cada una de las 6 bibliotecas Pair-End fueron mapeadas sobre el genoma de *K. pneumoniae* AqSCr utilizando como referencia los marcos abiertos de lectura (ORFs) en el genoma predichos por RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). Los análisis de correlación entre las bibliotecas fueron realizados con el paquete R (<http://www.R-project.org>) de Bioconductor (Gentleman et al., 2004). Se realizó la asignación de número de lecturas en cada ORF utilizando la función `coverageBed` del software `bedtools` (<http://bedtools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/coverage.html>). Posteriormente, se realizó en cálculo de la expresión diferencial (ED) utilizando tres métodos DeSeq, edgeR y NoiSeq (Anders y Huber, 2010; Robertson et al., 2010, Tarazona et al., 2011). Posteriormente, de los resultados de los tres métodos se seleccionaron los ORF con un valor de logaritmo base dos de nivel de cambio (Log_2NC) \geq a 1.5. A continuación, se realizó un análisis de intersección obteniendo los genes que de acuerdo a los tres métodos tienen un $\text{Log}_2\text{NC} \geq$ a 1.5 con una probabilidad mayor al 95% de estar diferencialmente expresados. Las secuencias proteicas de los ORF diferencialmente expresados fueron analizadas para la asignación de KOs (KEGG orthology), fueron divididas en categorías funcionales, posteriormente se realizó la reconstrucción de las vías metabólicas utilizando el software GhostKoala de Kegg (<http://www.kegg.jp/ghostkoala/>).

VII.23 Validación de los datos de RNAseq: Síntesis de cDNA y qRT-PCRs.

A partir 1 μ g de RNA libre de DNA se realizó la síntesis de cDNA con una mezcla de los oligonucleótidos reversos de cada uno de los genes a analizar (Tabla 1) y utilizando la enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific®) bajo las condiciones especificadas por el fabricante. Con el cDNA sintetizado y los oligonucleótidos de la Tabla 1 se realizaron los qPCRs utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X).

Los ensayos de qPCR fueron realizados en un instrumento de PCR en tiempo real Quant Studio 12K Flex System (Life Technologies, Foster City, CA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Incubación a 95°C 10 min seguida de 40 ciclos de 15s a 95°C y 1min a 60°C. Las

reacciones con cada par de oligonucleótidos fueron realizadas por triplicado utilizando cDNA de dos replicas biológicas de cada condición (con y sin 11mM Cr(VI) en LB pH 8). Finalmente fueron calculados los promedios de umbral de ciclo y los valores de desviación estándar. Los niveles de expresión relativa fueron calculados por el método $\Delta\Delta C_T$, normalizando con los valores de expresión de *kp708* (Fleige et al., 2006).

Tabla 1. Oligonucleótidos para validación de transcriptoma	
Oligonucleótidos 5'	Oligonucleótidos 3'
Kpn4050f 5'gtaaacacctggaagtgga 3'	Kpn4050r 5'ggataaacggcagctgaatc 3'
Kpn14f 5'ctgggttcctctcctctt 3'	Kpn14r 5'cggaaccagcgagataa3'
Kpn598f 5'tggtagtgcgctatcagcat3'	Kpn598r 5'ccatgccttaacgaacgatt 3'
Kpn2076f 5'ttcatcaacggcttcttg 3'	Kpn2076r 5'gattcggtcgtaactggtc 3'
Kpn3165f 5'atcgcatggtgatgatga3'	Kpn3165r 5'gtatccaccgctcaaaatc 3'
Kpn3746f 5'agagcaccacatacaagg 3'	Kpn3746r 5'ttgagtttctggcattgacg 3'
Kpn4428f 5'gttagcgatgctggctgtct 3'	Kpn4428r 5'accacttgacagttttctgc 3'
Kpn635f 5'accatgaccgtctggatctc 3'	Kpn635r 5'cgcatcacctgatgtttac 3'
Kpn602f 5'gctgctggatagcggaaaag 3'	Kpn602r 5'cgattcaccagtttgctt 3'
Kpn2087f 5'accaggtgtggcttatcacc 3'	Kpn2087r 5'accagaatcatgccacatag 3'
Kpn4689f 5'ggatgatacggaaaacagc 3'	Kpn4689r 5'tcagcatgatgtaggccaact 3'
Kpn4174f 5'gaaaccaactccgaaacaa 3'	Kpn4174r 5'acggtcaggatcatccactc 3'
Kpn708f 5'gagctgaacggcaaggttac 3'	Kpn708r 5'tagaacggggtctggtcaag 3'
Kpn3531f 5'gctggcctactgcaaagaga 3'	Kpn3531r 5'ttggcgaataatcctcgat 3'

VII.24 Análisis de resistencia a arsenato y arsenito en las mutantes *ars*.

El crecimiento de las diferentes cepas fue evaluado en LB con 20, 50, 100, 200 y 400mM de NaHAsO₄ y 6, 7, 8, y 9mM de NaAsO₂. Para ello 10μl de suspensiones celulares a 0.5 de densidad óptica a 600nm de cada cepa fueron inoculadas sobre las placas de LB-agar con el metal y fueron incubadas a 30°C.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VIII.1 Ensayos en microcosmos de bioestimulación de suelo contaminado con Cr(VI) y aislamiento de microorganismos de suelo y agua subterránea.

En la primera parte de este proyecto fueron realizados estudios con muestras de suelo para determinar el potencial de los microorganismos indígenas para llevar a cabo la reducción de Cr(VI), utilizando acetato como única fuente de carbono y de electrones. Además, se realizó el aislamiento de microorganismos resistentes y reductores de Cr(VI), tanto de suelo como de agua subterránea (Ver artículo en la página 29; Lara et al., 2016).

A) Características del sitio de estudio.

Como se mencionó, el sitio de estudio corresponde a un depósito de residuos industriales con Cr(VI) localizado en León Guanajuato (21°04'27"N, 101°79'10"W) (Figura 5, ANEXO 3). En este lugar, las concentraciones de Cr(VI) en suelo varían tanto horizontal como verticalmente y en agua subterránea varían de acuerdo a la localización del piezómetro utilizado para el muestreo (ANEXO 3; Villalobos-Aragón et al., 2012). Para nuestros estudios se tomó una muestra de suelo a una profundidad de 30-40cm a 6 metros de la pila de residuos con Cr(VI). Dicha muestra, presentó una concentración de Cr(VI) de 1768.8 ± 47.7 mg/kg, un pH de 9.17 y una conductividad eléctrica de $12,347,5 \pm 281.94$. De acuerdo a estos resultados, el suelo muestreado presentó una concentración de Cr(VI) tres veces la concentración límite permitida para uso de suelo industrial (500mg/kg, NOM-147- SEMARNAT_SSA1-2004; <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/PP03/DO950.pdf>), además, es altamente alcalino y salino por lo que puede ser considerado un ambiente extremo para los microorganismos. Otras características fisicoquímicas del suelo en el sitio de estudio se muestran en el ANEXO 1.

B) Bioestimulación con acetato de muestras de suelo contaminado con Cr(VI).

Las altas concentraciones de Cr(VI) en el sitio de estudio durante las últimas décadas, han representado una fuerte presión selectiva sobre los microorganismos indígenas. Debido a esto, se espera que tanto los microorganismos presentes en suelo como en agua subterránea posean mecanismos de reducción y/o resistencia a Cr(VI). En varios estudios se ha propuesto que los

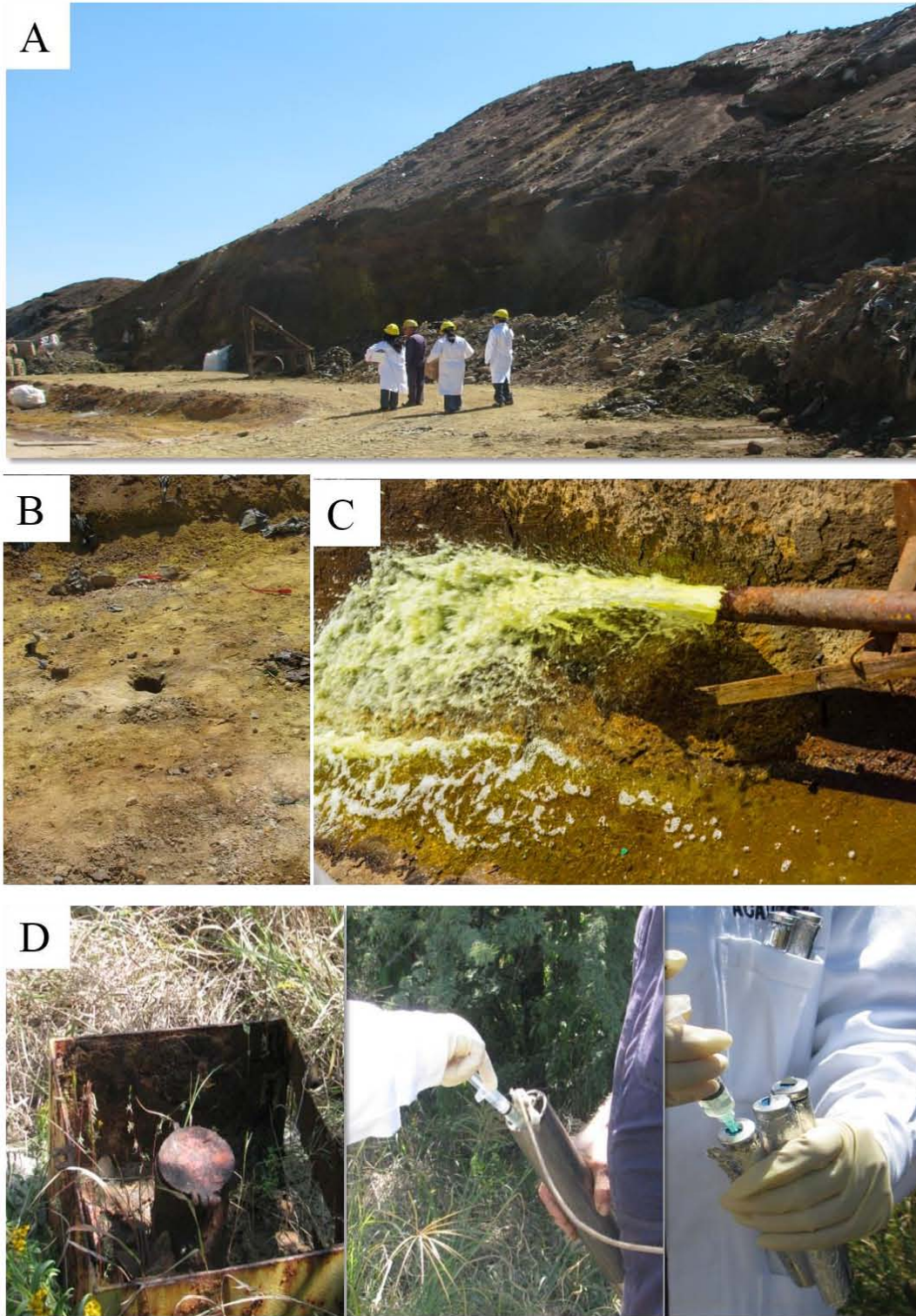


Figura 5. Muestreo en el sitio de depósito de residuos con Cr(VI). A) Montaña de residuos. B) Pozo de muestreo de suelo. C) Agua bombeada del acuífero “la hulera”. D) Muestreo de agua subterránea del piezómetro # 2, su localización se muestra en el ANEXO 2.

microorganismos indígenas reductores de Cr(VI) pueden ser bioestimulados *in situ* mediante adición de diversos donadores de electrones. En este estudio, el acetato fue elegido como donador de electrones debido a que es un intermediario clave en la degradación de materia orgánica en suelo (Lovley y Phillips, 1989; Lovley y Phillips, 1986), además, existen varios reportes de microorganismos capaces de acoplar la oxidación de acetato a la reducción de aceptores de electrones (alternativos al oxígeno) incluyendo Cr(VI) (Anderson et al., 2003; Lovley, 1993; Xu et al., 2012). Los ensayos de bioestimulación fueron realizados en microcosmos en el laboratorio por triplicado, para ello, 15gr de suelo fueron adicionados con 30ml de acetato de sodio 40mM, bajo una atmósfera de N₂ y fueron incubados a 30°C, sin agitación y en oscuridad. Los controles fueron tratados de la misma manera, estos consistieron de suelo esterilizado adicionado con acetato (control abiótico) y suelo sin esterilizar, adicionado únicamente con agua (control sin donador de electrones). La bioestimulación resultó en la reducción microbiana total de Cr(VI) en 25 días (Figuras 1 y 2; Lara et al., 2016). Por otra parte, en ninguno de los controles se detectó reducción, confirmando que en los ensayos la reducción es resultado de la actividad microbiana estimulada por la adición de acetato (Figura 1, Lara et al., 2016). Posteriormente, con el objetivo de estudiar la diversidad microbiana presente en el suelo estudiado, se extrajo DNA total de una muestra de suelo. A partir de este DNA, se realizó la amplificación del gen 16S rRNA, finalmente los productos de PCR fueron clonados y secuenciados. En total 80 clonas fueron secuenciadas, de las cuales 47 pertenecen a *Halomonas* spp., 28 a *Bacillus* spp., 2 a *Herbaspirillum* spp., y 3 a *Nesterenkonia* spp. Estudios posteriores de diversidad microbiana realizados mediante la secuenciación masiva del gen 16S rRNA proveniente de muestras de suelo de este sitio, confirman que el género *Halomonas* es el más abundante, y es posible que juegue un papel importante durante el proceso de bioestimulación, ya que existen reportes de *Halomonas* reductoras de Cr(VI) (Mabrouk et al., 2014).

C) Aislamiento de microorganismos de suelo y agua subterránea contaminados por Cr(VI).

Las estrategias utilizadas para la biorremediación de suelos contaminados con metales, usualmente implican la inyección de donadores de electrones hacia el agua subterránea para ser distribuidos en el área mediante el flujo de ésta. Por ello, tanto los microorganismos presentes en suelo como los presentes en el agua subterránea, son de gran relevancia en los procesos de

biorremediación y su aislamiento puede permitir el estudio de factores que limitan los procesos de bioestimulación, incluyendo los mecanismos microbianos de resistencia y reducción del Cr(VI).

Para realizar el aislamiento de microorganismos de suelo se partió de una muestra bioestimulada con acetato de donde se realizó el aislamiento de bacterias resistentes a Cr(VI) en medio de cultivo anaeróbico NBAF, pH 9, adicionado con 2mM de Cr(VI). De este aislamiento, un sólo tipo morfológico fue obtenido. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, dicho aislado se identificó como una *Halomonas* sp., esta bacteria presentó una alta resistencia a Cr(VI) (>32mM) en medio LB pH 9 aeróbico. La caracterización de este microorganismo se está realizando actualmente dentro del grupo de investigación de la Dra. Katy Juárez.

Por otra parte, de una muestra de agua subterránea con altas concentraciones de Cr(VI) (52.3mg/l), tomada a 30 metros de profundidad (a través del piezómetro #2, Figura 5D, ANEXO 2) se realizó el enriquecimiento de bacterias resistentes y reductoras de Cr(VI) en medio NBAF anaeróbico con 500µM de Cr(VI) (Figuras 5 y 6, Lara et al., 2016). El enriquecimiento obtenido mostró la capacidad de reducir Cr(VI), por lo que, a partir de éste, se realizó el aislamiento de diferentes microorganismos, los cuales fueron identificados mediante la secuenciación de su gen rRNA *16S* (Figura 7; Lara et al., 2016).

Como resultado de esta primera parte del proyecto, se publicó el artículo titulado “Acetate biostimulation as an effective treatment for cleaning up alkaline soil highly contaminated with Cr(VI)”, en el que se concluye que el acetato es efectivo en bioestimular la reducción de Cr(VI) durante los ensayos en microcosmos, por lo que tiene un gran potencial para ser utilizado para bioestimulación *in situ* en nuestro sitio de estudio y en otros lugares con características similares.

D) Artículo: “Acetate biostimulation as an effective treatment for cleaning up alkaline soil highly contaminated with Cr(VI)”.

Acetate biostimulation as an effective treatment for cleaning up alkaline soil highly contaminated with Cr(VI)

Paloma Lara¹ · Enrique Morett^{1,2} · Katy Juárez¹

Received: 28 March 2016 / Accepted: 5 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Stimulation of microbial reduction of Cr(VI) to the less toxic and less soluble Cr(III) through electron donor addition has been regarded as a promising approach for the remediation of chromium-contaminated soil and groundwater sites. However, each site presents different challenges; local physicochemical characteristics and indigenous microbial communities influence the effectiveness of the biostimulation processes. Here, we show microcosm assays stimulation of microbial reduction of Cr(VI) in highly alkaline and saline soil samples from a long-term contaminated site in Guanajuato, Mexico. Acetate was effective promoting anaerobic microbial reduction of 15 mM of Cr(VI) in 25 days accompanied by an increase in pH from 9 to 10. Our analyses showed the presence of *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Nesterenkonia/Arthrobacter*, and *Bacillus* species in the soil sample collected. Moreover, from biostimulated soil samples, it was possible to isolate *Halomonas* spp. strains able to grow at 32 mM of Cr(VI). Additionally, we found that polluted groundwater has bacterial species different to those found in soil samples with the ability to resist and reduce chromate using acetate and yeast extract as electron donors.

Keywords Chromate · Biostimulation · Soil and groundwater pollution

Introduction

The uncontrolled generation of industrial wastes with Cr(VI) and their improper disposal has resulted in pollution of several soils and aquifers. Hexavalent chromium is a dangerous contaminant due to its strong oxidizing properties. It is highly soluble and therefore, very mobile in groundwater systems and it can be transported into the cells through sulfate permeases where it exerts mutagenic and carcinogenic effects (Roberts and Marzluf 1971; Messer et al. 2006; Zhitkovich 2011). Several bacterial species have been found to possess mechanisms to promote Cr(VI) reduction to the less-soluble Cr(III) (Chovanec et al. 2012; Field et al. 2013; Garbisu et al. 1998; He et al. 2010; Horton et al. 2006), which cannot be transported across cell membranes and it is retained by soil as Cr(III) hydroxide precipitates (Brose and James 2010; Sass and Rai 1987).

The microbial reduction of Cr(VI) can potentially be promoted by the addition of electron donors like acetate, lactate, or molasses as a safe and cost-effective technology alternative to the expensive traditional physicochemical methods of Cr(VI) reduction to treat contaminated soils, aquifers, and sediments. This technology has been shown to be successful in diverse soils and aquifers (Brodie et al. 2011; Horton et al. 2006; Somenahally et al. 2013; Varadharajan et al. 2015). However, each polluted site has its own challenges; the efficiency of different electron donors depends on the indigenous microbial communities and the physicochemical characteristics of each site. Therefore, laboratory studies are required to determine the efficiency of the electron donors to be tested in a specific soil.

Editorial responsibility: Robert Duran

✉ Katy Juárez
katy@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Present address: Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, 14610 México, Distrito Federal, Mexico

Leon Valley, located in Guanajuato, Mexico, has several sources of chromium contamination, including a deposit of chromite ore product residues piles (COPRP), which has given rise to very high concentrations of Cr(VI) in nearby soil and groundwater. Soil pollution in this area has been continually monitored, reporting concentrations that surpass the permissible limit for industrial land in Mexico (500 mg/kg, NOM-147-SEMARNAT_SSAI-2004) (Armienta et al. 1996). Cr(VI) in groundwater has also been monitored since its detection in 1975, through wells and piezometers. Chromium concentration fluctuates in an area of 5 km² in the vicinity of the COPRP and it has been reported above the limit permitted for drinking water (0.05 mg/l), reaching record values up to 95.1 mg/l in the last decades (Armienta and Rodríguez-Castillo 1995, Villalobos et al. 2012).

In this study, we present microcosm assays in order to explore the effectiveness of sodium acetate in promoting the microbial Cr(VI) reduction in soil samples from this long-term contaminated landfill in León, Guanajuato, Mexico. Additionally, microorganisms able to resist Cr(VI) and some of them also reduce Cr(VI) to Cr(III), were isolated from these polluted soils and groundwater for further characterization.

Materials and methods

Soil sampling, processing, and characterization

Soil sample used for biostimulation assays was taken at 30 to 40 cm depth, at 6 m away in direction north from a chromite ore product residue pile (COPRP), located in León, Guanajuato, Mexico (21° 04' 27" N, 101° 79' 10" W). As control, one sample was taken at the same depth, 1 km away from the residues pile in the northeast direction. Samples were grounded, sieved (#20 mesh), homogenized, and stored in glass bottles at 4 °C until processing.

For chromate quantification, alkaline digestion of soil was performed. First, dissolve the Cr(VI) by mixing 5 g of soil with 25 ml of NaOH 0.5 M/Na₂CO₃ 0.28 M, and heat at 100 °C for 1 h (Vitale et al. 1994). After the mixture was filtered and adjusted to 100 ml, Cr(VI) was quantified by polarography. For pH determination of soil samples, 5 g of soil were mixed with 50 ml of distilled water, vortex for 1 h, then stand for 1 h before pH was determined with an Orion® 2-Star Bench top pH Meter (Thermo Scientific). Soil electrical conductivity was determined with 5 g of soil mixed with 10 ml of distilled water, and agitated 1 h. Finally, electrical conductivity was measured with a pH/CON 510 bench top meter (Oakton).

Microcosm biostimulation assays

Biostimulation assays were carried out by triplicate in sterile glass bottles with 15 g of soil and 30 ml of sterile distilled

water. The bottles were sealed with a rubber stopper, purged by injecting N₂, and maintained at room temperature for 72 h. After this time, 600 µl of anaerobic sterile sodium acetate 2 M solution were added to each bottle, except for the controls. Abiotic reduction was assessed by autoclaving soil at 120 °C for 1 h and treated in the same way as with acetate. Finally, all microcosm assays were incubated at 30 °C.

Analytical methods

The microcosm assays were sampled periodically to monitor pH, Cr(VI), and acetate concentrations. Hexavalent chromium was determined by a colorimetric reaction with diphenylcarbazide in acid solution at 540 nm (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation 1999). Acetate was quantified at 210 nm in an Agilent series 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Albany, NY) with an Aminex HPLX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA) and pH was measured with pH indicator strips pH 0–14 Universal indicator (Merck Millipore) and Orion® 2-Star Bench top pH Meter (Thermo Scientific).

Statistical analysis

All experiments were conducted by triplicate. Data were expressed as mean ± standard deviations (SD). We performed a univariate analysis of variance (ANOVA) of data using Minitab 17. Probability less than 0.05 was considered as statistically significant difference.

Soil DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of 16S rDNA genes

DNA was isolated using the Power Soil® DNA Isolation Kit, according to the manufacturer's protocol (Mo Bio). We used the universal bacterial primers 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG) and 1492R (5'-TACC TTGTTACGACTT) for 16S ribosomal RNA (rRNA) gene amplification (Lane 1991). These primers are widely used in soil studies and amplify almost entirely the length of 16S rRNA gene (Fredriksson et al. 2013).

Purified PCR products were cloned into pJET1.2 using the CloneJET PCR Cloning Kit according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific), and transformed by electroporation into *Escherichia coli* MC1061. Fragment inserts were sequenced using the primers included in the CloneJET PCR Cloning Kit. Sequencing was performed in an Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer/ABI PRISM device. Gene sequences reported in this study have been deposited in GenBank with accession numbers described in figure captions.

Sequence and phylogenetic analyses

Sequencing analysis was performed using Bioedit. All clones were first screened for potential chimeric structures using CHIMERA-CHECK (<http://rdp.cme.msu.edu>). After sequencing, the closest relatives of each sequence in GenBank were identified. Alignment of sequences was carried out using the program ClustalW on MEGA. The phylogenetic inferences were performed using the maximum likelihood method based on Kimura 2 parameters algorithm with 1000 bootstrap replications test.

Soil bacterial enrichment, isolation, and characterization

A sample of soil biostimulated with acetate was inoculated in assay tubes anaerobic nutrient broth with acetate and fumarate (NBAF) (Coppi et al. 2001) without resazurin and cysteine, supplemented with 0.05 % yeast extract and 2 mM Cr(VI) and were incubated at 30 °C in order to enrich those resistant microorganisms. After serial dilutions, cells were plated on NBAF-agar medium with 2 mM of Cr(VI) and grown aerobically. The resulting colonies were subcultured. Isolated bacteria were identified by amplifying its 16S rRNA gene by PCR. The PCR products were sequenced and analyzed.

Determination of chromate minimal inhibitory concentration

The growth of *Halomonas* sp. SCr1 isolate was assayed at 30 °C on LB agar pH 9 on microplates with increasing concentrations of Cr(VI) (1, 10, 20, 30, 32, and 34 mM). The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered when no growth was observed after 10 days of incubation.

Aquifer sampling, enrichment, and bacterial isolation

Water from the aquifer was collected at 30-m depth through the piezometer #2 (from the monitoring system in this area). The piezometer #2 was selected because it is located inside the area and is where the pollution plume begins (Villalobos et al. 2012). The environment temperature was about 27 and 23 °C in the aquifer. This water sample was transferred to a serum bottle with sterile anaerobic mineral medium acetate-fumarate NBAF (Coppi et al. 2001) without resazurin and cysteine,

supplemented with 0.05 % yeast extract and 0.5 mM Cr(VI), these cultures were incubated at 30 °C in order to enrich microorganisms resistant to Cr(VI). The ability to reduce Cr(VI) by the microbial enrichment, was tested in NBAF medium with different increasing concentrations of Cr(VI), growth (OD 600 nm), and Cr(VI) concentration were quantified periodically. After that, we proceed with microbial isolation, serial dilution cells were plated on NBAF-agar medium with 2 mM of Cr(VI) and grown aerobically. Isolated bacteria were identified by 16S rDNA gene sequencing and analysis.

Results

Soil biostimulation with acetate using microcosms assays

A sample of Cr(VI)-contaminated soil taken from 30 to 40 cm deep was used for all assays. Cr(VI) concentration in the soil sample was 1768.8 ± 47.7 mg/kg, pH 9.17 (Table 1). It overcomes the permissible limit of Cr(VI) (500 mg/kg). Anaerobic biostimulation assays were conducted as described in the “Materials and Methods” section. Three different assays were performed by triplicate: (1) Soil with acetate to test biological reduction, acetate-dependent (biostimulated soil); (2) Sterilized soil with acetate to determine abiotic reduction triggered by acetate (control); and (3) soil with only water as a second control.

Cr(VI) and acetate concentrations as well as pH were determined at different times: 0, 15, 20, 25, 30, and 35 days after incubation at 30 °C. Cr(VI) was completely reduced within 25 days, as shown in Fig. 1, and only 18 % of acetate was consumed (Fig. 2) in biostimulated soil. The initial pH in all experiments was 9 and it was maintained on this value in both controls. In the biostimulated soil, the pH changed from 9 to 10 at the end of the assay. These results indicate that acetate is effective to stimulate Cr(VI) bio-reduction in soil under anaerobic conditions, while acetate alone does not cause abiotic reduction. The Cr(VI) reduction in biostimulated soil was significantly different to controls.

Soil bacterial diversity

In order to study the bacterial community present in the soil sample used in biostimulation assays, total environmental DNA was extracted and used as template for PCR

Table 1 Soil sample characteristics

Sample	Deep	Distance to COPRP m	Cr(VI) concentration mg/kg	Electrical conductivity µS/cm	pH
1 Polluted soil	30–40	6	1768.8 ± 47.7	12,347.5±281.94	9.17 ± 0.12
2 Unpolluted soil	30–40	1000	Not detectable	201–11.2	8.83 ± 0.03

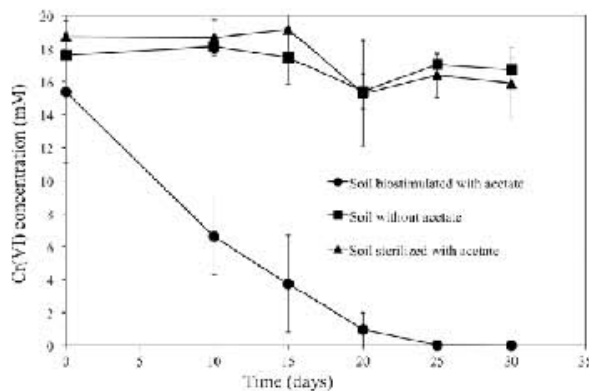


Fig. 1 Cr(VI) reduction during microcosm soil bio-stimulation with acetate. Soil bio-stimulated with acetate (*circles*), soil without acetate (*squares*), and soil sterilized and treated with acetate (*triangles*). Data were expressed as mean \pm standard deviations (SD)

amplification of 16S rDNA, as described in the “Material and Methods” section. PCR products were cloned and sequenced to further analysis. Eighty clones were sequenced and the best matches were with *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Proteobacteria* (beta and gamma). Specifically, 47 clones belong to *Halomonas* sp., 28 to *Bacillus* sp., 2 to *Herbaspirillum* sp., and 3 to *Nesterenkonia* sp. (Fig. 3).

Isolation of bacteria from bio-stimulated soil

From acetate bio-stimulated soil, we carried out an enrichment of Cr(VI)-resistant bacteria on solid anaerobic NBAF medium, pH 9, with 2 mM Cr(VI) at 30 °C. Only one morphological type was obtained. The isolated bacterium was identified as *Halomonas* sp. by 16S rDNA gene amplification and sequencing (Fig. 4). This bacterium showed minimal inhibitory concentration for Cr(VI) of > 32 mM in LB agar plates at pH 9. Further characterization of this isolated is currently being performed in our group.

Microbial isolation from the long-term chromate contaminated aquifer

The aquifer is located in the zone near of the COPRP with highly fluctuating concentrations of Cr(VI) (Armienta and Quéré 1995; Villalobos-Aragon et al. 2012). The sample taken for this study had a Cr(VI) concentration of 52.3 mg/l. We investigated the presence of Cr(VI) resistant and reducers bacteria with potential use in remediation of chromium contamination sites. First, a water sample was taken from 30-m deep through a monitoring well and an aliquot was incubated in anaerobic NBAF media with 0.5 mM Cr(VI) for growth. The bacterial enriched consortium was able to grow and reduce Cr(VI) under increasing concentrations (Figs. 5 and 6). Then, in order to isolate individual microorganisms resistant to Cr(VI), we performed serial dilutions from the initial

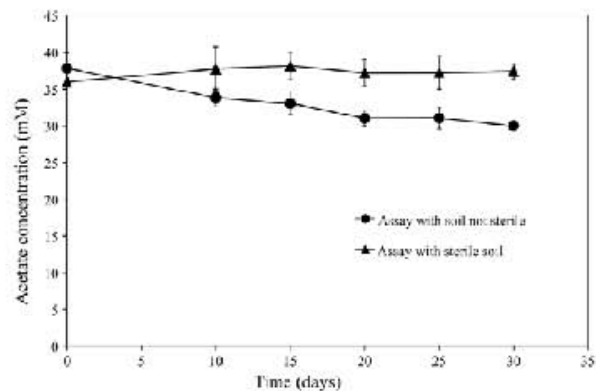


Fig. 2 Acetate consumption during microcosm soil bio-stimulation. *Circles* correspond to soil bio-stimulated with acetate and *triangles* to soil sterilized and treated with acetate (control). Data were expressed as mean \pm standard deviations (SD)

enrichment. They were plated on solid NBAF media with 2 mM Cr(VI) and incubated at 30 °C. Different morphological types of bacteria colonies were obtained and 23 isolates were subjected to 16S rDNA gene PCR amplification, sequence analysis and phylogenetic inference. As shown in Fig. 7, bacteria identified belong to *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Gammaproteobacteria* clades.

Discussion

Bio-stimulation and microbial reduction of Cr(VI) to the less toxic and less soluble Cr(III), through electron donor addition has been regarded as a promising approach for the remediation of soil and groundwater chromium contamination. However, diverse factors such as pH, salinity, and indigenous microbial community influence the effectiveness of the bio-stimulation processes. In this study, acetate was selected as electron donor because it is a key intermediate in degradation of organic matter in soil (Lovley and Phillips 1989; Lovley and Phillips 1986), and several microorganisms have been reported to couple its oxidation to the reduction of alternative electron donors, such as Cr(VI) (Anderson et al. 2003; Lovley 1993; Xu et al. 2011). We found that acetate was effective in promoting microbial reduction of Cr(VI) in alkaline and saline soil samples under anaerobic conditions.

The environments contaminated with Cr(VI) commonly have high pH (Mary et al. 2011; VanEngelen et al. 2008). However, several studies of microbial Cr(VI) reduction have been reported at neutral pH, and very few bio-stimulation assays have been reported under alkaline conditions (Stewart et al. 2007; Stewart et al. 2010). In our bio-stimulation assay, the initial pH was 9 and it was increased by microbial activity during the process. Studies with isolated microorganisms have shown that optimal pH for Cr(VI) reduction varies widely (from 6.0 to 10.0). For *Enterobacter* (Wang et al. 1990),

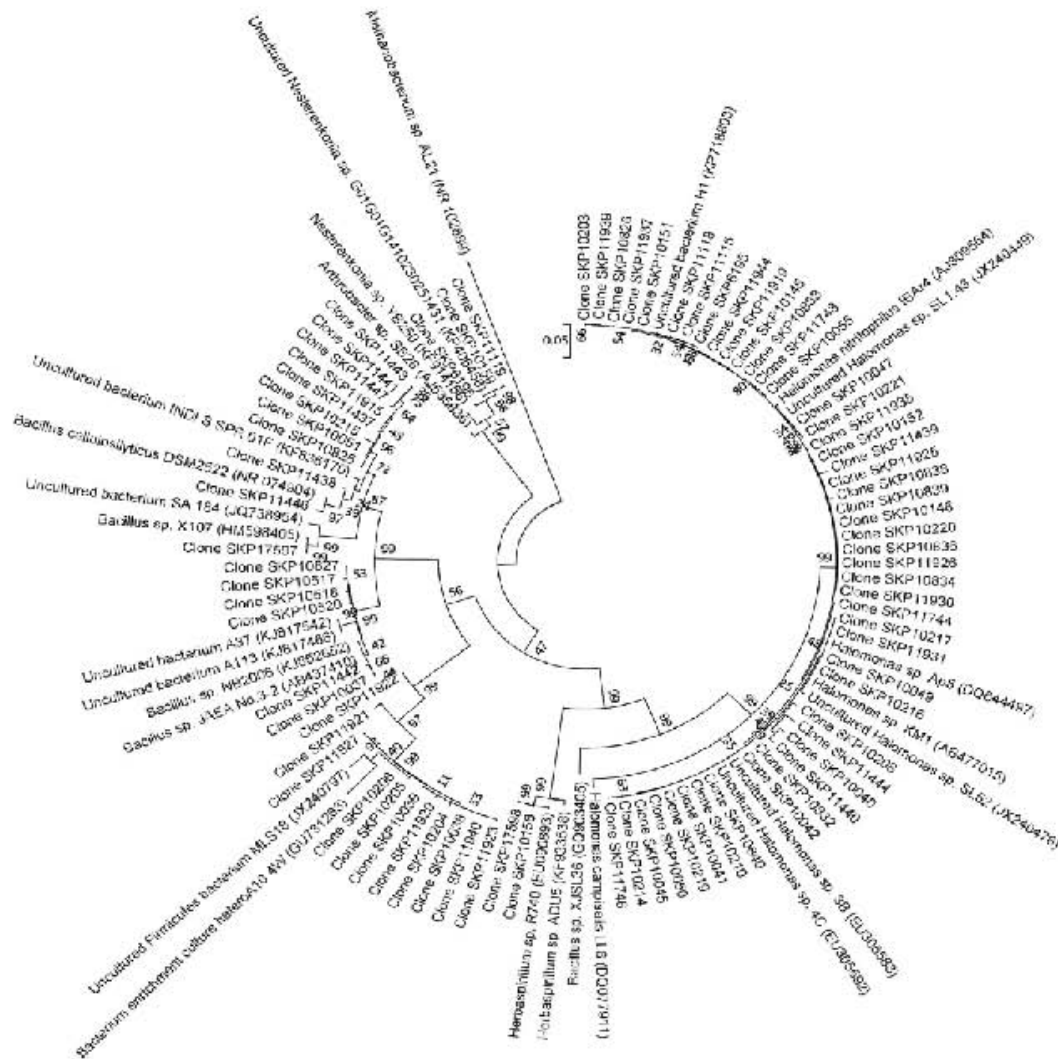


Fig. 3 Phylogenetic reconstruction of clones sequences from soil and the closest sequences from GenBank using maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameters model. Numbers on nodes represent percent bootstrap values based on 1000 replicates. There were a total of

951 positions in the final dataset. The tree was rooted with 16 rDNA of *Methanobacterium* sp. AL-21 Archea sequence. GenBank accession numbers of clone sequences are KU965478 to KU965556

Arthrobacter sp. SUK 1201 (Dey and Paul 2012), *Acinetobacter* sp. Cr-B2 (Narayani and Shetty 2012), and *Serratia* sp. Cr-10 (Zhang and Li 2011) optimum reduction takes place at neutral pH and it is negatively affected by alkaline conditions. However, other bacteria like *Leucobacter* sp. G161 (Gie et al. 2013), *Pannonibacter phragmitetus* L.SSF-09 (Xu et al. 2011), *Bacillus* sp. FM1 (Masood and Malik 2011), *Bacillus subtilis* (Mangaiyarkarasi et al. 2011), *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10 (Long et al. 2013), *Amphibacillus* sp. KSUCr3 (Ibrahim et al. 2011), and *Halomonas* sp. TA-04 (Xu et al. 2011) show optimum reduction at pH from 8 to 10. Our analyses showed the presence of microorganisms belonging to *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Nesterenkonia*/*Arthrobacter*, and *Bacillus* genera in the soil

used in the biostimulation assays. Moreover, it was possible to isolate a *Halomonas* strain (SCr1) with high tolerance to Cr(VI), whose 16S rDNA gene sequence analysis showed high sequence similarity to SKP6195 clone, which was obtained from soil microbial diversity analyses (Figs. 3 and 4). Diverse *Halomonas* spp. are halotolerant *Gammaproteobacteria* (Vreeland et al. 1980) and several microorganisms from this genus are also alkaliphilic (Berendes et al. 1996; Duckworth et al. 2000; Romano et al. 2006). Besides, some *Halomonas* have been reported to resist and reduce Cr(VI) under alkaline conditions (Focardi et al. 2012; Mabrouk, Arayes, and Sabry 2014; Shapovalova et al. 2009; Watts et al. 2015). The first reported was *Halomonas* SL1, which is able to reduce Cr(VI) with acetate as electron donor

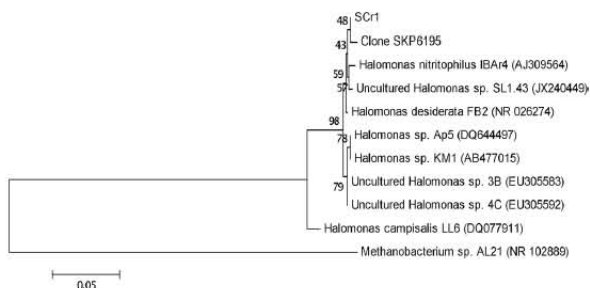


Fig. 4 Phylogenetic reconstruction of 16S rDNA sequence from SCr1 isolated from soil, the clone sequence SPK6195 and the closest sequences from GenBank using maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameters model. Numbers on nodes represent perceny bootstrapp values based on 1000 replicated. *Scale bar* represents 0.05 substitutions per site. There were a total of 860 positions in the final dataset. The tree was rooted with 16 rDNA of *Methanobacterium* sp. AL-21 Archea sequence. GenBank accession number of 16S rDNA gene sequence from isolated SCr1 is KU985305

under anaerobic conditions at pH 9 (VanEngelen et al. 2008); then, it is likely that *Halomonas* could have a primary role in Cr(VI) reduction in our biostimulation assays with acetate. On the other hand, alkaline Cr(VI) reduction has been reported in species belonging to *Bacillus* (Megharaj, Avudainayagam, and Naidu 2003), *Nesterenkonia* (Amoozegar et al. 2007) and *Arthrobacter* genera (Bakradze et al. 2003; Córdoba, Vargas, and Dussan 2008; Megharaj, Avudainayagam, and Naidu 2003; Ziagova, Koukkou, and Liakopoulou-Kyriakides 2014) but not in *Herbaspirillum*. In accord with this, in our biostimulation assays, Cr(VI) reduction can be the result of the process carried out by one or more microorganisms.

Moreover, we found that the consortia enriched from contaminated groundwater showed the ability to reduce Cr(VI) with acetate and yeast extract as electron donors. From this consortium, we were able to isolate individual microorganisms closely related to nine different genera able to grow in

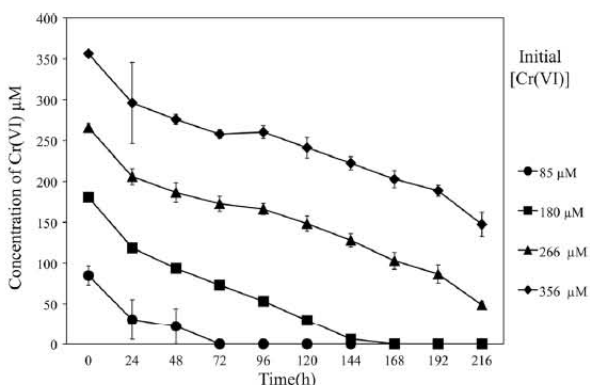


Fig. 5 Anaerobic Cr(VI) reduction by aquifer consortium under different initial Cr(VI) concentrations using NBAF medium (pH 7): 85 µM (circle), 180 µM (square), 266 µM (triangle), and 356 µM (diamond). Data were expressed as mean ± standard deviations (SD)

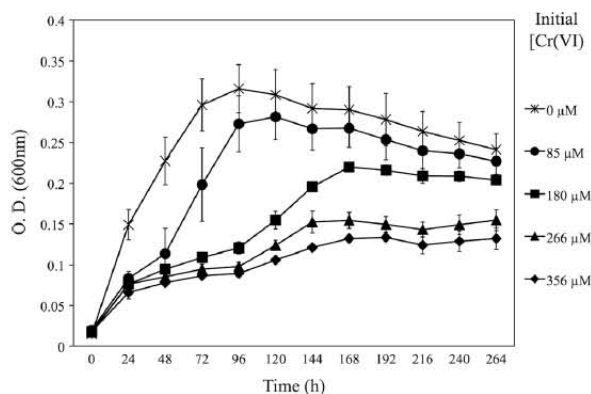


Fig. 6 Optical density of aquifer consortium growing on NBAF medium (pH 7) with increased initial concentrations of Cr(VI): 0 µM (asterisk), 85 µM (circle), 180 µM (square), 266 µM (triangle), and 356 µM (diamond). Data were expressed as mean ± standard deviations (SD)

2 mM Cr(VI): *Klebsiella*, *Bacillus*, *Tessaracoccus*, *Enterococcus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Jeotgaliococcus*, *Brachybacterium*, *Planomicrobium*, and *Citrococcus*. Chromate reduction has been deeply studied in several *Bacillus* species (Garbisu et al. 1998; He et al. 2010; Megharaj, Avudainayagam, and Naidu 2003; Sau, Chatterjee, and Mukherjee 2010) and also reported microorganisms belonging to *Klebsiella* (Wani and Omozele 2015), *Enterococcus* (Sayel et al. 2012), *Arthrobacter* (Bakradze et al. 2003), and *Micrococcus* genera (Sultan and Hasnain 2005) but there are no reports with *Tessaracoccus*, *Jeotgaliococcus*, *Brachybacterium*, *Planomicrobium*, or *Citrococcus* genera.

Previous studies in the same chromate industrial landfill have reported the microbial community from COPRP and lixivates but not from contaminated soil or groundwater. In those studies, the authors also found *Halomonas* spp. but only from lixivates (Brito et al. 2013; Piñón-Castillo et al. 2010).

Further studies are being conducted with *Halomonas* sp. SCr1 and other bacteria isolates from the aquifer to study the limiting factors that could be manipulated for the development of in situ program of bioremediation. This haloalkaliphilic isolate and enriched consortia have a potential in bioremediation of alkaline environments, where suitable indigenous microbes have not been selected naturally yet, due to a recent chromate contamination.

Conclusions

In summary, we proved that acetate is effective in promoting microbial reduction of Cr(VI) in soil. The isolation of haloalkaliphilic bacteria as *Halomonas* sp. has a potential use via bioaugmentation as a feasible in situ treatment for

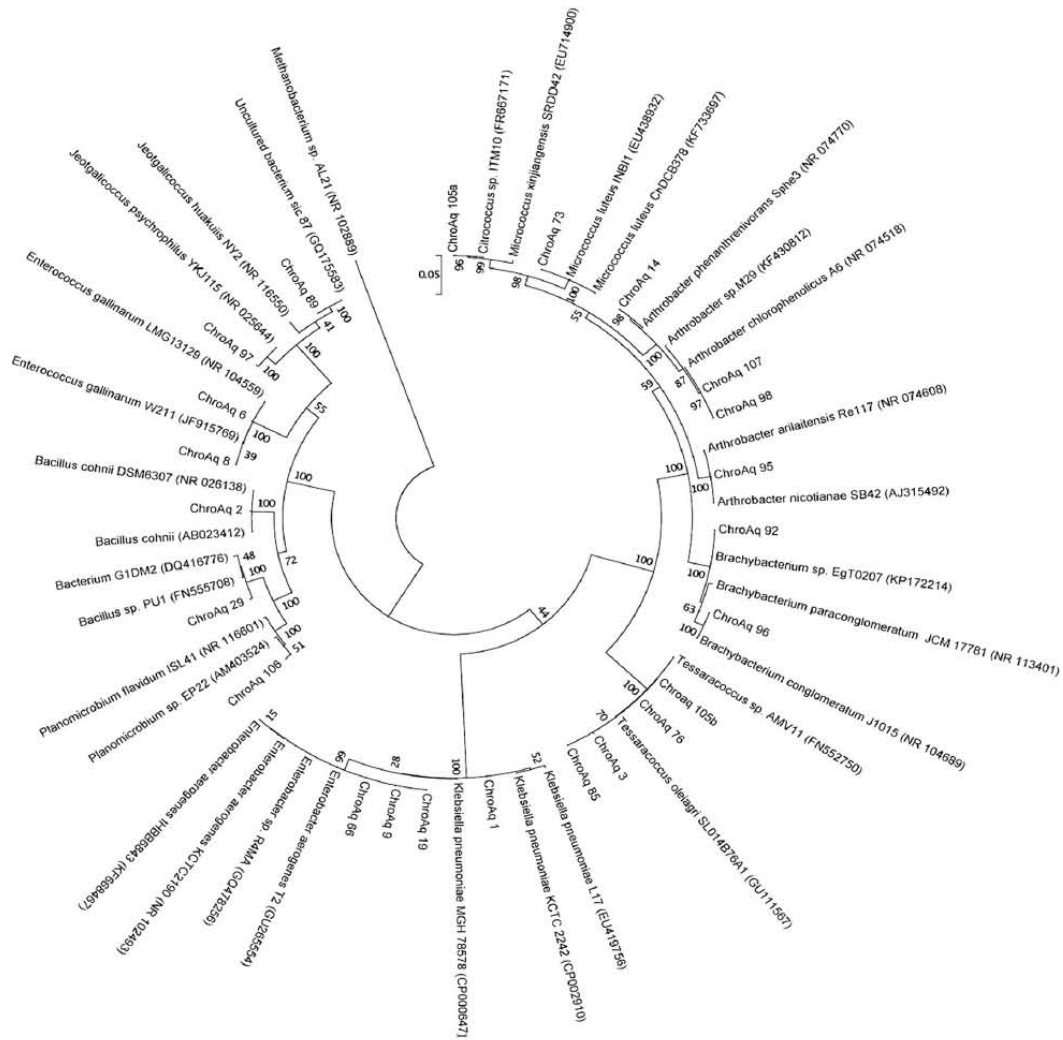


Fig. 7 Phylogenetic reconstruction of 16S rDNA sequence from isolated bacteria from chromate contaminated aquifer and the closest sequences from GenBank using maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameters model, with 1000 replicates of bootstrap test. There were a

total of 1338 positions in the final dataset. The tree was rooted with 16 rDNA of *Methanobacterium* sp. AL-21 archea sequence. GenBank accession numbers of 16S rDNA gene sequences from isolates are KU951443 to KU951465

highly alkaline soil environments. We also demonstrated that groundwater from this contaminated area also has microorganisms that can resist and reduce high Cr(VI) concentrations and, therefore, could also have a primordial role in bioremediation of this and other sites with similar characteristics. These studies provide evidence of promising treatment of long-term chromate contaminated groundwater by transformation of toxic and soluble Cr(VI) into less toxic and poorly soluble Cr(III) and provide information from microbial communities resistant and with reducing capabilities for further studies.

Acknowledgments This work was supported by PAPIIT-UNAM IN208912 grant. LP was the recipient of a CONACyT fellowship. We

thank Raunel Tinoco for technical support; Margarita Gutiérrez-Ruiz and Laboratory of Physical and Chemical Analyses of the Environment, Geography Institute; and UNAM, for Cr total quantification. Oligonucleotides and automated sequencing was performed at the Unit for DNA Sequence and Synthesis of the Biotechnology Institute, UNAM.

References

American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater. Standard Methods: 541
 Armienta MA, Quéré A (1995) Hydrogeochemical behavior of chromium in the unsaturated zone and in the aquifer of Leon valley, Mexico. *Water Air Soil Pollut* 84(1):11–29

- Armienta MA, Rodríguez-Castillo R (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environ Health Perspect* 103(Suppl 1):47–51
- Armienta MA, Rodríguez R, Cenicerós N, Juárez F, Cruz O (1996) Distribution, origin and fate of chromium in soils in Guanajuato, Mexico. *Environ Pollut* 91(3):391–397
- Amoozegar MA, Ghasemi A, Razavi MR, Naddaf S (2007) Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2. *Process Biochem* 42(10):1475–1479
- Anderson RT, Vronis HA, Ortiz-Bernad I, Resch CT, Long PF, Dayvault R, Karp K, Marutzky S, Metzler DR, Peacock A, White DC, Lowe M, Lovley DR (2003) Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* 69(10):5884–5891
- Bakradze NG, Abuladze MK, Sokhadze VM, Asatiani NV, Sapojnikova NA, Kartvelishvili TM, Namchevazde FN, Tsubakhashvili NY, Tabatadze LV, Lejava LV, Holman IY (2003) A calorimetric characterization of Cr(VI)-reducing *Arthrobacter oxydans* at different phases of the cell growth cycle. *Sci World J* 3:432–442. doi:10.1100/1sw.2003.33
- Berendes F, Gottschalk G, Heine-Dobbernack E, Moore ERB, BJ T (1996) *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. *Syst Appl Microbiol* 19(2):158–167
- Brito EM, Piñón-Castillo HA, Guyoncaud R, Caretta CA, Gutiérrez-Corona JF, Duran R, Reyna-López GE, Nevárez-Moorillón GV, Fahy A, Goñi-Uriza M (2013) Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(1):369–378
- Brodie EL, Joyner DC, Faybishenko B, Connal ME, Rios-Velazquez C, Malave J, Martinez R, Mork H, Willett A, Koenigsberg S, Herman DJ, Firestone MK, Hazen TC (2011) Microbial community response to addition of polylactate compounds to stimulate hexavalent chromium reduction in groundwater. *Chemosphere* 85(4):660–665
- Brose DA, James BR (2010) Oxidation-reduction transformations of chromium in aerobic soils and the role of electron-shuttling quinones. *Environ Sci Technol* 44(24):9438–9444
- Chovanec P, Spaccino-Watkins C, Zhang N, Basu P, Stolz JF (2012) Microbial reduction of chromate in the presence of nitrate by three nitrate respiring organisms. *Front Microbiol* 3:416. doi:10.3389/fmicb.2012.00416
- Coppi MV, Leang C, Sandler SJ, Lovley DR (2001) Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 67(7):3180–3187
- Córdoba A, Vargas P, Dussan J (2008) Chromate reduction by *Arthrobacter* CR47 in biofilm packed bed reactors. *J Hazard Mater* 151(1):274–279
- Dey S, Paul AK (2012) Optimization of cultural conditions for growth associated chromate reduction by *Arthrobacter* sp. SUK 1201 isolated from chromite mine overburden. *J Hazard Mater* 213–214:200–206
- Duckworth AW, Grant WD, Jones BE, Meijer D, Márquez MC, Ventosa A (2000) *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the east African Rift Valley. *Extremophiles* 4(1):53–60
- Field EK, Gerlach R, Viamajala S, Jennings JK, Peyton BM, Apel WA (2013) Hexavalent chromium reduction by *Halomonas* sp. strain ES6: the influence of carbon source, iron minerals, and electron shuttling compounds. *Biodegradation* 24(3):437–450
- Focardi S, Pepi M, Landi G, Gasperini S, Ruta M, Biasio PD, Focardi SE (2012) Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. TA-04. *Int J Biol Biotechnol* 66(1):63–70
- Fredriksson NJ, Humansson M, Wilén BM (2013) The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8(10):e76431
- Garbisu C, Alkorta I, Llana MJ, Serra JJ (1998) Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 9:133–141
- Ge S, Zhou M, Dong X, Lu Y, Ge S (2013) Distinct and effective biotransformation of hexavalent chromium by a novel isolate under aerobic growth followed by facultative anaerobic incubation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(5):2131–2137
- He M, Li X, Guo L, Miller SJ, Rensing C, Wang G (2010) Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol* 10:221. doi:10.1186/1471-2180-10-221
- Horton RN, Apel WA, Thompson VS and Sheridan PP (2006) Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*. *BMC Microbiol* 6:5
- Ibrahim SSA, El-Tayeb MA, Elbadawi YB, Al-Salamah AA (2011) Isolation and characterization of novel potent Cr(VI) reducing alkaliphilic *Amphibacillus* sp. KSUCR3 from hypersaline soda lakes. *Electron J Biotechnol* 14(4):4
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 115–175
- Long D, Tang X, Cai K, Chen G, Chen L, Duan D, Zhu J, Chen Y (2013) Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochromobacterium saccharolyticum* LY10. *J Hazard Mater* 256:257:24–32
- Lovley DR (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol* 47:263–290
- Lovley DR, Phillips EJ (1989) Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe(III)-reducing sediments. *Appl Environ Microbiol* 55(12):3234–3236
- Lovley DR, Phillips EJ (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol* 51(4):683–689
- Mabrouk MEM, Arayas MA, Sabry SA (2014) Hexavalent chromium reduction by chromate-resistant haloalkaliphilic *Halomonas* sp. M-Cr newly isolated from tannery effluent. *Biotechnol Equip* 28(4):659–667. doi:10.1080/13102818.2014.937092
- Mary MS, Vincent S, Janarthanan S, Rao TS, Tata BVR (2011) Bioneduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi J Biol Sci* 18(2):157–167. doi:10.1016/j.sjbs.2010.12.003
- Masood H, Malik A (2011) Biosorption of metal ions from aqueous solution and tannery effluent by *Bacillus* sp. FM1. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 46(14):1667–1674. doi:10.1080/10934529.2011.623648
- Megharaj M, Avudainayagam S, Naidu R (2003) Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Curr Microbiol* 47(1):51–54
- Messer J, Reynolds M, Stoddard T, Zhirkovich A (2006) Causes of DNA single-strand breaks during reduction of chromate by glutathione in vitro and in cells. *Free Radic Biol Med* 40(11):1981–1992
- Narayani M, Vidya Shetty K (2012) Characteristics of a novel *Actinobacter* sp. and its kinetics in hexavalent chromium bioreduction. *J Microbiol Biotechnol* 22(5):690–698
- Piñón-Castillo HA, Brito EM, Goñi-Uriza M, Guyoncaud R, Duran R, Nevárez-Moorillón GV, Gutiérrez-Corona JF, Caretta CA, Reyna-López GE (2010) Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *J Appl Microbiol* 109(6):2173–2182
- Roberts KR, Marzluf GA (1971) The specific interaction of chromate with the dual sulfate permease systems of *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys* 142(2):651–659

- Romano I, Lama L, Nicolaus B, Poli A, Gambacorta A, Giordano A (2006) *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *J Gen Appl Microbiol* 52(6):339–348
- Sass BM, Rai D (1987) Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid solutions. *Inorg Chem* 26(6):2228–2232. doi:10.1021/ic00261a013
- Sau GB, Chatterjee S, Mukherjee SK (2010) Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Pol J Microbiol* 59(3):185–190
- Sayel H, Bahafid W, Joutey NI, Derraz K, Benbrahim KI, Korachi SI, Ghachtouli NE (2012) Cr(VI) reduction by *Enterococcus gallinarum* isolated from tannery waste-contaminated soil. *Ann Microbiol* 62(3):1269–1277
- Shapovalova AA, Khizhniak TV, Turova TP, Sorokin D (2009) *Halomonas chromatireducens* sp. nov., a new denitrifying facultatively haloalkaliphilic bacterium from soda salt marshes capable of aerobic chromate reduction. *Microbiology* 78(1):117–127 original in Russian
- Somnathally AC, Mosher JJ, Yuan T, Podar M, Phelps TJ, Brown SD, Yang ZK, Hazen TC, Arkin AP, Palumbo AV, Van Nostrand JD, Zhou J, Elias DA (2013) Hexavalent chromium reduction under fermentative conditions with lactate simulated native microbial communities. *PLoS One* 8(12):e83909. doi:10.1371/journal.pone.0083909 eCollection 2013
- Stewart DI, Burke IT, Hughes-Berry DV, Whittleston RA (2010) Microbially mediated chromate reduction in soil contaminated by highly alkaline leachate from chromium containing waste. *Feol Eng* 36(2):211–221. doi:10.1016/j.ecoleng.2008.12.028
- Stewart DI, Burke IT and Mortimer RJG (2007) Stimulation of microbially mediated chromate reduction in alkaline soil-water systems. *Geomicrobiol J* 655–669. doi:10.1080/01490450701758221
- Sultan S, Hasnain S (2005) Chromate reduction capability of a gram positive bacterium isolated from effluent of dyeing industry. *Bull Environ Contam Toxicol* 75(4):699–706
- VanEngelen MR, Peyton BM, Mormile MR, Pinkart HC (2008) Fe(III), Cr(VI), and Fe(III) mediated Cr(VI) reduction in alkaline media using a *Halomonas* isolated from soap lake, Washington. *Biodegradation* 19(6):841–850. doi:10.1007/s10532-008-9187-1
- Varadharajan C, Han R, Beller HR, Yang L, Marcus MA, Michel M, Nico PS (2015) Characterization of chromium bioremediation products in flow-through column sediments using micro-x-ray fluorescence and x-ray absorption spectroscopy. *J Environ Qual* 44(3):729–738. doi:10.2134/jeq2014.08.0329
- Villalobos-Aragón A, Ellis AS, Armienta MA, Morion-Bermea O, Johnson TM (2012) Geochemistry and Cr stable isotopes of Cr-contaminated groundwater in Leon valley, Guanajuato, Mexico. *Appl Geochem* 27(9):1783–1794. doi:10.1016/j.apgeochem.2012.02.013
- Vitale RJ, Mussoline GR, Penra JC, James BR (1994) Hexavalent chromium extractions from soils: evaluation of an alkaline digestion method. *J Environ Qual* 23(6):1249–1256. doi:10.2134/jeq1994.00472425002300060018x
- Vreeland RH, Litchfield CD, Martin PL, Pliot F (1980) *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 30(2):485–495. doi:10.1099/00207713-30-2-485
- Wang PC, Mori T, Toda K, Ohtake II (1990) Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J Bacteriol* 172(3):1670–1672
- Wani PA, Omuzole AB (2015) Cr(VI) removal by indigenous *Klebsiella* species PB6 isolated from contaminated soil under the influence of various factors. *Curr Res Bacteriol* 8(3):62–69. doi:10.3923/crb.2015.62.69
- Watts M, Khizhniak TV, Christopher B, Lloyd JR (2015) Treatment of alkaline Cr(VI)-contaminated leachate with an alkaliphilic metal reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 81(16):5511–5518
- Xu L, Luo M, Li W, Wei X, Xie K, Liu L, Jiang C, Liu H (2011) Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* I S57-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *J Hazard Mater* 185(2–3):1169–1176. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.10.028
- Zhang K, Li F (2011) Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(3):1163–1169. doi:10.1007/s00253-011-3120-y
- Zhitkovich A (2011) Chromium in drinking water: sources, metabolism, and cancer risks. *Chem Res Toxicol* 24(10):1617–1629
- Ziagova MG, Koukkou AI, Liakopoulou-Kyriakides M (2014) Optimization of cultural conditions of *Arthrobacter* sp. Sphe3 for growth-associated chromate(VI) reduction in free and immobilized cell systems. *Chemosphere* 95:535–540. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.112

VIII.2 Caracterización de la cepa *K. pneumoniae* AqSCr aislada de agua subterránea contaminada por Cr(VI).

El aislado AqSCr fue encontrado en mayor abundancia durante el aislamiento y con una capacidad de reducción similar a la del cultivo enriquecido en medio NBAF, por lo que fue seleccionado para estudiar a profundidad su capacidad de resistir y reducir Cr(VI). Inicialmente, la cepa AqSCr fue identificada como *Klebsiella* sp. de acuerdo al análisis del gen rRNA 16S, sin embargo, ya que en la familia Enterobacteracea la variación dentro de dicho gen no otorga resolución para la identificación confiable a nivel de especie (Mollet et al., 1997), se prosiguió con la secuenciación de regiones específicas de los genes *gyrA* (Subunidad A de la enzima ADN girasa), *parC* (Subunidad A de la enzima DNA topoisomerasa IV) y *rpoB* (Subunidad β de la enzima ARM polimerasa DNA-dirigida) de la cepa AqSCr. La secuencia del gen *rpoB* presentó un 99% de identidad, mientras que *gyrA* y *parC* el 100% con los genes de diferentes cepas *K. pneumoniae*. Con base en estos análisis, el aislado AqSCr fue identificado como una *K. pneumoniae*.

A) Resistencia a Cr(VI).

La resistencia a Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr fue determinada en medio LB líquido aeróbico a pH 7, 8 y 9 (Figura 6). La concentración máxima de Cr(VI) que AqSCr fue capaz de resistir fue 34mM a pH 9, 12mM a pH 8 y 2mM a pH 7.

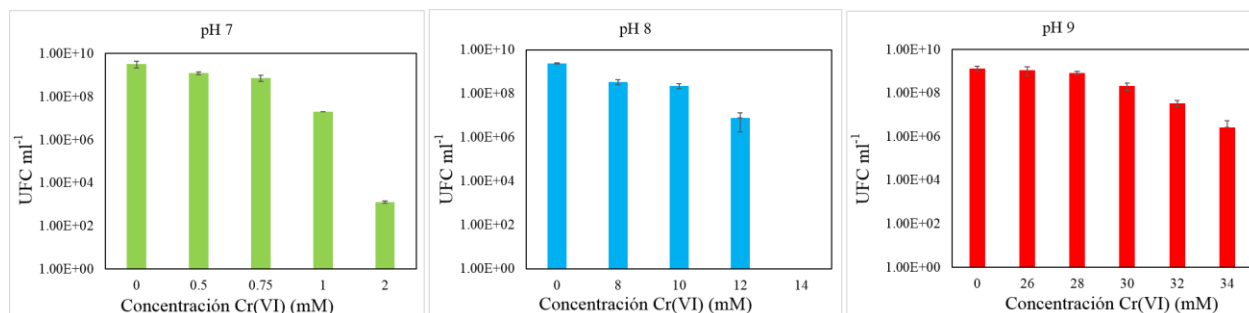


Figura 6. Resistencia de *K. pneumoniae* AqSCr a Cr(VI) bajo diferentes pHs. Se muestra la viabilidad celular a las 24 horas de incubación de AqSCr en LB a pH 7 (verde), pH 8 (azul) y pH 9 (rojo) con diferentes concentraciones de Cr(VI). Las barras indican la desviación estándar.

La resistencia a Cr(VI) también fue determinada en medio citrato de sodio pH 7, tanto aeróbico como anaeróbico, en dichos medios de cultivo la resistencia a Cr(VI) de AqSCr fue similar a la observada en medio LB (Figura 7). Existen diversos reportes de bacterias resistentes a Cr(VI), cuyos límites de resistencia conforman un amplio rango desde 180 μ M en una cepa de *Bacillus brevis* (Verma et al., 2009), hasta 600mM en *Nesterenkonia* sp. MF-2 (Amoozegar et al., 2007),

estas diferencias se deben tanto a características intrínsecas a cada cepa, como a las diferencias en la composición de los medios de cultivo (El Baz et al., 2015).

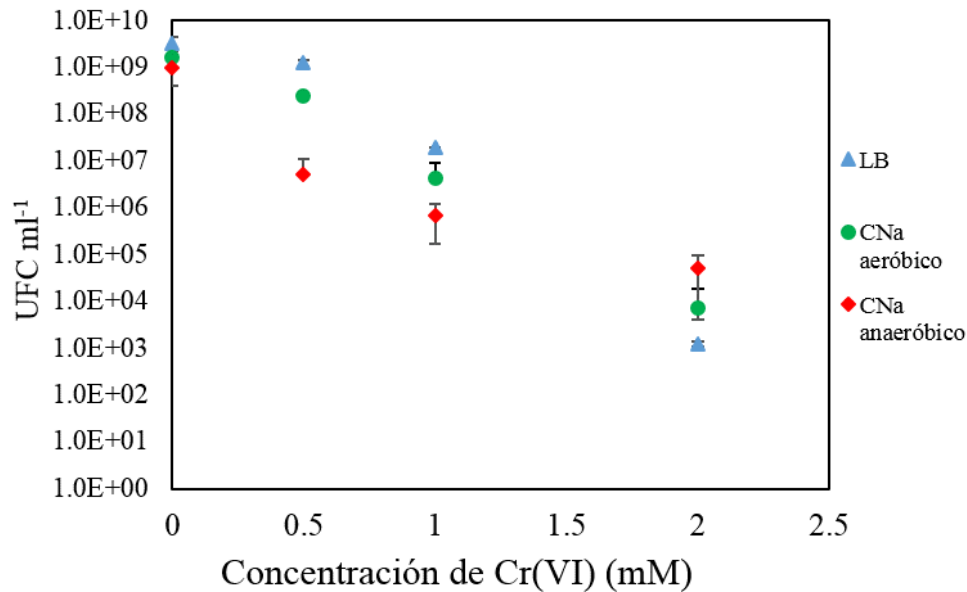


Figura 7. Resistencia de *K. pneumoniae* AqSCr a Cr(VI) bajo diferentes condiciones de cultivo. Se muestran las unidades formadoras de colonias por mililitro a las 24 horas de incubación con 0, 0.5, 1 y 2mM de Cr(VI) en los medios de cultivo LB aeróbico (triángulos), citrato de sodio aeróbico (círculos) y citrato de sodio anaeróbico (rombos). Las barras indican la desviación estándar.

En *Shewanella oneidensis* MR-1 el límite de resistencia a Cr(VI) es similar al de *K. pneumoniae* AqSCr (2mM) en medio LB pH 7 (Brown et al., 2006). Dentro del género *Klebsiella* los niveles de resistencia también varían en un amplio rango, por ejemplo, en *K. ornithinolytica* 1P y *K. oxytoca* P2, el crecimiento es inhibido por 0.5 y 0.75mM de Cr(VI) respectivamente (Garavaglia et al., 2010), mientras que *Klebsiella* sp. PB6 resiste 10.7mM (Wani y Omozele, 2015). De acuerdo a los resultados presentados aquí, el pH tiene gran influencia en la resistencia microbiana a Cr(VI). Esta dependencia ha sido pobremente estudiada en otros microorganismos, el único reporte corresponde a *Nesterenkonia* sp. MF2, esta cepa que crece mejor a pH 8 que a 7 o 9 en presencia de 0.2mM de Cr(VI). Esto indica que el efecto del pH sobre la resistencia es variable y que puede estar relacionado a las adaptaciones ambientales de los microorganismos.

B) Reducción anaeróbica de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr.

La capacidad de reducir Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr fue evaluada bajo condiciones anaeróbicas a diferentes temperaturas en medio citrato de sodio con 500μM de Cr(VI). A 30°C el

100% Cr(VI) fue reducido en 168 hrs (Figura 8a), mientras que a 37°C ocurrió en 144 hrs (Figura 8b). En estas condiciones, los controles sin inocular no mostraron reducción. En ambas temperaturas la reducción fue detectada tanto en la fase logarítmica como en la estacionaria (Figura 8a, b). La cepa mostró un crecimiento mayor a 37°C. El consumo de citrato y la producción de acetato también fueron mayores a 37°C (Figura 8b, d). La concentración de formiato a través del tiempo tuvo un comportamiento muy similar en ambas temperaturas. Este es el primer reporte de reducción anaeróbica de Cr(VI) por una bacteria de la especie *K. pneumoniae*.

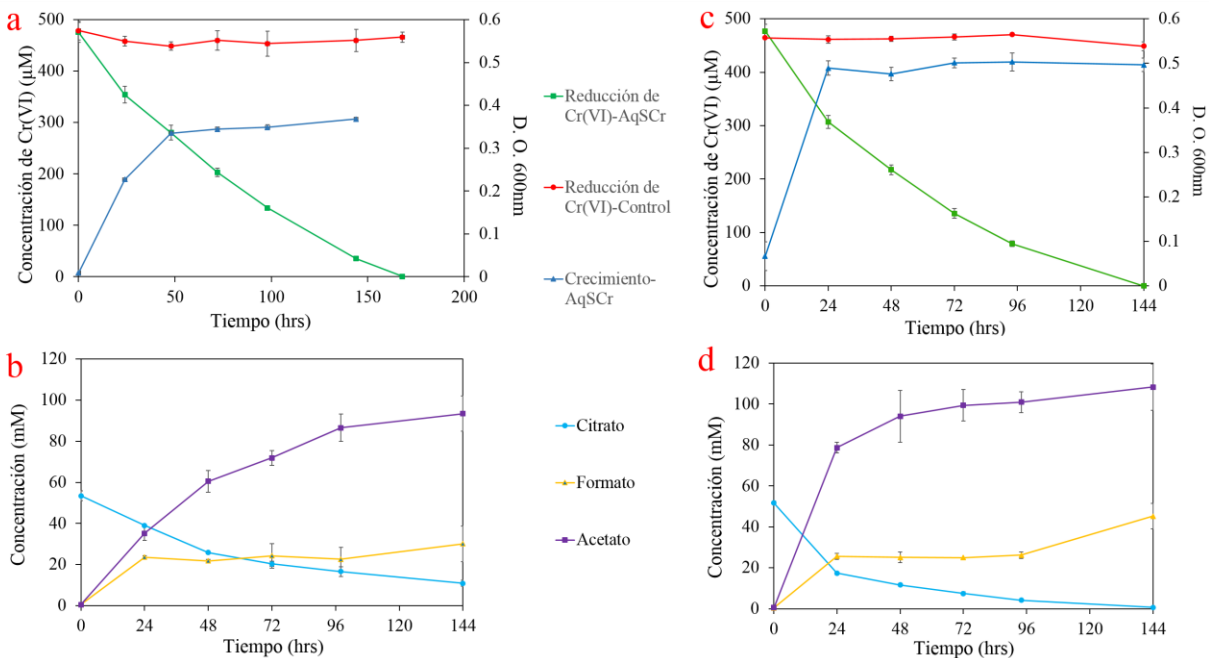


Figura 8. Reducción anaeróbica de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr a 30°C (a, b) y 37°C (c, d). Se muestra el crecimiento y la reducción de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr en medio citrato de sodio anaeróbico con una concentración inicial de 500µM de Cr(VI), también se indica la concentración de Cr(VI) en el ensayo control sin inocular AqSCr (a, c) y la concentración de ácidos orgánicos durante el crecimiento y la reducción de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr (b, d).

C) Reducción aeróbica de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr.

La reducción aeróbica de 50µM Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr fue ensayada tanto en medio LB como en medio citrato de sodio. Como referencia se utilizó el medio citrato de sodio anaeróbico previamente ensayado. En medio citrato de sodio anaeróbico el 100% del Cr(VI) fue reducido en 24 horas por *K. pneumoniae* AqSCr, mientras que en medio citrato de sodio aeróbico no hubo reducción, por otra parte, en medio LB aeróbico se redujo el 78% del Cr(VI) en 24 horas (Figura 9).

De acuerdo a estos resultados, la cepa AqSCr es capaz de reducir Cr(VI) tanto en condiciones aeróbicas como, anaeróbicas. Sin embargo, en medio citrato de sodio aeróbico hay crecimiento, pero no se detectó reducción de Cr(VI). Esto podría deberse a la ausencia de algún compuesto necesario para llevar a cabo la reducción aeróbica en este medio de cultivo, ya que en varios estudios se ha reportado que la reducción de Cr(VI) depende tanto de la formulación del medio, como de las condiciones de cultivo (Mabrouk, 2008), por ejemplo, en *E. cloacae* HO1 se determinó que la presencia de aminoácidos específicos como aspartato es determinante para que ocurra la reducción (Ohtake et al., 1990).

El pH es otro parámetro con influencia en la reducción de Cr(VI) (Bhowmick et al., 2009). *K. pneumoniae* AqSCr fue capaz de reducir 100µM de Cr(VI) a diferentes pH. Sin embargo, a pH 7 un 88% del Cr(VI) fue reducido en 24 hrs, mientras que a pH 9 únicamente el 46% (Figura 10), esta menor reducción bajo condiciones alcalinas puede ser resultado de un menor transporte del Cr(VI) hacia el interior de la célula, lo cual correlaciona con la resistencia. Una baja tasa de reducción de Cr(VI) a pH alcalino fue reportado en *Thermoanaerobacter* BSB-33 (pH 7 > pH 7.5 > pH 8 > pH 8.5) (Bhowmick et al., 2009), mientras que en *Bacillus subtilis* G7 y *Halomonas* sp. M-Cr, la reducción de cromato es más rápida bajo condiciones alcalinas (pH 10 > pH 9 > pH 8 > pH 7 > pH 6) (Mary Mangaiyarkarasi et al., 2011; Mabrouk et al., 2014). Estos reportes sugieren que el efecto del pH sobre la reducción de Cr(VI) podría ser especie-específico.

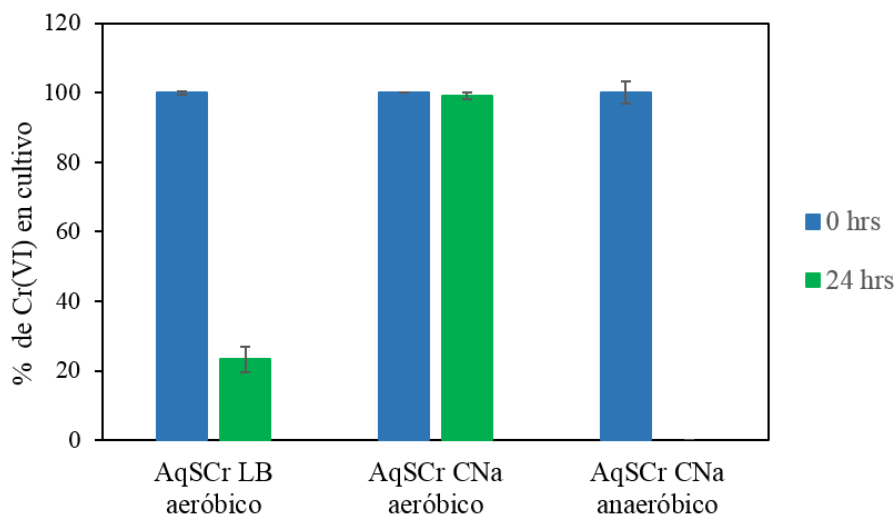


Figura 9. Reducción de 50µM de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr a 30°C en los medios LB aeróbico, citrato de sodio aeróbico y citrato de sodio anaeróbico. Las barras de error indican la desviación estándar.

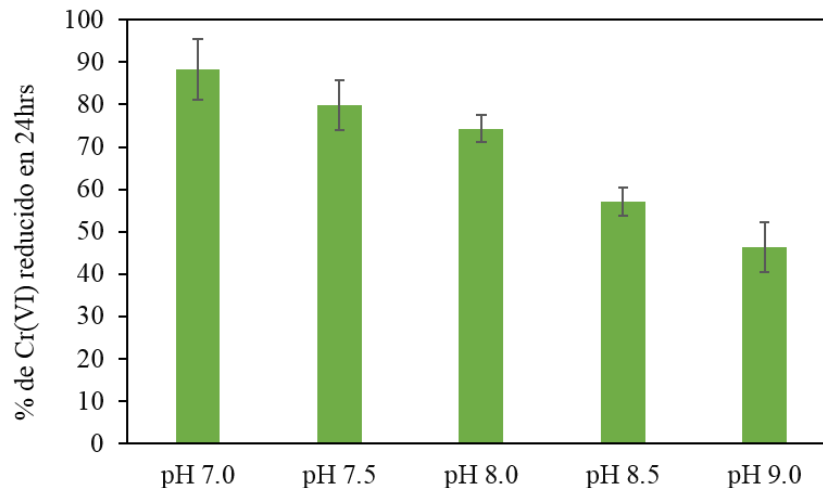


Figura 10. Reducción aeróbica de Cr(VI) por *K. pneumoniae* AqSCr en medio LB a diferentes pH, con una concentración inicial de Cr(VI) de 100 μ M. Las barras de error indican la desviación estándar.

D) Actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares de *K. pneumoniae* AqSCr.

Como se describió en la introducción la reducción microbiana de Cr(VI) puede ser directa (enzimática) o indirecta. Como primer paso para comprender el mecanismo de reducción de Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr se estudió la actividad reductasa de Cr(VI) en sus extractos celulares, utilizando NADH como donador de electrones. Para determinar la localización celular se realizó el fraccionamiento para separar la fracción membranal y la fracción soluble. Como se observa en la Figura 11, la actividad reductasa de Cr(VI) dependiente de NADH sólo se encontró en la fracción soluble. Dicha actividad fue detectada tanto en extractos de cultivos crecidos en presencia de Cr(VI), como en su ausencia, lo cual sugiere que su expresión no es inducida por la presencia del metal. También se encontró actividad en los extractos celulares de cultivos crecidos en medio citrato de sodio aeróbico (cultivos que no presentan reducción). Esto indica que los elementos involucrados en reducción de cromo se expresan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y apoya la hipótesis de que la falta de nutrientes específicos limita la reducción en cultivos en citrato de sodio aeróbico de *K. pneumoniae* AqSCr. Para determinar si la actividad reductasa es o no enzimática, se realizó la ultrafiltración y lavado de la fracción soluble en un Amicon Ultracel YM-50. La fracción retenida conservó la actividad reductasa de Cr(VI), indicando que el mecanismo de reducción de Cr(VI) en *K. pneumoniae* AqSCr es enzimático. Reductasas de Cr(VI) solubles han sido reportadas en *Pseudomonas ambigua* G-1 (Suzuki et al., 1992), *Pseudomonas putida* (Ackerley et al., 2004), *Escherichia coli* ATCC 33456 (Bae et al.,

2005), *Bacillus sphaericus* AND 303 (Pal et al., 2005), *Bacillus* sp. ES 29 (Camargo et al., 2003), *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 (Xu et al., 2012) y en *Thermus scotoductus* SA-01 (Opperman et al., 2008), pero no existe ningún reporte previo de reductasas de Cr(VI) en el género *Klebsiella*.

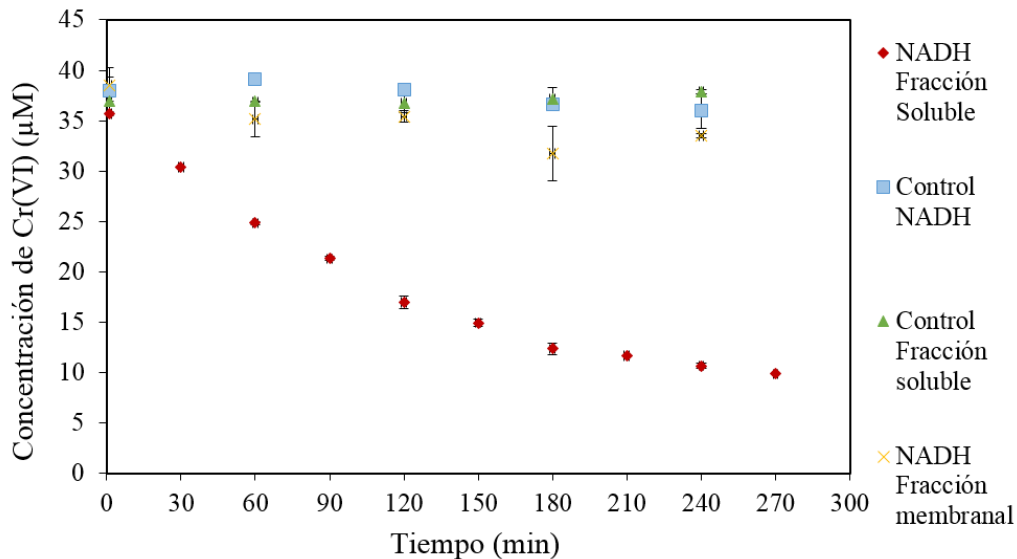


Figura 11. Actividad reductasa de Cr(VI) en las fracciones soluble y membranal de *K. pneumoniae* AqSCr cultivada en medio citrato de sodio anaeróbico con 100µM de Cr(VI). Se utilizó NADH 200µM como donador de electrones, la reacción fue conducida anaerobicamente. Las barras de error indican la desviación estándar.

E) Reducción de Fe(III) a Fe(II) por *K. pneumoniae* AqSCr.

Uno de los mecanismos de reducción indirecta de Cr(VI) más relevantes en el ambiente es efectuado por bacterias reductoras de Fe(III) a Fe(II), ya que este último puede reducir al Cr(VI) de manera extracelular. Por ello, se investigó si *K. pneumoniae* AqSCr es capaz de reducir Fe(III). AqSCr fue cultivada en medio citrato férrico anaeróbico, durante el cultivo se realizó en monitoreo de la producción de Fe(II), el consumo de citrato y la producción de acetato. Como se observa en la Figura 12, *K. pneumoniae* AqSCr fue capaz de reducir Fe(III) a Fe(II) en una manera dependiente de citrato, ya que cuando el citrato es consumido totalmente, la reducción se detuvo, mientras que al adicionar citrato de sodio a las 288 horas la reducción continuó (Figura 12a). Cuando el citrato es consumido totalmente ocurre la formación de un gel (Figura 13b), el cual se desintegra al adicionar citrato de sodio. De acuerdo a los análisis con microscopia de transmisión electrónica, dicho gel está constituido por bacterias que atrapan el hierro en su cápsula de exopolisacárido en ausencia del efecto quelante del citrato (Figuras 14 a y b), estas

características son similares a las reportadas en *K. oxytoca* BAS-10, la cual produce un exopolisacárido con alta afinidad por hierro, por lo que es de gran interés para diversas aplicaciones biotecnológicas (Baldi et al., 2001). Por otra parte, en cultivo sólido *K. pneumoniae* AqSCr forma colonias con una cobertura metálica debido a la acumulación del metal (Figura 13c).

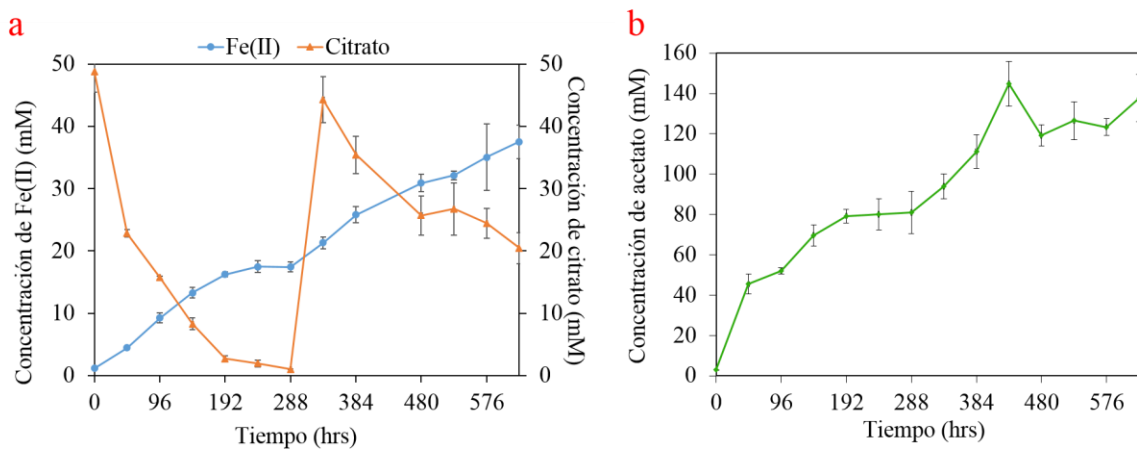


Figura 12. Reducción anaeróbica de Fe(III) a Fe(II) por *K. pneumoniae* AqSCr en medio citrato férrico. Se realizó en monitoreo de la producción de Fe(II) y el consumo de citrato (a), así como la concentración de acetato (b). A las 288 horas de incubación se realizó la adición de citrato de sodio anaeróbico para obtener una concentración de 50mM. Las barras de error indican la desviación estándar.

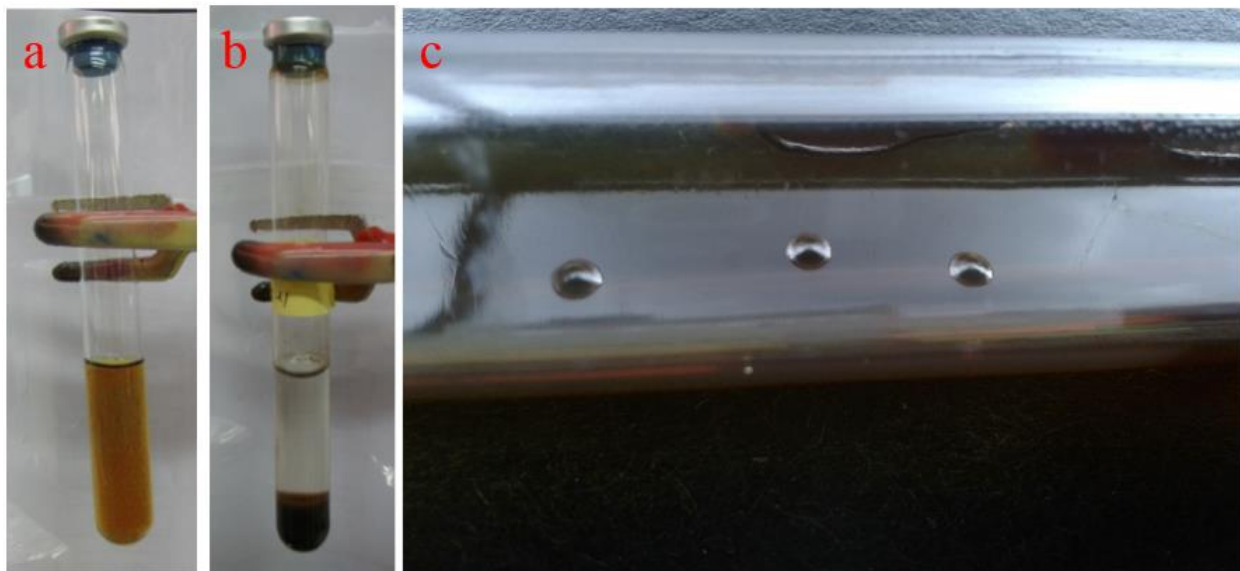


Figura 13. Cultivo anaeróbico de *K. pneumoniae* AqSCr en medio citrato férrico. Medio de cultivo citrato férrico sin inocular (a) e inoculado con AqSCr a las 198 hrs de incubación a 30°C (b). *K. pneumoniae* AqSCr en medio anaeróbico citrato férrico-agar (c).

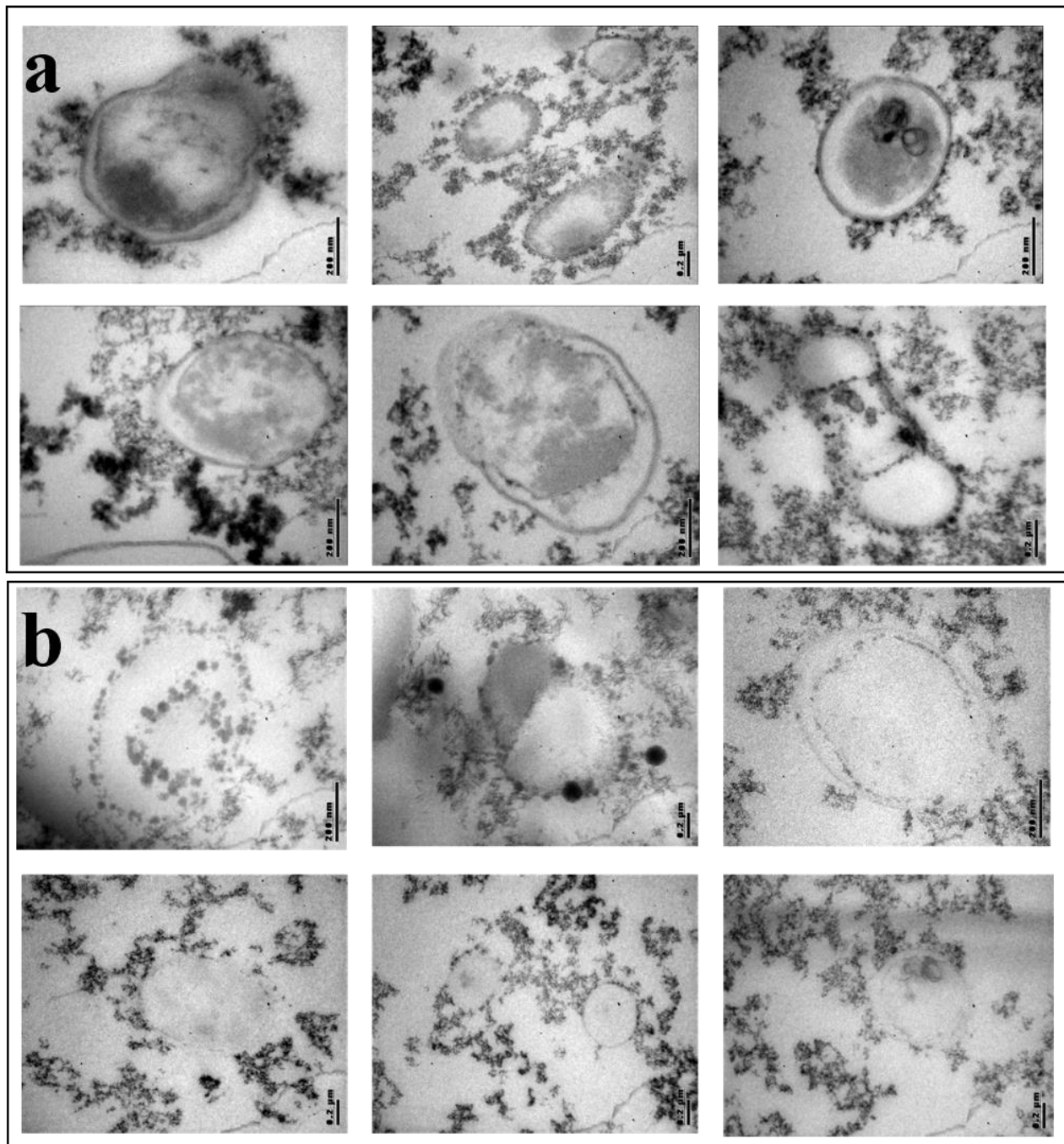


Figura 14. Micrografía de transmisión electrónica de células de *K. pneumoniae* AqSCr cultivadas anaeróbicamente en medio citrato férrico a las 192 horas de incubación. Cortes con (a) y sin (b) tinción con acetato de uranilo.

VIII.3 Secuenciación del genoma.

Debido a las capacidades metabólicas tan notables de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr se decidió secuenciar su genoma completo, el cual fue ensamblado como se describe en materiales y métodos (Riveros-McKay, 2014) y finalmente depositado en el GenBank con el número de acceso SAMN05730075. El genoma quedó ensamblado en 51 fragmentos, obteniendo un N90 de 112278 y un L50 de 1. En total 10 fragmentos corresponden a DNA cromosomal y 41 a DNA plasmídico, estos últimos tiene un tamaño total de 425513pb correspondiente al 7.56% del genoma total secuenciado (Tabla 2). El análisis del perfil plasmídico por la técnica de Eckhardt (1978) indica que la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr posee 2 megaplásmidos y tres plásmidos pequeños (Figura 15).

Tabla 2. Ensamble final					
Tamaño del genoma	L50	N90	# fragmentos	# fragmentos DNA cromosomal	# fragmentos DNA plasmídico
5,626,496 pb	1	112278	51	10	41

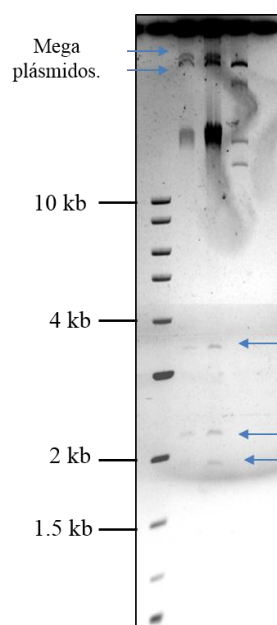


Figura 15. Perfil plasmídico obtenido por el procedimiento de Eckhardt (1978). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3: *K. pneumoniae* AqSCr. Carril 4: *K. pneumoniae* ATCC13883. Carril 5: *K. oxytoca* ATCC 13182.

VIII.4 Identificación genes que codifican posibles reductasas de Cr(VI) y generación de mutantes.

En el genoma de *K. pneumoniae* AqSCr fueron identificados 7 genes que codifican para proteínas homólogas a cromato reductasas sobre las que existe evidencia experimental reportadas en otras especies bacterianas. Estas incluyen una quinona reductasa (*kp396*), dos enzimas N-etilmaleimido reductasas (*kp4253* y *kp266*), una nitroreductasa (*kp2917*), dos dihidrolipoil deshidrogenasas (*kp1822* y *kp3896*) y una flavin oxidoreductasa de la familia OYE (*kp2515*) (Tabla 3, Figura 16).

Tabla 3. Genes de <i>K. pneumoniae</i> AqSCr cuyos productos tienen alto porcentaje de identidad a reductasas de Cr(VI) reportadas en otros microorganismos.				
Genes de AqSCr	% de identidad	Reductasas de Cr(VI) con evidencia experimental		
		Enzima	# Acceso	Microorganismo
<i>kp396</i> (<i>BHE81_22565</i>)	84.57	Reductasa de FMN dependiente de NADPH (YieF)	ABJ74146	<i>Escherichia coli</i> K12 (Ackerley et al., 2004).
	60.96	Reductasa de FMN dependiente de NADPH	D5QFC5	<i>Gluconacetobacter hansenii</i> ATCC23769 (Jin et al., 2012).
	39.56	Reductasa de FMN dependiente de NADPH (ChrR)	AF375642	<i>Pseudomonas putida</i> (Park et al., 2000).
	34.08	Reductasa de FMN dependiente de NADPH (FerB)	YP_917833	<i>Paracoccus denitrificans</i> (Mazoch et al., 2004).
<i>kp4253</i> (<i>BHE81_07500</i>) <i>kp226</i> (<i>BHE81_27485</i>)	86.58	N-ethylmaleimido reductasa quinona reductasa, familia OYE.	P77258	<i>Escherichia coli</i> K12 substr. MG1655 (Robins et al., 2013)
	42.38			
<i>kp2515</i> (<i>BHE81_06255</i>)	51.15	OYE Flavin oxidoreductasa ChrR	B0JDW3	<i>Thermus scotoductus</i> (Opperman et al., 2008).
<i>kp1822</i> (<i>BHE81_01995</i>) <i>kp4050</i> (<i>BHE81_01240</i>)	43.83	Dihidrolipoil deshidrogenasa	P85207	<i>Thermus scotoductus</i> ATCC700910/SA-01 (Opperman y van Heerden, 2008).
	43.23			
<i>kp2917</i> (<i>BHE81_20240</i>)	83.75	Nitroreductasa dependiente de NADPH insensible al O ₂ (nfsA).	P17117	<i>Escherichia coli</i> K12 (Ackerley et al., 2004).
	51.67	Reductasa de FMN dependiente de NADPH (nfsA)	P94424	<i>Bacillus subtilis</i> 168 (Morokutti et al., 2005).
	38.33	NADPH-flavin oxidoreductasa (nfsA)	AAA21331	<i>Vibrio harveyi</i> KCTC 2720 (Kwak et al., 2003).

Adicionalmente, se identificaron 4 arreglos de genes probablemente asociados a resistencia a arsénico los cuales fueron nombrados *ars1*, *ars2*, *ars3* y *ars4*. Dentro de los arreglos *ars1* (*kp423*) y *ars2* (*kp42-43*) se identificaron dos genes *arsH*, estos genes son importantes para nuestro estudio, ya que Xue et al. (2014) reportaron que la oxidoreductasa ArsH de *Synechocystis* sp. posee actividad reductasa de Cr(VI) y Fe(III). En la cepa AqSCr uno de los genes *arsH* (*arsH1*, *kp423*) está completo, mientras que el otro (*arsH2*, *kp42-43*) aparentemente no es funcional, ya

que tiene una inserción de 14 nucleótidos a la mitad del gen, lo cual provoca un cambio en el marco de lectura.

Por otra parte, cada uno de los cuatro arreglos *ars* de *K. pneumoniae* AqSCr poseen un gen *arsC* (arsenato reductasa), aunque las enzimas ArsC no han sido previamente asociadas a reducción de cromato es posible que por la homología química entre arsenato y cromato pudiera tener dicha actividad.

Los 5 genes que codifican para posibles reductasas de Cr(VI) solubles, así como los 4 arreglos *ars* fueron eliminados de *K. pneumoniae* AqSCr mediante doble recombinación homóloga para determinar si alguno de ellos está involucrado en la reducción de Cr(VI) en este microorganismo (Figura 16). Además de las mutantes sencillas se generaron dos mutantes múltiples: *K. pneumoniae* AqSCr *kp396⁻*, *kp2917⁻*, *kp2515⁻*, *kp266⁻*, *kp4253⁻*, *arsI⁻* y *K. pneumoniae* AqSCr *arsI⁻*, *ars2⁻*, *ars3⁻*, *ars4⁻* (Figura 17). La capacidad de reducción de Cr(VI) de las mutantes en comparación con la cepa silvestre fue evaluada en medio citato de sodio anaeróbico. Adicionalmente, se estudió la actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares.

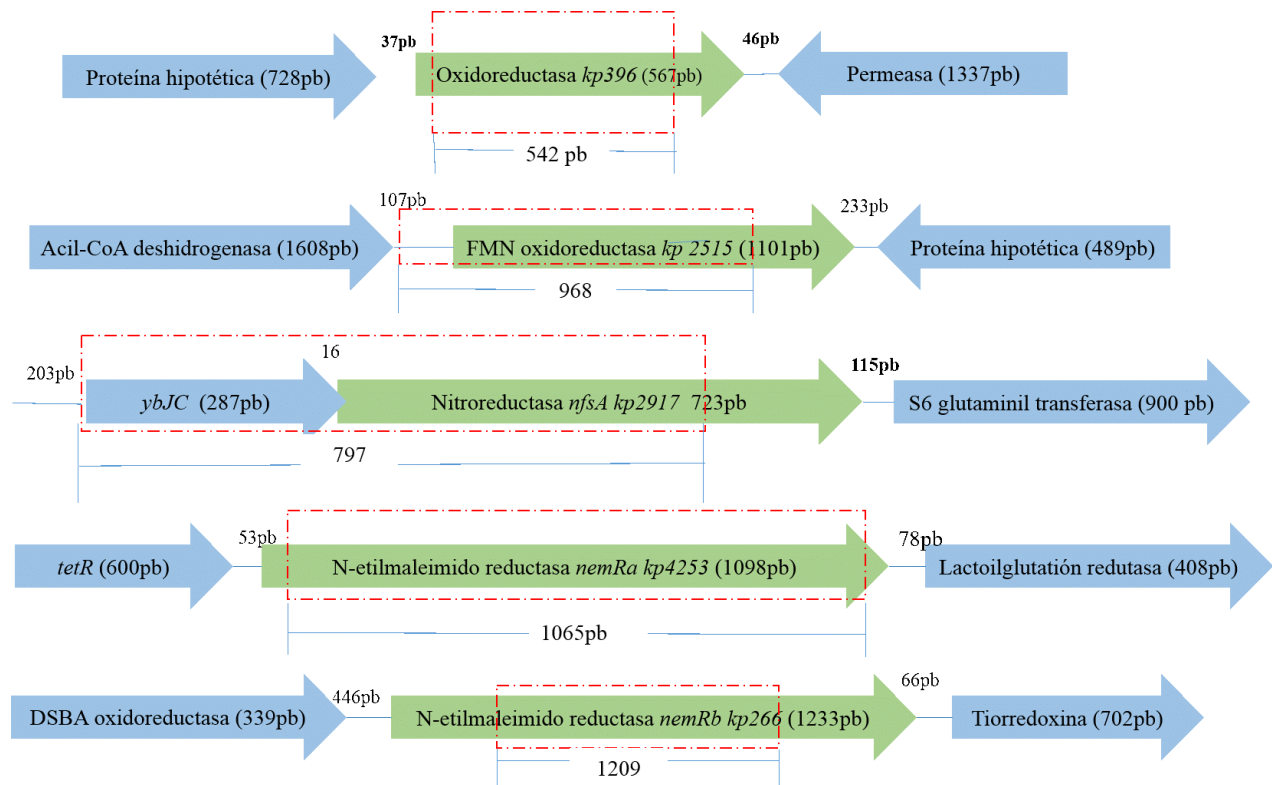


Figura 16. Esquema de las regiones del genoma *K. pneumoniae* AqSCr donde se realizó la eliminación de cada uno de los genes mediante doble recombinación homóloga. En verde se muestran los blancos a

eliminar y en azul los genes adyacentes. El cuadro rojo con líneas punteadas indica la región efectivamente eliminada.

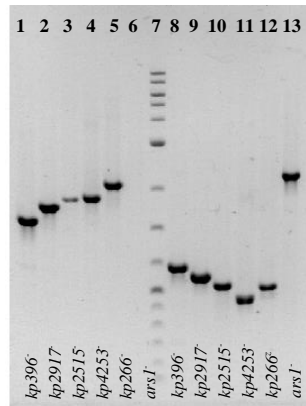


Figura 17. Productos de PCR obtenidos utilizando como templado DNA de la cepa silvestre (carriles 1-6) y de la mutante múltiple *K. pneumoniae* AqSCr *kp396*⁻, *kp2917*⁻, *kp2515*⁻, *kp266*⁻, *kp4253*⁻ *arsI*⁻ (carriles 8 al 13). Abajo se indica el gen al que corresponde cada carril. El carril 7 corresponde al marcador de peso molecular.

Ninguno de los cultivos de las mutantes presentó disminución en la reducción de Cr(VI) en comparación con la cepa tipo silvestre, incluso en las mutantes múltiples no se encontraron diferencias en cuanto a dicha capacidad (Figura 18a). Por otra parte, los extractos celulares de la mutante múltiple *K. pneumoniae* AqSCr *kp396*⁻, *kp2917*⁻, *kp2515*⁻, *kp266*⁻, *kp4253*⁻, *arsI*⁻ presentaron una importante disminución en la actividad reductasa de Cr(VI) con respecto a la cepa tipo silvestre (Figura 18b). En los extractos celulares de la mutante sencilla *K. pneumoniae* AqSCr *kp2515*⁻, también se observó una disminución significativa en la actividad reductasa de Cr(VI) con respecto a la cepa tipo silvestre, pero el efecto fue menor que en la mutante múltiple (Figura 18b).

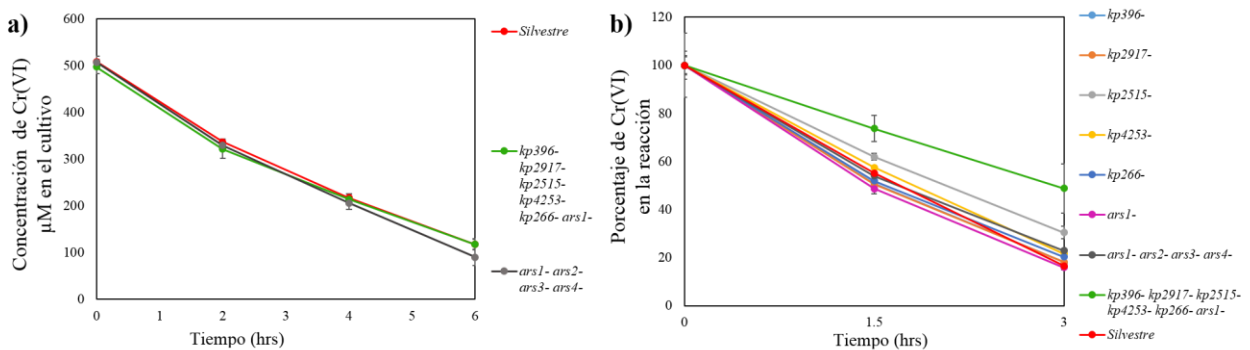


Figura 18. Capacidad de reducción de Cr(VI) en las cepas mutantes en comparación con *K. pneumoniae* AqSCr tipo silvestre. a) Reducción de Cr(VI) por cultivos en crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes múltiples. b) Actividad reductasa de Cr(VI) en extractos celulares de la cepa silvestre y todas las mutantes.

En resumen, la mutante *K. pneumoniae* AqSCr *kp396*⁻, *kp2917*⁻, *kp2515*⁻, *kp266*⁻, *kp4253*⁻, *arsI*⁻ no presenta diferencias en su capacidad de reducir Cr(VI) durante el crecimiento con respecto a la cepa tipo silvestre, sin embargo, sus extractos celulares poseen menor actividad reductasa de Cr(VI) dependiente de NADH. Estos resultados sugieren dos posibilidades: 1) que la actividad reductasa de Cr(VI) detectada en los extractos celulares no está relacionada con la actividad *in vivo*, o 2) que *K. pneumoniae* AqSCr posee una redundancia de genes que codifican enzimas con la capacidad de reducir Cr(VI) *in vivo*, pero la disponibilidad de NADH (u otro compuesto) en la célula limita la tasa de reducción de Cr(VI).

VIII.5 Generación y análisis de una mutante en el gen *chrA*.

El mecanismo de resistencia a cromo mejor estudiado consiste en la expulsión de cromato desde citoplasma hacia el exterior de la célula a través del transportador ChrA, cuyo gen es regulado transcripcionalmente por ChrB. En el genoma de *K. pneumoniae* AqSCr fueron identificados ambos genes, estando *chrB* río arriba de *chrA* (Figura 19). Mediante el análisis de dominio con la herramienta CD-Search de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) se comprobó que su anotación fue correcta. El gen *chrA* fue eliminado mediante recombinación homóloga con el objetivo de determinar su contribución a la resistencia a Cr(VI) en *K. pneumoniae*.

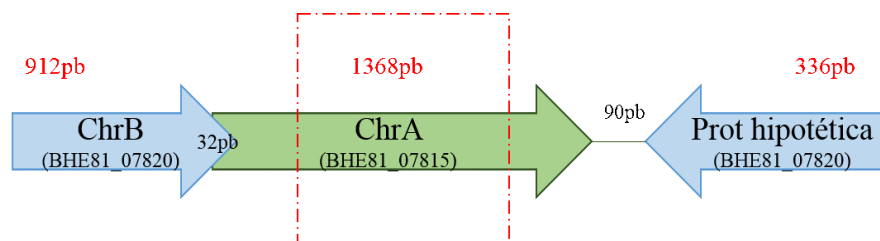


Figura 19. Esquema del operón *chrBA* presente en *K. pneumoniae* AqSCr, el recuadro rojo indica la región que fue eliminada. Se indican los códigos asignados en el GenBank para cada ORF y sus productos proteicos: ChrA transportador de cromato, ChrB regulador transcripcional.

Para determinar si la mutante *K. pneumoniae* AqSCr *chrA*⁻ perdió resistencia a Cr(VI) en comparación con la cepa tipo silvestre, se ensayó el efecto sobre el crecimiento en medio LB de 1 y 3mM de Cr(VI). Como se muestra en la Figura 20, la mutante *chrA*⁻ mostró un crecimiento similar al de la cepa tipo silvestre, indicando que la eliminación del gen *chrA* no afecta la

resistencia a Cr(VI) bajo las condiciones estudiadas. Este resultado sugiere que la cepa *K. pneumoniae* AqSCr posee otros mecanismos de resistencia a Cr(VI).

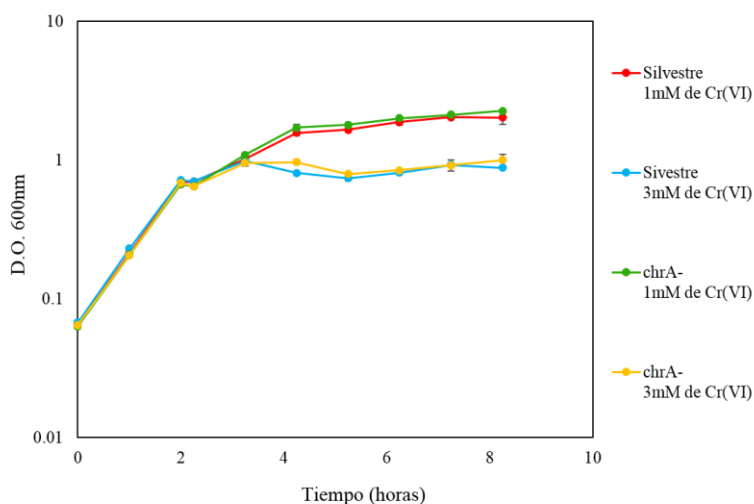


Figura 20. Crecimiento de la cepa tipo silvestre de *K. pneumoniae* AqSCr y la mutantes *chrA*⁻ en medio LB adicionado con 1mM y 3mM de Cr(VI) a las 2 horas de incubación. Las barras indican la desviación estándar.

VIII.6 Respuesta global a Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr.

Adaptación metabólica a Cr(VI).

Con el objetivo de determinar si *K. pneumoniae* AqSCr posee mecanismos de adaptación inducidos por Cr(VI), antes de secuenciar el transcriptoma se realizaron ensayos de crecimiento de cultivos en medio LB pH 8 con 11mM de Cr(VI), inoculados con células cultivadas en presencia y ausencia de Cr(VI). Como se observa en la Figura 21, los cultivos inoculados con células sin adaptar a Cr(VI) presentan un crecimiento bifásico con un periodo de muerte y después de las 6 horas se inició la fase de crecimiento exponencial. Por otra parte, en los cultivos inoculados con células pre adaptadas a Cr(VI) no ocurrió el periodo de muerte, la fase de crecimiento exponencial empezó a las 3 horas de incubación alcanzado una viabilidad superior a las 24 horas de incubación en comparación con los cultivos inoculados con células no adaptadas. Cuando las células adaptadas a Cr(VI) fueron inoculadas en medio LB en ausencia de Cr(VI) y posteriormente re expuestas al metal, presentaron la misma fase de muerte y recuperación, indicando que la adaptación a Cr(VI) observada en la Figura 21 es metabólica y no genética en respuesta a la previa exposición al metal.

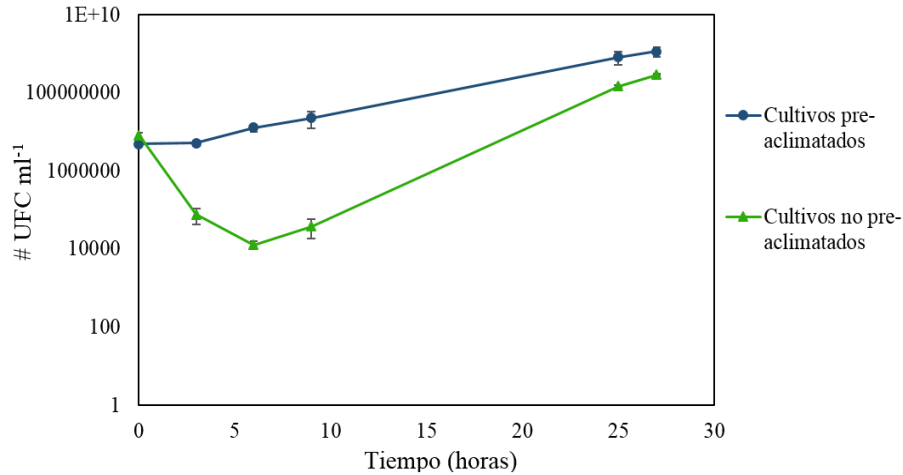


Figura 21. Crecimiento de *K. pneumoniae* AqSCr en medio LB pH 8 con 11mM de Cr(VI): células sin pre-adaptar (triángulos verdes) vs células pre-adaptadas a 11mM de Cr(VI) (círculos azules). Las barras de error indican la desviación estándar.

En la Figura 22 se muestran las micrografías de transmisión electrónica de células de *K. pneumoniae* AqSCr cultivadas en medio LB pH8 con 11mM de Cr(VI), en ellas se observa la presencia intracelular de nanopartículas con alta densidad electrónica que no se observan en los cultivos crecidos en la ausencia de Cr(VI). En la mayoría de las células las nanopartículas se observaron en posiciones ordenadas, lo cual indica que su síntesis es localizada. Los cortes no fueron tratados con acetato de uranilo, por lo tanto, el contraste se debe a la presencia del cromo. Posteriores análisis de XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) deben de llevarse a cabo para determinar la composición elemental de las nanopartículas.

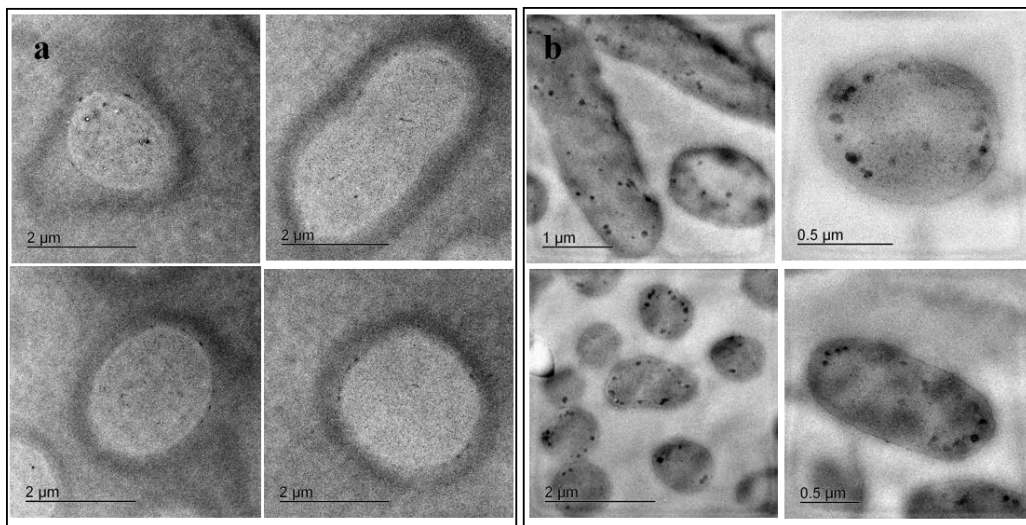


Figura 22. Micrografías de transmisión electrónica de *K. pneumoniae* AqSCr a) crecida en medio LB pH 8 solo y b) crecida en medio LB pH 8 con 11mM de Cr(VI). Cortes sin tinción con acetato de uranilo.

Análisis global de expresión diferencial de genes en presencia y ausencia de Cr(VI): estudios de RNAseq.

En los últimos años las aproximaciones ómicas han permitido estudiar la repuesta global de los microorganismos a diversos ambientes y condiciones de cultivo, conduciendo a una mayor comprensión de diversos procesos como la supervivencia bacteriana en condiciones extremas de estrés. El primer estudio de respuesta global a Cr(VI) fue el análisis del transcriptoma de *Shewanella oneidensis* MR1 mediante microarreglos (Bencheikh-Latmani et al., 2005), desde entonces, un total de 12 estudios globales han sido reportados, los cuales consistieron en análisis proteómicos, de microarreglos y un estudio mediante RNAseq, de únicamente 7 especies bacterianas y una levadura (Tabla 4). Los resultados de estos estudios revelan que algunas vías generales se encuentran prendidas en respuesta a la presencia de Cr(VI), sin embargo, varios elementos de dichas vías son diferentes. Hasta el momento, no existe ningún estudio global de la respuesta a Cr(VI) en el género *Klebsiella*. En el presente trabajo se realizó la implementación de tecnologías de secuenciación masiva para estudiar el transcriptoma (RNAseq) en presencia y ausencia de Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr, ya que esta herramienta ómica tiene una alta sensibilidad.

Tabla 4. Estudios de respuesta global a Cr(VI) en diferentes microorganismos.					
Microorganismo	Tipo de análisis	Referencia	Condición de oxígeno	Medio	Concentración de Cr(VI)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Microarreglos	Bencheikh-Latmani et al., 2005	anaerobiosis	SM	0.1mM
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Microarreglos y proteómica	Brown et al., 2006	aerobiosis	LB pH 7	1mM
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Microarreglos y proteómica	Chourey et al., 2006	aerobiosis	LB pH 7.2	0.3mM
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Proteómica	Thompson et al., 2007	aerobiosis	LB pH 7.2	0.3, 0.5 y 1.0mM
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Microarreglos	Chourey et al., 2008	aerobiosis	LB pH 7.2	0.3mM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteómica	Kilic et al., 2010	aerobiosis	NB pH 8	300mg/l
<i>Caulobacter crescentus</i>	Microarreglos	Hu et al., 2005	aerobiosis	M2G	40-54uM
<i>Arthobacter</i> sp. FB24	Proteómica	Henne et al., 2009	aerobiosis	NB	5 y 20mM
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Proteómica	Thompson et al., 2010	aerobiosis	LB y M9	1mM
<i>Ralstonia metallidurans</i>	Microarreglos	Monsieurs et al., 2011	aerobiosis	TrisMMM-gluconate	0.1mM
<i>Staphylococcus aureus</i> LZ-01	RNAseq	Zhang et al., 2014	aerobiosis	M9	0.4mM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microarreglos	Jin et al., 2008	aerobiosis	YPD	0.4 y 1.7mM

Para realizar los estudios de RNAseq, fueron cosechados cultivos de *K. pneumoniae* AqSCr en medio LB pH 8 con y sin 11mM de Cr(VI) (30°C, 250rpms) en fase exponencial. A continuación, el RNA total fue purificado y tratado con DNAsa y exonucleasa, posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA. Finalmente, tres bibliotecas (correspondientes a replicas biológicas) de cada condición fueron secuenciadas.

Tabla 5. Resultados de secuenciación	
Bibliotecas	Lecturas totales
A1 (Sin Cr)	8764966
A2 (Sin Cr)	15935358
A3 (Sin Cr)	12924698
B1 (Con Cr(VI))	12507755
B2 (Con Cr(VI))	13496910
B3 (Con Cr(VI))	8786756

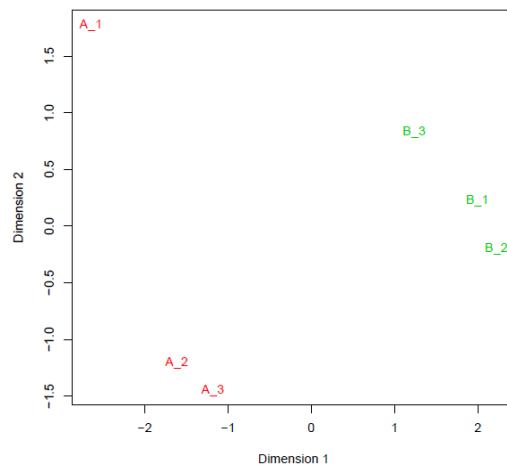


Figura 23. Dispersión de los datos de las bibliotecas del transcriptoma de *K. pneumoniae* AqSCr en ausencia (A) y en presencia de 11mM de Cr(VI) (B).

En la Tabla 5 se muestran el número de lecturas obtenidas para cada biblioteca y en la Figura 23 se muestra la dispersión de los datos crudos obtenida utilizando R. De acuerdo a este análisis, una de las bibliotecas de cada condición (A_1 y B_3) presentó mayor dispersión que sus otras dos replicas, además, tuvo menor número de lecturas, a pesar de ello se agrupa claramente con las otras, por lo que las tres replicas de cada condición fueron utilizadas en el análisis. El universo total de lecturas mapeó sobre 5420 ORFs del genoma de *K. pneumoniae* AqSCr, de los cuales fueron filtrados aquellos con conteos poco significativos, obteniendo un set final de 5097 ORFs, que fueron sujetos a análisis de expresión diferencial con tres diferentes métodos DESeq, EdgeR y NOISeq (Anders y Huber, 2010; Robertson et al., 2010, Tarazona et al., 2011). Un total de 539

ORFs mostraron expresión diferencial de acuerdo a los tres métodos (Figura 24), 259 se encontraron sobreexpresados en ausencia de Cr(VI) y 280 en presencia de Cr(VI). Los datos de expresión diferencial obtenidos por RNAseq fueron validados mediante qRT-PCR de 11 genes (Tabla 6). Los ORF *kp4174*, *kp708* y *kp3531* que no mostraron expresión diferencial en los datos obtenidos por RNAseq fueron utilizados como controles internos, sin embargo, únicamente *kp708* fue utilizado para normalizar. Como se muestra en la Tabla 6 se obtuvo una correspondencia entre los datos obtenidos por RNAseq y por qRT-PCR (esto se observó aún con los datos crudos, antes de realizar la normalización con el control interno).

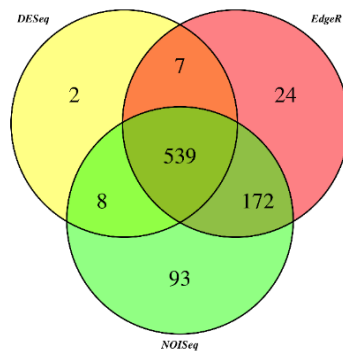


Figura 24. Expresión diferencial de genes de *K. pneumoniae* AqSCr en presencia y ausencia de Cr(VI). En la imagen se muestra el número de genes expresados diferencialmente de acuerdo a DESeq, EdgeR y NOISeq (Anders y Huber, 2010; Robertson et al., 2010, Tarazona et al., 2011).

Tabla 6. Validación del análisis de RNA seq mediante qR-TPCR				
ORF	Función del producto del gen	RNAseq		qRT-PCR
		Log2NC	NC	2- $\Delta\Delta C_t$
<i>kp14</i> (BHE81_25425)	Permeasa de sulfato	4.56	23.67	2.42
<i>kp598</i> (BHE81_12570)	RpoE	1.62	3.08	2.70
<i>kp2076</i> (BHE81_19460)	Citrato sintasa	1.51	2.84	2.59
<i>kp3165</i> (BHE81_07325)	Citocromo b (561)	1.94	3.83	8.84
<i>kp3746</i> (BHE81_10435)	Tirosina quinasa Wzc	3.17	9.00	1.40
<i>kp4428</i> (BHE81_25140)	Citocromo soluble b562	1.50	2.84	2.45
<i>kp635</i> (BHE81_12780)	RecN proteína de reparación de DNA (Reparación de rupturas de doble cadena)	1.56	2.94	4.14
<i>kp4050</i> (BHE81_01240)	Dihidrolipoamida deshidrogenasa, complejo piruvato deshidrogenasa.	0.64	1.56	2.13
<i>kp602</i> (BHE81_12590)	Piruvato formato liasa	-5.21	0.03	0.03
<i>kp2087</i> (BHE81_19515)	Citocromo d ubiquinol oxidasa subunidad II	-2.60	0.17	0.16
<i>kp4689</i> (BHE81_03385)	Citrato sintasa	-4.31	0.05	0.03
<i>kp4174</i> (BHE81_23755)	RNA polimerasa DNA-dirigida, subunidad beta'	0.02	1.01	1.39
<i>kp708</i> (BHE81_13165)	Alanil-tRNA sintetasa	-0.04	0.97	1.00
<i>kp3531</i> (BHE81_09265)	L-serina deshidratasa subunidad beta	-0.04	0.97	0.77

Las secuencias proteicas de los ORF diferencialmente expresados fueron analizadas para la asignación de KOs (KEGG orthology). La categorización funcional general se muestra en la Figura 25. A continuación se describen algunos de los elementos diferencialmente expresados de mayor relevancia con relación a la respuesta a Cr(VI).

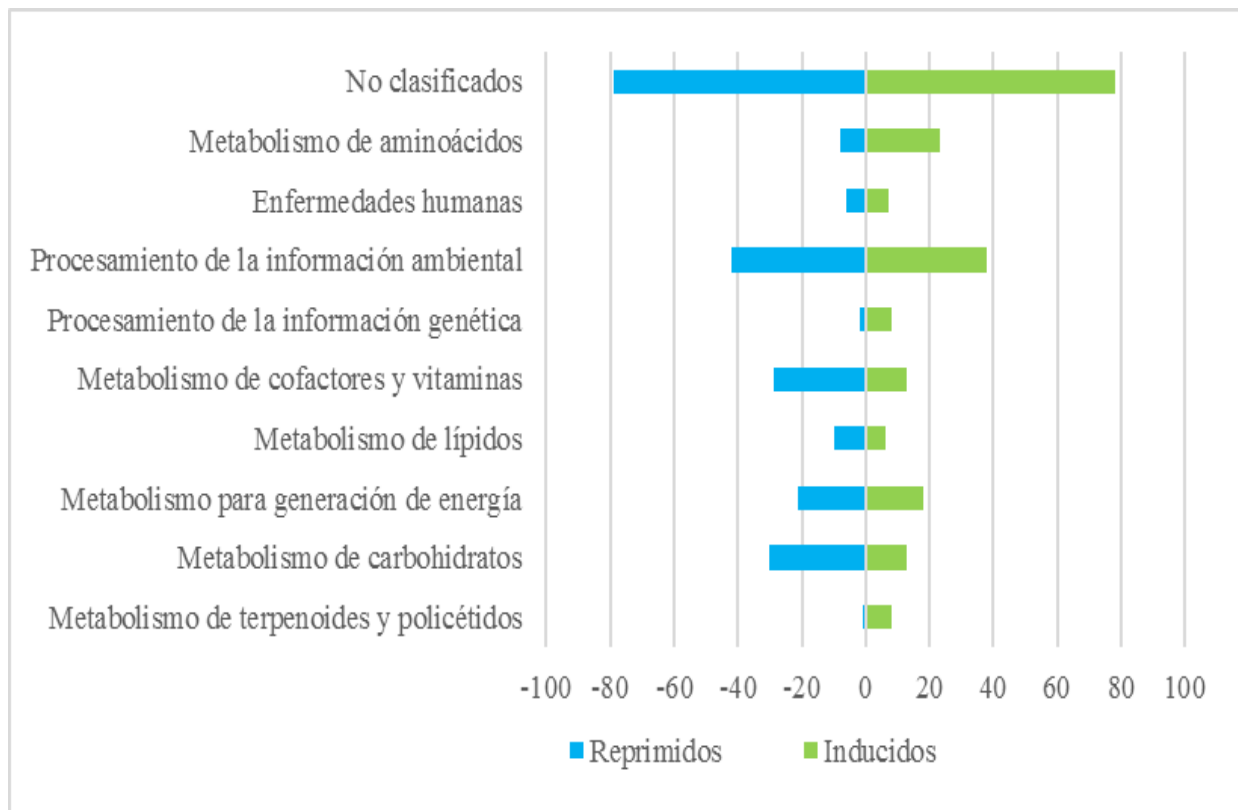


Figura 25. Categorización funcional genes de *K. pneumoniae* AqSCr expresados diferencialmente en presencia de 11mM de Cr(VI) con respecto a la condición sin Cr(VI).

Genes diferencialmente expresados:

En respuesta a la presencia de Cr(VI) se encontraron sobreexpresados genes relacionados a transporte de electrones, reparación de ADN, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés osmótico, adquisición de sulfato, respuesta a limitación de fosfato, limitación de hierro, transporte de molibdeno, metabolismo de ácidos grasos, síntesis de los grupos Fe-S, metabolismo de aminoácidos y reparación de proteínas (Apéndice 2). Por otra parte, se encontraron reprimidos genes relacionados al transporte de níquel y cobalto, síntesis de cobalamina, transporte de electrones, metabolismo de aminoácidos, síntesis de fagos y algunos genes relacionados a estrés oxidativo, reparación de ADN y transporte de hierro.

A) Genes relacionados a transporte de electrones.

Uno de los aspectos importantes y aún poco comprendidos son las alteraciones en la maquinaria de generación de energía y transporte de electrones durante la exposición y reducción aeróbica de

ORF	Producto del gen	Nivel de cambio	Log2 de N. cambio
<i>kp396 (BHE81_22565)</i>	Oxidoreductasa	0.7	-0.6
<i>kp4253 (BHE81_07500)</i>	N-etilmaleimido reductasa	1.0	0.0
<i>kp2917 (BHE81_20240)</i>	Nitroreductasa	0.9	-0.2
<i>kp2515 (BHE81_06255)</i>	Flavin oxidoreductasa OYE	1.4	0.4
<i>kp266 (BHE81_27485)</i>	N-etilmaleimido reductasa	1.3	0.4
<i>kp423 (BHE81_27795)</i>	ArsH1	1.1	0.2
<i>kp1822 (BHE81_01995)</i>	Dihidrolipoil deshidrogenasa	0.8	-0.4
<i>kp3896 (BHE81_01240)</i>	Dihidrolipoil deshidrogenasa	1.5	0.6
<i>kp4310 (BHE81_07815)</i>	ChrA	2.0	1.0
<i>kp4311 (BHE81_07820)</i>	ChrB	1.6	0.7

Cr(VI). En este estudio mostraron sobreexpresión los genes que codifican para una enzima citrato sintasa, el complejo succinato deshidrogenasa (tres subunidades), el citocromo soluble b562 y el citocromo de membrana b561 (los cuales no tienen una función biológica asignada), así como el complejo ATP sintasa (las cuatro subunidades). Por otra parte, se encontraron reprimidos los genes que codifican para otra enzima citrato sintasa, el complejo fumarato reductasa (cuatro subunidades) y el complejo citocromo bd oxidasa (subunidades I y II). De estos resultados es de gran importancia la expresión diferencial de los dos genes que codifican para citrato sintasas, uno reprimido y otro sobreexpresado, este fenómeno no se ha reportado en los otros estudios de respuesta global a Cr(VI) y sería muy relevante estudiar las diferencias tanto de regulación como de función de dichas citrato sintasas. Por otra parte, genes involucrados en la vía de reducción de nitrato fueron reprimidos en presencia de Cr(VI), incluyendo a los que codifican el sistema de dos componentes NarXL, un transportador de nitrato/nitrito tipo MFS, el complejo nitrito reductasa, el complejo nitrato reductasa, el complejo formato deshidrogenasa N (dependiente de nitrato), así como varios genes involucrados en la biosíntesis de menaquinonas, indicando que en

presencia de Cr(VI) *K. pneumoniae* AqSCr detiene la transferencia de electrones desde el formato hacia el nitrato, ya que se sabe que el complejo formato deshidrogenasa N transfiere los electrones del formato hacia menaquinonas embebidas en membrana, las cuales son oxidadas por el complejo nitrato reductasa que transfiere estos electrones al nitrato (Berg et al., 1991). Estos resultados sugieren que la exposición a Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr conduce a un redireccionamiento en el flujo de electrones hacia elementos específicos de la cadena de transporte y a un incremento en la tasa de generación de ATP y/o en los requerimientos de este último. Ninguno de los genes que codifican para proteínas homólogas a las reductasas de Cr(VI) reportadas en otros microorganismos mostró expresión diferencial (Tabla 7), en concordancia con los resultados de las mutantes en dichos genes.

B) Genes asociados a replicación y reparación de ADN.

El daño a DNA por exposición a Cr(VI) ha sido ampliamente estudiado y demostrado (Kortenkamp et al., 1996; Slade et al., 2005; Casadevall et al., 1999), por lo tanto, la activación de sistemas de reparación de ADN debe ser crítica en bacterias capaces de resistir altas concentraciones de este metal. En *K. pneumoniae* AqSCr se encontraron sobreexpresados los genes que codifican para RecN y HNS (proteínas involucradas en reparación de rupturas de doble cadena de ADN) así como, las endonucleasa Nfo y Cho involucradas en reparación por excisión de bases. En contraste con otros reportes, *recA* no mostró expresión diferencial, por el contrario, se encontró sobreexpresado el gen *dinI* (inhibidor de la acción de RecA). También mostraron sobreexpresión los genes *ssbp*, *nrdH*, *nrdA* y *nrdB* involucrados en reparación y replicación de ADN. Por otra parte, se encontró reprimido un gen que codifica una exodeoxiribonucleasa VIII (actividad 5'-3' exonucleasa sobre DNA de doble cadena).

C) Genes asociados a respuesta a estrés oxidativo.

La reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) tanto por compuestos reducidos (como el glutatión), como por enzimas que transfieren un solo electrón, conduce a la formación de los intermediarios Cr(V) y Cr(IV), los cuales a su vez conducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y H₂O₂ generando estrés oxidativo. Como estrategia para contender con este estrés, las células modulan la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante. Con relación a esto, en *K. pneumoniae* AqSCr se encontraron sobreexpresados los genes que codifican para una tiol peroxidasa, una Mn-superóxido dismutasa (SodA) y el regulador

transcripcional SoxX. Por otra parte, se encontraron reprimidos los genes que codifican una enzima catalasa/peroxidasa y una Fe-superóxido dismutasa (SodB). Estos resultados son de gran relevancia, ya que las enzimas superóxido dismutasas catalizan la reacción $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, mientras que las peroxidasas son capaces de reducir el peróxido de hidrogeno a agua (Branco y Morais, 2016), por lo tanto, en conjunto son potencialmente capaces de eliminar las especies reactivas de oxígeno y el peróxido de hidrogeno. La sobreexpresión y represión de dos superóxido dismutasas hace sentido debido a diversos antecedentes sobre este tipo de enzimas. Tanto las Mn-SOD como las Fe-SOD participan en respuesta a estrés oxidativo, sin embargo, se ha propuesto que las enzimas Fe-SOD responden a estrés en general, mientras que las Mn-SOD son inducidas por factores específicos (en este caso por cromo). Además, se ha propuesto que existe una especialización de las Mn-SOD para la protección de DNA y de las Fe-SOD para la protección de proteínas citoplasmáticas (Hopkin et al., 1992). Adicionalmente, se ha sugerido que las Mn-SOD evolucionaron de las Fe-SOD en ambientes con bajas concentraciones de hierro (véase “respuesta a deficiencia de Fe” más adelante) (Aguirre et al., 2013). Recientemente, fue reportado que los genes *chrC* y *chrF* del determinante genético de resistencia a Cr(VI) denominado *TnOtchr* de la cepa *Ochrobactrum tritici*5bv11 codifican para una Fe-superóxido dismutasa (ChrC) y una Mn-superóxido dismutasa (ChrF), respectivamente, encontrándose que su presencia es importante para evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno durante la exposición a Cr(VI), sin embargo, en ausencia del gen *chrC* (Fe-Sod) existe una mayor acumulación de ROS que en ausencia de *chrF* (Mn-Sod), indicando una mayor contribución de ChrC. Por otra parte, estudios de respuesta global a Cr(VI) en *Shewanella oneidensis*, se encontró la sobreexpresión de una Fe-superóxido dismutasa (Brown et al., 2006; Chourey et al., 2006), mientras que en *Caulobacter crescentus* se encontró la sobreexpresión de una Mn-superóxido dismutasa en respuesta a cromo, cadmio y uranio (Hu et al., 2005). De acuerdo a los estudios mencionados, es posible que en diferentes microorganismos exista un uso preferencial de las Fe o Mn superóxido dismutasa en respuesta al estrés oxidativo generado por Cr(VI).

Entre los genes de respuesta a estrés oxidativo también se encontraron sobreexpresados genes que codifican para los elementos involucrados en la vía de síntesis de centros hierro-azufre [Fe-S]. Estos cofactores son requeridos para funciones celulares fundamentales, incluyendo respiración y su ensamble debe ser muy fino para evitar la toxicidad de iones libres de hierro y azufre. En

bacterias existen tres vías de ensamble de los centros [Fe-S]; 1) elementos Isc (de mantenimiento o “Housekeeping”), 2) elementos Suf (utilizados bajo condiciones de estrés) y 3) elementos Nif (utilizados para el ensamble de centros especializados [Fe-S] de enzimas específicas) (Ayala-Castro et al., 2008). En el presente estudio se encontraron sobreexpresados tanto genes *isc*, como *suf*. En estudios recientes se ha visto que tanto el sistema Isc como el Suf son inducidos por estrés oxidativo o en condiciones de limitación de hierro (Ayala-Castro et al., 2008) pero no se habían asociado a estrés por cromo.

Por otra parte, se encontraron reprimidos los genes que codifican para las proteínas de estrés universal E, F y G.

D) Genes asociados a respuesta a limitación de sulfato.

El azufre es un elemento esencial para todos los seres vivos, ya que forma parte de cofactores como la biotina, coenzima A, S-adenosilmetionina, tiamina, glutatión, ácido lipoico y de los grupos Fe-S, así como de los aminoácidos cisteína, metionina y selenocisteína (Aguilar-Barajas et al., 2011). En bacterias existen varias vías de asimilación de azufre, estas incluyen la adquisición de sulfato (SO_4^{2-}), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), ésteres de sulfato, sulfamatos, sulfonatos, metionina o cisteína (Davies et al., 1999). Sin embargo, para la mayoría de los microorganismos la fuente de azufre preferencial es el anión sulfato (Whalen y Warman, 1996). En diversos estudios se ha demostrado que el ion cromato es transportado al interior de la célula a través de los transportadores de sulfato, ejerciendo una inhibición sobre el transporte de este último y por lo tanto una deficiencia de azufre para la célula (Aguilar-Barajas et al., 2011). En bacterias se han encontrado cuatro familias de transportadores de sulfato SulT (CysPTWA), SulP, CysP/(PiT) y CysZ, pero el transporte de cromato ha sido encontrado únicamente en el caso de los transportadores SulT y CysP (Aguilar-Barajas et al., 2011). En el genoma de *K. pneumoniae* AqSCr están presentes los genes *cysPTWA*, un gen *cysZ* y 3 genes *sulP*. De ellos, únicamente uno de los genes *sulP* mostró expresión diferencial con un Log2NC de 4.6, este gen *sulP* es el único de los tres que se encuentra adyacente a un gen que codifica para una anhidrasa carbónica, la cual mostró un Log2NC de 6.4, lo cual es interesante y que se sabe que los genes *sulP* codifican para permeasas de sulfato cotransportadoras de HCO_3^- (Aguilar-Barajas et al., 2011). También se encontró la sobreexpresión de dos genes que codifican para posibles arilsulfatasas, esto resulta interesante porque estas enzimas participan en sistemas de transporte de sulfato de alta afinidad

ya que liberan el anión sulfato de sulfatos orgánicos esterificados y se ha reportado su sobreexpresión en condiciones de limitación de sulfato (Davies et al., 1999).

Además de los genes involucrados en el transporte de sulfato se encontraron sobreexpresados los genes de otras tres vías de adquisición de azufre: el sistema de transporte de taurina (*tauABCDE*), el sistema de transporte de alkenosulfonatos (*ssuEADCB*) y el sistema de transporte de metionina. Estos resultados sugieren que en la cepa *K. pneumoniae* AqSCr la presencia de Cr(VI) conduce a una deficiencia de azufre, que es compensada con la activación de varios sistemas de adquisición de este elemento como una de las estrategias de resistencia a Cr(VI).

E) Genes asociados a respuesta a limitación de hierro.

Al igual que el azufre, el hierro es un elemento esencial para diversas funciones celulares y en diversos estudios se ha reportado que la presencia de cromo conduce a una deficiencia de hierro en varios microorganismos, aunque no se ha determinado claramente cuál es el mecanismo por el que se genera dicha deficiencia (Wang y Newton, 1969). En *K. pneumoniae* AqSCr la presencia de Cr(VI) condujo a la sobreexpresión de alrededor de 47 genes involucrados en la adquisición de hierro, incluyendo el gen *fecl* el cual codifica para un factor sigma de la RNA polimerasa de respuesta a limitación de hierro, así como los genes que codifican el sistema de transporte Fe(III)-dicitrato (*fecABCDE*), el sistema de transporte Fe^{2+}/Mn^{2+} (*sitABCD*), el sistema de transporte de enterobactina (*ent*), entre otros. En algunas bacterias se ha reportado que en condiciones de estrés por deficiencia de hierro se induce la importación de manganeso para substituir al hierro como cofactor en algunas enzimas (Martin et al., 2015). En *K. pneumoniae* AqSCr encontramos sobreexpresado el gen *mntH* que codifica para un transportador de manganeso, así como un gen vecino que codifica una proteína hipotética con un Log2FC de 2.2 y 1.8 respectivamente. En *E. coli* se ha reportado que el transportador *mntH* es inducido, además, como parte de la respuesta OxyR en condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno (Anjem et al., 2009). Estos resultados indican una gran redundancia de genes que responden a la deficiencia de hierro generada por la exposición a cromo.

F) Genes asociados a respuesta a limitación de fofato.

Entre los genes involucrados en deficiencia de fofato mostraron sobreexpresión *phoH*, *phoB* y *ptsH*. En los estudios de respuesta global a cromo de *Caulobacter crescentus* se encontró también

la sobreexpresión del gen *phoH* (Hu et al., 2005), mientras que en *Shewanella oneidensis* el gen *phoH* mostro represión en presencia de Cr(VI) (Chourey et al., 2006). Lo cual sugiere que el Cr(VI) podría tener diferentes efectos en relación a la adquisición y metabolismo de fosfato en diferentes microorganismos.

G) Genes asociados a transporte de molibdeno.

El molibdeno es un metal esencial para la mayoría de las bacterias (exceptuando las que usan tungsteno). El molibdeno es importado al interior de las células como molibdato MoO_4^{2-} principalmente por el sistema de transporte de sulfato-tiosulfato SulT (*CysPTWA*) (debido a su analogía estructural con el sulfato) y a través del sistema de alta afinidad ModABC (Aguilar-Barajas et al., 2011). Como se mencionó, el sistema SulT transporta también iones cromato (CrO_4^{2-}), por lo tanto, la presencia de este último puede conducir a la inhibición competitiva del transporte de otros aniones incluyendo al MoO_4^{2-} . Por otra parte, el transporte de cromato por el sistema ModABC no ha sido estudiado. En *K. pneumoniae* AqSCr se encontró la sobreexpresión de los genes *modA* y *modB* con un Log2NC de 1.66 y 1.96 respectivamente, mientras que *modC* mostró una ligera sobreexpresión con un Log2NC de 1.26. Estos resultados indican que en *K. pneumoniae* AqSCr la presencia de Cr(VI) conduce a una deficiencia en molibdeno, que causa la expresión del sistema ModABC.

H) Genes asociados a síntesis y degradación de proteínas.

Ha sido reportado que algunas condiciones de estrés conducen a un incremento en la síntesis de subunidades ribosomales específicas para compensar una baja tasa de iniciación de la traducción (O'Connell y Thomashow, 2000). La sobreexpresión de subunidades del ribosoma en presencia de Cr(VI) también ha sido reportada en *Pseudomonas aeruginosa* (Kilic et al., 2010), así como, en *Shewanella oneidensis* (Bencheikh-Latmani et al., 2005; Chourey et al., 2006). En este estudio se encontraron sobreexpresados cinco genes que codifican subunidades del ribosoma incluyendo S16, S21, S22, L13, L27 y L28. Adicionalmente, se encontraron sobreexpresados los genes que codifican para posibles chaperonas periplasmáticas involucradas en el replegamiento de proteínas, así como, la sobreexpresión del gen *htrA/depG* (que codifica una endoproteasa involucrada en el control de calidad de proteínas de membrana) y del gen *htpX* (que codifica proteasa de membrana regulada por estrés).

I) Genes asociados a respuesta a estrés osmótico y daño en la envoltura celular.

Los elementos que integran la envoltura celular juegan un papel fundamental en la resistencia tanto a Cr(VI), como a otros metales. En varios de los estudios de respuesta global a Cr(VI) se ha reportado la sobreexpresión de genes involucrados en mantener la integridad tanto de la cápsula, como de las membranas celulares. En *K. pneumoniae* AqSCr la presencia de Cr(VI) condujo a la sobreexpresión del gen *rpoE* que codifica para un factor sigma 70 de la RNA polimerasa, cuya función principal es mediar la respuesta a estrés en la envoltura celular y a estrés extra-citoplasmático en general (Rhodius et al., 2006), sin embargo, su expresión en respuesta a Cr(VI) no ha sido previamente reportada. Por otra parte, se encontraron sobreexpresados 6 genes que codifican elementos involucrados en respuesta a choque osmótico (*cpxP*, *osmF*, *osmB*, *osmF* y *osmC*). El gen *cpxP* que codifica para una proteína periplasmática de respuesta a envoltura celular, un gen que codifica posiblemente involucrada en formación de esferoplastos y el gen *wzc* que codifica una tirosina quinasa involucrada en síntesis de exopolisacáridos. También se encontraron diferencialmente expresados (tanto negativa como positivamente) genes de degradación, síntesis y modificación de ácidos grasos, lo cual sugiere una activa modificación de la membrana.

J) Otros genes con expresión diferencial.

Además de los genes mencionados, diversos genes mostraron expresión diferencial, sin embargo, su papel en la resistencia o reducción de Cr(VI) es difícil de comprender. Entre ellos mostraron sobreexpresión un total de 23 genes involucrados en síntesis y degradación de aminoácidos y 8 genes con estas funciones mostraron represión. Por otra parte, se encontró una represión de los genes que codifican para el sistema de transporte de níquel (*nikABCDEF*). También mostraron represión dos agrupamientos de genes *cbiABCDE* y *cbiTTFGHJKLMQOP* involucrados en la adquisición de cobalto y la síntesis de cobalamina, varios genes involucrados en síntesis de fimbrias (*fimA*, *fimE* y *fimD*), 18 genes relacionados a síntesis de bacteriófagos y 16 genes pertenecientes a sistemas pts.

En conjunto los resultados indican que la resistencia a cromo por *K. pneumoniae* AqSCr involucra la participación de diversas vías para reparar y/o prevenir los daños causados por este metal, que incluyen elementos de respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés osmótico,

adquisición de hierro y azufre y mecanismos de reparación de DNA. Un resumen de su posible participación se muestra en la Figura 26.

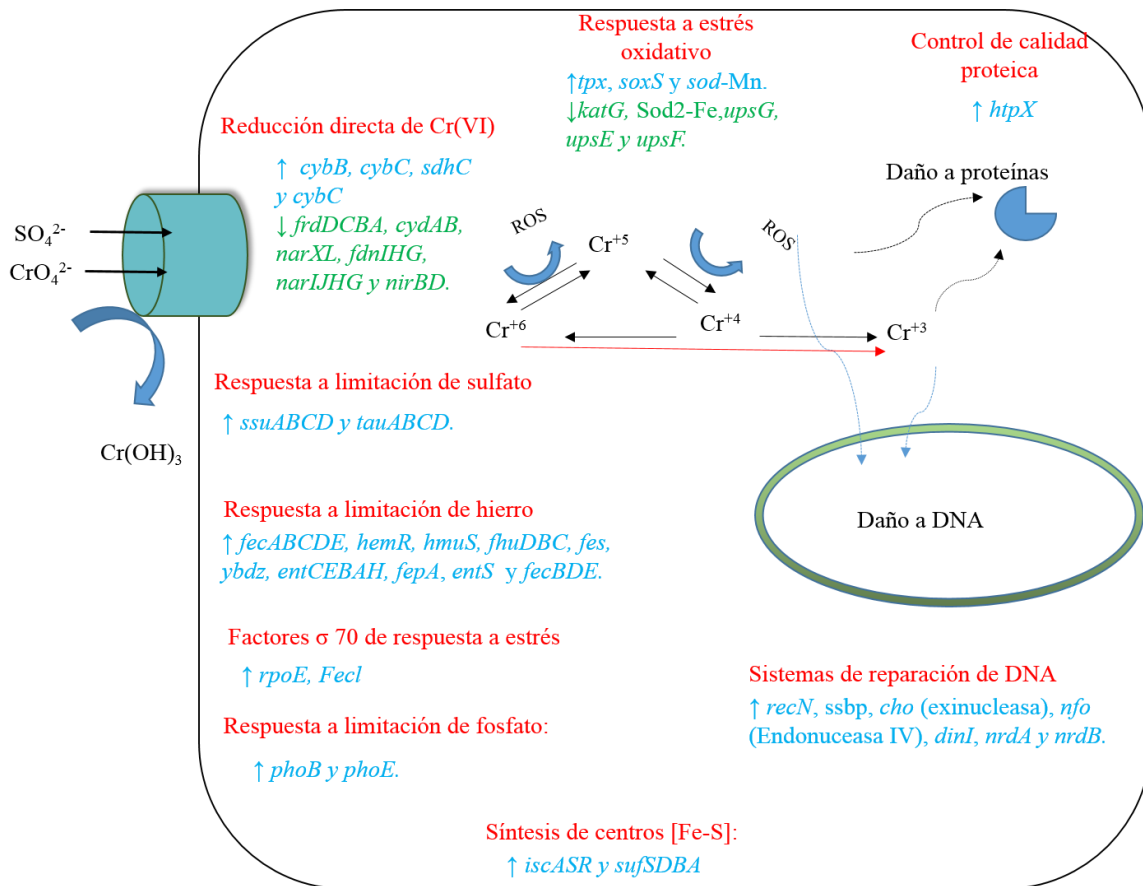


Figura 26. Elementos genéticos con expresión diferencial en respuesta a Cr(VI). En rojo se indican las vías de respuesta generales para contender con los efectos tóxicos del Cr(VI) (véase la Figura 1). En azul se indican algunos de los genes inducidos y en verde los reprimidos.

VIII.8 Resistencia a otros metales.

Diversos ambientes contaminados con cromo, así como, las aguas industriales residuales usualmente se encuentran contaminados con otros metales además del cromo, por ello fue de gran interés el estudio de la resistencia a otros metales de por la cepa AqSCr. Las concentraciones mínimas inhibitorias para *K. pneumoniae* AqSCr de Cr^{6+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Al^{3+} , Ni^{2+} , Se^{6+} , As^{5+} , As^{3+} , Cd^{2+} y Pd^{2+} en medio LB-agar se muestran en la Tabla 8. La CMI de Cr(VI) en medio sólido fue $>6\text{mM}$ y $<7\text{mM}$, tres veces mayor que la resistencia en medio LB líquido. La resistencia a As^{5+} fue mucho mayor a la de As^{3+} . El metal resistido en mayor concentración por *K. pneumoniae* AqSCr fue selenio (Se^{6+}) ($>800\text{mM}$), además se encontró que es capaz de reducir

este metal, dando como resultando en el crecimiento de colonias rojas (Figura 27) debido a la acumulación de cristales de Se⁰ amorfo (Rathgeber et al., 2002). Por otra parte, Ag⁺ resultó inhibitoria para *K. pneumoniae* AqSCr a sólo 0.6mM. Adicionalmente se encontró que *K. pneumoniae* AqSCr es capaz de crecer en medio LB líquido con 5mM de acetato de uranilo U(VI) pero no a 10mM. En la Figura 28 se observan micrografías de *K. pneumoniae* AqSCr crecida en medio LB líquido con 1mM de acetato de uranilo. En ellas se puede observar la presencia de nanopartículas con alta densidad electrónica localizadas dentro de la célula, principalmente en la periferia, de manera similar a lo observado en las células crecidas en presencia de Cr(VI), pero a diferencia de ellas, las células tratadas con uranio muestran una alta densidad electrónica en la envoltura celular, indicando una acumulación del metal en esa región. Estos cortes también serán sometidos a análisis de XANES para determinar su composición elemental.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria para <i>K. pneumoniae</i> AqSCr de diferentes metales.	
Metal	MIC
Co ²⁺	>4mM, <5mM
Zn ²⁺	>7mM, <8mM
Cu ²⁺	>8mM, <9mM
Ag ⁺	>.5mM,<.6mM
Cr ⁶⁺	>6mM, <7mM
Al ³⁺	>7mM, <8mM
Ni ²⁺	>8mM, <9mM
Se ⁶⁺	>800mM
As ⁶⁺	>500mM, <600mM
As ³⁺	>10mM, <11mM
Cd ²⁺	>3mM, <4mM
Pd ²⁺	>2mM, <3mM
U ⁶⁺	>5mM, <10mM



Figura 27. Crecimiento de *K. pneumoniae* AqScR en presencia de selenato. Las placas corresponden a medios LB suplementados con 0, 100 y LB 200mM de Na_2SeO_4 .

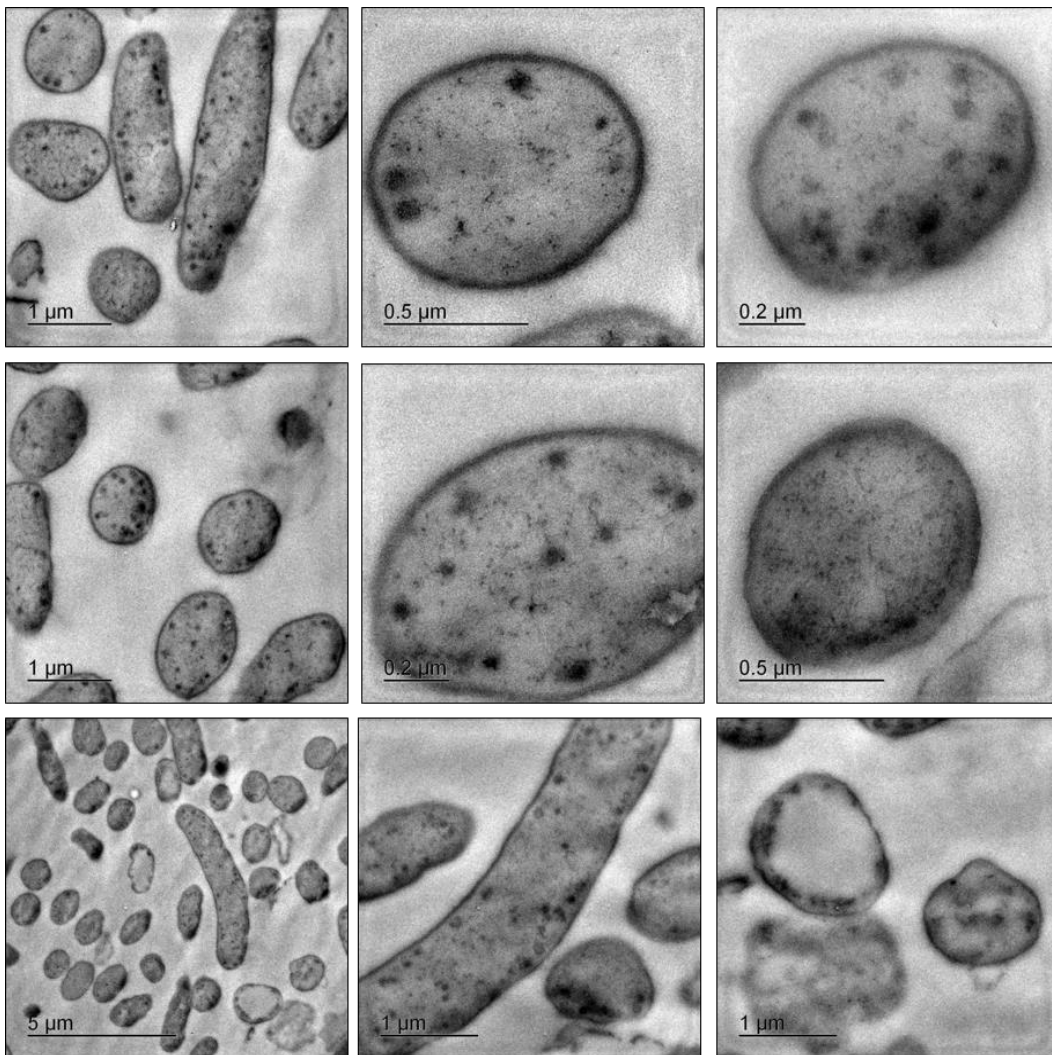


Figura 28. Micrografías de transmisión electrónica de células de *K. pneumoniae* AqScR cultivadas aeróbicamente en medio LB pH 7 con 1mM de U(VI) a las 24 horas de incubación. Cortes sin tinción con acetato de uranilo.

VIII.9 Elementos de resistencia a arsénico en *K. pneumoniae* AqSCr: análisis de mutantes.

El arsénico es el 53° elemento más abundante en la corteza terrestre y se encuentra en el ambiente como arsenato As(V) y arsenito As(III). Este último ($\text{As}(\text{OH})_3$) es considerado el estado más tóxico debido a su alta solubilidad y tendencia a reaccionar con los grupos tilo conduciendo a la inactivación de varias enzimas y receptores (Rosen, 2002). Los microorganismos tienen gran influencia sobre el ciclo biogeoquímico del arsénico, bajo condiciones anaeróbicas el arsenato puede ser utilizado por diversos microorganismos como aceptor final de electrones mediante enzimas unidas a membrana para la generación de energía (respiración de arsenato) (Lovley y Coates, 1997; Malasarn et al., 2008). Por otra parte, el arsenito puede ser utilizado como donador de electrones por microorganismos quimilitótrofos mediante enzimas unidas a membrana externa (Silver y Phung, 2005). De manera independiente a estos procesos, los microorganismos han evolucionado mecanismos de resistencia al arsénico, estos incluyen reducción-eflujo, oxidación extracelular de arsenito a arsenato (menos tóxico y menos soluble) y metilación-precipitación (Silver y Phung, 2005; Zhang et al., 2015). El mecanismo más estudiado es el de reducción-eflujo conferido por el sistema *ars*, que comúnmente se encuentra como operón. La forma canónica del operón *ars* incluye los genes que codifican para tres elementos principales; un regulador transcripcional ArsR de respuesta a As(III) and As(VI); una arsenato reductasa citoplasmática ArsC (diferente a las involucradas en respiración), que reduce arsenato a arsenito en el interior de la célula; y una bomba de antiporte de $\text{As}(\text{OH})_3/\text{H}^+$ ArsB, que bombea arsenito al exterior de la célula confiriendo por lo tanto resistencia tanto a arsenato, como a arsenito (Silver y Phung, 2005). Los sistemas *ars* pueden incluir elementos adicionales y tener diferentes arreglos (Zhao et al., 2015).

Como se indica en la Tabla 6, *K. pneumoniae* AqSCr es capaz de resistir hasta 11mM de As(III) y hasta 600mM de As(V), debido a esto, surgió un gran interés en comprender sus mecanismos de resistencia a este metal. En el genoma de esta cepa fueron identificados 4 arreglos genéticos posiblemente involucrados en resistencia a arsenato y/o a arsenito, los cuales fueron denominados *ars1*, *ars2*, *ars3* y *ars4*. A continuación se describen algunas de sus características.

La región *ars1* se encuentra en el fragmento ensamblado #5 (205551 pb) que corresponde a DNA plasmídico y no se encuentra en la *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (utilizada como referencia para el ensamble). La secuencia de *ars1* ha sido encontrada únicamente en un organismo del genero

Klebsiella, dentro del plásmido pKOX_R1 (353865 pb) de *K. michiganensis* E718 con un 100% de cobertura y un 99% de identidad, pero también fue encontrado en plásmidos de otros géneros bacterianos.

La secuencia *ars2* se encontró en el fragmento ensamblado #14 (30202 pb) que también corresponde a DNA plasmídico y tampoco se encuentra en la cepa *K. pneumoniae* NTUH-K2044.

La secuencia más cercana corresponde a *Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis LMG 23823 con un 92% de cobertura y 92% de identidad, también se encontró en el plásmido pCAV1374-150 (150318pb) de *Klebsiella oxytoca* CAV1374 con un 92% de cobertura y un 91% de identidad.

Las secuencias *ars3* y *ars4* se encuentran en posiciones alejadas entre ellas dentro del fragmento ensamblado #1 (3750327 pb) que corresponde a DNA cromosomal y sus homólogas fueron encontradas en *K. pneumoniae* NTUH-K2044, ambas con un 100% de cobertura y un 99% de identidad, estas regiones se encuentra muy conservadas dentro de la especie *K. pneumoniae*. En la Figura 29 se esquematizan los arreglos genéticos descritos y se indica en el recuadro rojo las regiones eliminadas mediante doble recombinación homóloga, para estudiar su función.

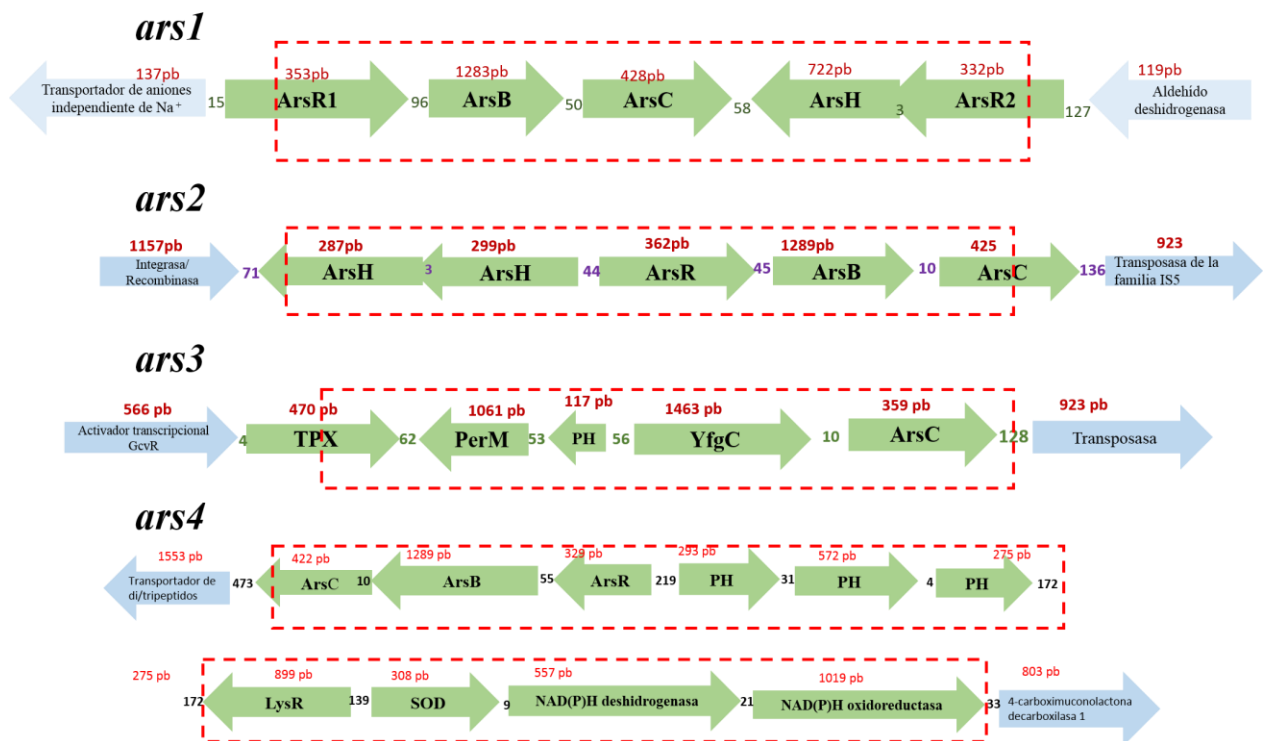


Figura 29. Arreglos genéticos *ars* posiblemente involucrados en resistencia a arsénico. En verde se indican los elementos con posible participación en la resistencia a arsénico, el recuadro rojo indica la zona

eliminada en las mutantes. Se indican los productos proteicos de cada ORF: ArsR regulador transcripcional, ArsB bomba de eflujo de arsenito, ArsC arsenato reductasa, ArsH oxidoreductasa asociada a resistencia a arsénico, TPX tiol peroxidasa (sistema de defensa contra estrés oxidativo), YfgC metaloproteasa, LysR regulador transcripcional, SOD superóxido dismutasa, oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H, PH proteínas hipotéticas. Los genes representados en verde del arreglo *ars1* corresponden a los ORF: BHE81_27780 al BHE81_27800, los del arreglo *ars2* corresponde a los ORF: BHE81_27875 al BHE81_27890, los del arreglo *ars3* corresponden a los ORF: BHE81_12005 al BHE81_12025 y los del arreglo *ars4* corresponden a los ORF: BHE81_14520 al BHE81_14575, los cuales fueron asignados al depositar el genoma de la cepa AqSCr en el GenBank.

Como se describió, las mutantes en los cuatro *loci ars* fueron generadas para determinar su efecto sobre la habilidad de reducir Cr(VI) de *K. pneumoniae* AqSCr, sin embargo, dichas mutaciones no tuvieron efecto. Con el objetivo de estudiar el papel de estos elementos en la resistencia a arsénico, el crecimiento de las mutantes fue comparado con el de la cepa silvestre en medio LB-agar con diferentes concentraciones de arsenato y arsenito. Debido a la homología química entre el ion cromato y el ion arsenato, se decidió también probar la mutante en la bomba de eflujo ChrA (la cual no presentó disminución sobre la resistencia a Cr(VI)).

Como se observa en la Figura 30, tanto a 100mM como a 20mM de As(V), el crecimiento de la mutante *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻ fue menor que el de la cepa tipo silvestre, mientras que en las mutantes *K. pneumoniae* AqSCr *ars2*⁻, *K. pneumoniae* AqSCr *ars3*⁻ y *K. pneumoniae* AqSCr *ars4*⁻, no se observó una disminución importante en el crecimiento. La doble mutante *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻, *ars2*⁻ presentó mayor sensibilidad que la mutante *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻ siendo incapaz de crecer a 20mM de arsenato. Las otras dos mutantes en múltiples loci presentaron el mismo efecto. Esto indica que la resistencia a altas concentraciones de arsenato (400mM) está determinada principalmente por *ars1*, mientras que *ars2*, *ars3* y *ars3* podría tener una participación menor.

Con respecto a arsenito, se encontró también que la eliminación de *ars1* disminuye gravemente la resistencia a este metal. Contrario a lo esperado, la eliminación de *ars2*, *ars3*, *ars3* y *chrA* de manera individual, les confirió a las mutantes mayor resistencia a arsenito con respecto a la cepa tipo silvestre y el mismo efecto fue observado en las diferentes concentraciones ensayadas. Por su parte, las mutantes múltiples *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻, *ars2*⁻, *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻ *ars2*⁻ *ars3*⁻ y *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻ *ars2*⁻ *ars3*⁻ *ars3*⁻, presentaron el mismo comportamiento que la mutante *K. pneumoniae* AqSCr *ars1*⁻. Esto indica que el grado de resistencia conferida por

la eliminación de *ars2* (o los otros arreglos *ars*) no contrarresta la pérdida de la resistencia provocada por la eliminación de *ars1*, esto puede ser resultado de la red de regulación o cooperación entre los cuatro agrupamientos *ars*.

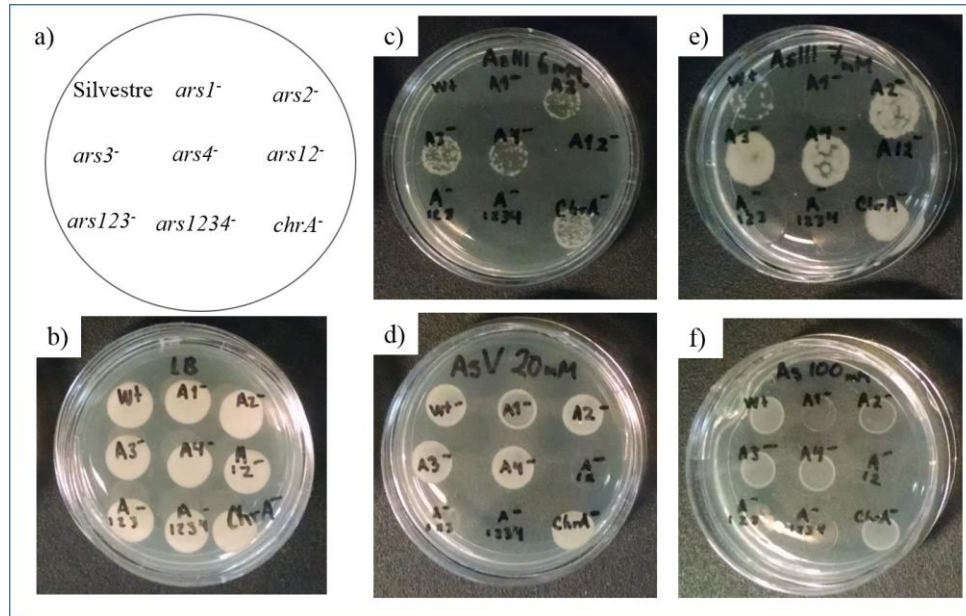


Figura 30. Crecimiento de la cepa tipo silvestre y las mutantes sencillas y múltiples en los agrupamientos genéticos *ars*, así como de la mutante *chrA*, en presencia de 0mM de As (b), 6mM y 7mM de As(III) (c y e respectivamente) y 20mM y 100 nm de As(V) (d y f respectivamente). La distribución de las cepas en todas las placas se indica en el esquema de la parte superior izquierda (a). Todos los cultivos corresponden a 24 horas de incubación a 30°C, excepto el de 7mM de As(III) que corresponde a 48 hrs de incubación.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que el arreglo *ars1* es el de mayor importancia tanto para la resistencia a As(V) como a As(III), sin embargo, *ars2*, *ars3*, *ars4* también parecen tener un papel en el mecanismo de resistencia, si bien al momento su función no es clara. Ya que *ars3* y *ars4* se localizan en el cromosoma, es posible que representaran el mecanismo de resistencia original, esto se ve apoyado por el hecho de que *ars1* y *ars2*, además de estar contenidos en plásmidos, no se encuentran reportados en ninguna otra cepa de *K. pneumoniae*. *ars3* y *ars4* podrían haber conferido una menor resistencia a arsénico o podrían haber sufrido modificaciones como resultado de la redundancia genética, ya que recientemente ha sido propuesto que los procesos de pseudogenesis pueden estar impulsados por la adquisición horizontal de genes (Shapiro et al., 2016).

El agrupamiento de genes *ars1* incluye 5 genes, *arsR1*, *arsB*, *arsC*, *arsH* y *arsR2*, por el arreglo es posible que ArsR1 regule la expresión de *arsB* y *arsC* mientras que ArsR2 regule *arsH* lo que

sería muy interesante de determinar, así como, saber si los 5 elementos son requeridos para el alto grado de resistencia conferido por *arsI*, tanto para arsenito como para arsenato.

IX. CONCLUSIONES.

- 1) *K. pneumoniae* AqSCr posee varias características que le confieren un gran potencial biotecnológico, principalmente su capacidad de reducir Cr(VI), tanto de manera directa como de manera indirecta, mediante la reducción de Fe(III) a Fe(II). Por otra parte, presenta un alto grado de resistencia a varios metales incluyendo Cr(VI), U(VI), Se(VI) y As(V).
- 2) El gen *chrA* presente en el genoma *K. pneumoniae* AqSCr no tiene una contribución a la resistencia a Cr(VI), al menos bajo las condiciones de cultivo estudiadas.
- 3) *K. pneumoniae* AqSCr posee genes que codifican para enzimas homólogas a reductasas de Cr(VI), sin embargo, la eliminación de dichos genes no tuvo efecto negativo sobre su capacidad de reducir Cr(VI) bajo las condiciones ensayadas.
- 4) La respuesta transcripcional a cromo indica la participación de varias vías para contender con los efectos tóxicos del cromo y permitir la replicación bajo concentraciones subletales. Dichas vías incluyen elementos de reparación de ADN, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a estrés osmótico, tres vías de adquisición de hierro, dos vías de adquisición de sulfato y síntesis de centros hierro azufre. Por otra parte, en presencia de Cr(VI), se encontró la sobreexpresión de elementos específicos de cadena de transporte de electrones, incluyendo un citocromo soluble (b562) y un citocromo de membrana (b561), los cuales podrían estar involucrados en reducción de Cr(VI).

X. PERSPECTIVAS.

Dado el alto potencial biotecnológico de la cepa *K. pneumoniae* AqSCr la perspectiva más evidente es continuar con su estudio, tanto para profundizar en los mecanismos de reducción de metales, como para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Los cuatro enfoques principales de estos estudios deberían ser:

- A) Eliminación de genes identificados en el análisis del transcriptoma potencialmente importantes en la resistencia y reducción de Cr(VI) en *K. pneumoniae* AqSCr.**

Se pretende generar mutantes de genes que mostraron expresión diferencial en presencia de Cr(VI), en particular aquellos que podrían no ser necesarios en ausencia de Cr(VI), por ejemplo, la enzima citrato sintasa codificada por el gen *kp2076*, así como los citocromos b562 y b561, ya que podría estar involucrados en reducción de Cr(VI). Otro gen candidato para la mutación es la Mn-superóxido dismutasa para determinar su efecto sobre la resistencia a Cr(VI).

B) Estudio *in vitro* de las posibles reductasas de Cr(VI) identificadas en *K. pneumoniae* AqSCr.

En este caso sería interesante expresar heterónomamente la flavin-oxidoreductasa de la familia OYE codificada por el gen *kp2515*, ya que la mutante en este gen fue la que tuvo menor actividad en extractos celulares con relación a las otras mutantes sencillas, así como la oxidoreductasa codificada por el gen *kp396*, ya que esta posee 84.57% de identidad con la reductasa de Cr(VI) YieF de *E. coli*, la cual es la única enzima reportada hasta ahora que es capaz de reducir el Cr(VI) a Cr(III) sin intermediarios de Cr(V) o Cr(IV) *in vitro*.

C) Determinar si *K. pneumoniae* AqSCr es capaz de reducir uranio.

Los análisis con microscopía de transmisión electrónica de *K. pneumoniae* AqSCr muestran la presencia de nanopartículas localizadas intracelularmente, potencialmente compuestas de U(IV). De tal manera, por una parte, se pretende realizar el análisis de composición elemental de las nanopartículas, así como, ensayos de cinética de reducción de U(VI) en medio de cultivo citrato de sodio.

D) Profundizar el estudio de resistencia a arsénico en *K. pneumoniae* AqSCr.

Mediante la generación de una mutante múltiple en *ars2*, *ars3* y *ars3* se podría determinar el grado de resistencia que puede conferir *ars1*, así como estudiar la contribución a la resistencia de cada uno de los genes que lo componen. En este sentido, sería interesante obtener y estudiar mutantes dobles *ars1⁻*, *ars3⁻* y *ars1⁻*, *ars4⁻*, para compararlas con la mutante *en ars1⁻*, *ars2⁻* y determinar si *ars1* y *ars2* confieren la totalidad de la resistencia o si puede ser una combinación entre *ars1* y cualquiera de los otros dos arreglos genéticos *ars*.

XI. REFERENCIAS.

1. Ackerley DF, Gonzalez CF, Park CH, Blake R 2nd, Keyhan M and Martin A, 2004. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 70(2):873-82.
2. Aguirre JD, Clark HM, McIlvin M, Vazquez C, Palmere SL, Grab DJ, Seshu J, Hart PJ, Saito M and Culotta VC, 2013. A manganese-rich environment supports superoxide dismutase activity in a Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem.* 288(12):8468-78.
3. Aguilar-Barajas E, Díaz-Pérez C, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H and Cervantes C, 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals.* 24(4):687-707. doi: 10.1007/s10534-011-9421-x. Epub 2011 Feb 8.
4. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater. Standard Methods: 541.
5. Amoozegar MA, Ghasemi A, Razavi MR and Naddaf S, 2007. Evaluation of hexavalent chromium reduction by chromate-resistant moderately halophile, *Nesterenkonia* sp. strain MF2. *Process Biochem.* 42(10):1475-79.
6. Anders S and Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11(10):R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106. Epub 2010 Oct 27.
7. Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I, Resch CT, Long PE, Dayvault R, Karp K, Marutzky S, Metzler DR, Peacock A, White DC, Lowe M and Lovley DR, 2003. Stimulating the *in situ* activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* 69(10):5884–91
8. Anjem A, Varghese S, Imlay JA, 2009. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 72(4):844-58. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06699.x. Epub 2009 Apr 21.
9. Armienta MA and Rodríguez-Castillo R, 1995. Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environ Health Perspect* 103(Suppl 1):47–51
10. Assfalg M, Bertini I, Bruschi M, Michel C and Turano P, 2002. The metal reductase activity of some multiheme cytochromes *c*: NMR structural characterization of the reduction of chromium (VI) to chromium (III) by cytochrome *c*₇. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99(15):9750-9754. doi:10.1073/pnas.152290999.

11. Ayala-Castro C, Saini A and Outten FW, 2008. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*72(1):110-25.
12. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A and Zagnitko O, 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics.*
13. Bae WC, Lee HK, Choe YC, Jahng DJ, Lee SH, Kim SJ, Lee JH and Jeong BC, 2005. Purification and characterization of NADPH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiol.* 43(1):21-7.
14. Baldi F, Minacci A, Pepi M and Scozzafava A, 2001. Gel Sequestration of heavy metals by *Klebsiella oxytoca* isolated from iron mat. *FEMS Microbiol Ecol.* 36(2-3):169-74.
15. Battaglia-Brunet F, Foucher S, Denamur A, Ignatiadis I, Michel C and Morin D, 2002. Reduction of chromate by fixed films of sulfate-reducing bacteria using hydrogen as an electron source. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28(3):154-9.
16. Bencheikh-Latmani R, Williams SM, Haucke L, Criddle CS, Wu L, Zhou J and Tebo BM, 2005. Global transcriptional profiling of *Shewanella oneidensis* MR-1 during Cr(VI) and U(VI) reduction. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):7453-60.
17. Berg BL, Li J, Heider J and Stewart V, 1991. Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J Biol Chem* 266:22380-5.
18. Bhowmick DC, Bal B, Chatterjee NS, Ghosh AN and Pal S, 2009. A low-GC Gram-positive *Thermoanaerobacter*-like bacterium isolated from an Indian hot spring contains Cr(VI) reduction activity both in the membrane and cytoplasm. 106(6):2006-16.
19. Bopp LH and Ehrlich HL, 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch Microbiol.* 1988;150(5):426-31. doi:10.1007/BF00422281.
20. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
21. Branco R, Chung AP, Johnston T, Gurel V, Morais P and Zhitkovich A, 2008. The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element *TnOtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *J Bacteriol.* 190(21):6996-7003.

22. Branco R and Morais PV, 2016. Two superoxide dismutases from *TnOtchr* are involved in detoxification of reactive oxygen species induced by chromate. *BMC Microbiol.* 5;16:27. doi: 10.1186/s12866-016-0648-0.
23. Brisse S and Verhoef J, 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 3):915-24.
24. Brose DA and James BR, 2010. Oxidation-reduction transformations of chromium in aerobic soils and the role of electron-shuttling quinones. *Environ Sci Technol.* 44(24):9438-44. doi:10.1021/es101859b.
25. Brown SD, Thompson MR, Verberkmoes NC, Chourey K, Shah M, Zhou J, Hettich RL and Thompson DK, 2006. Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Mol Cell Proteomics.* 5(6):1054-71.
26. Burns VM, and Burns RG, 1975. Mineralogy of chromium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39, 903-10.
27. Caballero-Flores GG, Acosta-Navarrete YM, Ramírez-Díaz MI, Silva-Sánchez J and Cervantes C, 2012. Chromate-resistance genes in plasmids from antibiotic-resistant nosocomial enterobacterial isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 327(2):148-54.
28. Camargo FA, Bento FM, Okeke BC and Frankenberger WT, 2003. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. *J Environ Qual.* 32(4):1228-33.
29. Casadevall M, da Cruz Fresco P, Kortenkamp A, 1999. Chromium (VI)-mediated DNA damage: oxidative pathways resulting in the formation of DNA breaks and abasic sites. *Chem Biol Interact.* 123(2):117-32.
30. Chardin B, Giudici-Ortoni MT, De Luca G, Guigliarelli B and Bruschi M, 2003. Hydrogenases in sulfate-reducing bacteria function as chromium reductase. *Appl Microbiol and Biotechnol.* 63;3; 315–21.
31. Cherepanov PP and Wackernagel W, 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene.* 26;158(1):9-14.

32. Cheung KH and Gu JD, 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int Biodeter Biodegrad* 59:8–15.
33. Chourey K, Thompson MR, Morrell-Falvey J, Verberkmoes NC, Brown SD, Shah M, Zhou J, Doktycz M, Hettich RL and Thompson DK, 2006. Global molecular and morphological effects of 24-hour chromium(VI) exposure on *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol.* 72(9):6331-44.
34. Chourey K, Wei W, Wan XF and Thompson DK, 2008. Transcriptome analysis reveals response regulator SO2426-mediated gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 under chromate challenge. *BMC Genomics.* 21;9:395.
35. Coppi MV, Leang C, Sandler SJ and Lovley DR, 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):3180-7. doi:10.1128/AEM.67.7.3180.
36. Datsenko KA and Wanner BL, 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;97(12):6640-5.
37. Davies JP, Yildiz FH and Grossman AR, 1999. Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell.* 11(6):1179-90.
38. Eckhardt T, 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1(4):584-8.
39. El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, El Gharmali A and Imzilen B, 2015. Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Scientific World Journal.* doi:10.1155/2015/761834.
40. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J and Pfaffl MW, 2006. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 28(19):1601-13.
41. Fuller SJ, Burke IT, McMillan DG, Ding W and Stewart DI, 2015. Population changes in a community of alkaliphilic iron-reducing bacteria due to changes in the electron acceptor: implications for bioremediation at alkaline Cr(VI)-contaminated sites. *Water, Air, Soil Pollut.* doi:10.1007/s11270-015-2437-z.

42. Garavaglia L, Cerdeira SB and Vullo DL, 2010. Chromium (VI) biotransformation by β - and γ -proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *J Hazard Mater.* 175:104-10.
43. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH and Zhang J, 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80.
44. Goodgame, DM and Joy AM, 1986. Relatively long-lived chromium (V) species are produced by the action of glutathione on carcinogenic chromium (VI). *J Inorg Biochem.* 26: 219–24.
45. Guha H, Jayachandran K and Maurrasse F, 2001. Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions. *Environ Pollut.* 115(2):209-18.
46. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T and Chater KF, 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18;100(4):1541-6. Epub 2003 Jan 31.
47. Henne KL, Turse JE, Nicora CD, Lipton MS, Tollaksen SL, Lindberg C, Babnigg G, Giometti CS, Nakatsu CH, Thompson DK and Konopka AE, 2009. Global proteomic analysis of the chromate response in *Arthrobacter* sp. strain FB24. *J Proteome Res.* 8(4):1704-16.
48. Hopkin KA, Papazian MA and Steinman HM, 1992. Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* 267(34):24253-8.
49. Hu P, Brodie EL, Suzuki Y, McAdams HH and Andersen GL, 2005. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 187(24):8437-49.
50. Jin H, Zhang Y, Buchko GW, Varnum SM, Robinson H, Squier TC and Long PE, 2012. Structure determination and functional analysis of a chromate reductase from *Gluconacetobacter hansenii*. *PLoS One.* 7(8):e42432.
51. Jin YH, Dunlap PE, McBride SJ, Al-Refai H, Bushel PR and Freedman JH, 2008. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.* 4(4):e1000053.

52. Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G and Yang G, 1991. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium(V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 286(2):652-5.
53. Kavita B and Keharia H, 2012. Reduction of hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* BCR400 isolated from a chromium-contaminated soil. *3 Biotech.* 2(1):79–87. doi: 10.1007/s13205-011-0038-0
54. Kiliç NK, Stensballe A, Otzen DE and Dönmez G, 2010. Proteomic changes in response to chromium(VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour Technol.* 101(7):2134-40.
55. Kimura MA, 1980. simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 1980;16:111-20.
56. Kortenkamp A, Casadevall M, Faux SP, Jenner A, Shayer RO, Woodbridge N and O'Brien P, 1996. A role for molecular oxygen in the formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium (VI) by glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 329(2):199-207.
57. Kwak YH, Lee DS and Kim HB, 2003. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol.* 69(8):4390-5.
58. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds) 115–75. Academic Press, Chichester, UK.
59. Lara P, Morett E, Juárez K, 2016. Acetate biostimulation as an effective treatment for cleaning up alkaline soil highly contaminated with Cr(VI). *Environ Sci Pollut Res Int.*
60. Li XM, Zhou SG, Li FB, Wu CY, Zhuang L, Xu W, Liu L, 2009. Fe(III) oxide reduction and carbon tetrachloride dechlorination by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* strain L17. *J Appl Microbiol.* 106(1):130-9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03985.x. Epub 2008 Nov 29.
61. Lin Z, Zhu Y, Kalabegishvili TL, Tsibakhashvili NY, Holman HY, 2006. Effect of chromate action on morphology of basalt-inhabiting bacteria. *Materials Science and Engineering: C.* 26(4): 610-12.
62. Lovley DR, 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol* 47:263–90.
63. Lovley DR and Phillips EJ, 1989. Requirement for amicrobial consortium to completely oxidize glucose in Fe(III)-reducing sediments. *Appl Environ Microbiol* 55(12):3234–6.

64. Lovley DR and Phillips EJ, 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol* 51(4):683–9.
65. Lovley DR and Coates JD, 1997. Bioremediation of metal contamination. *Current Opin. Biotechnol.* 8: 285-9.
66. Mabrouk ME, Arayes MA and Sabry SA, 2014. Hexavalent chromium reduction by chromate-resistant haloalkaliphilic *Halomonas* sp. M-Cr newly isolated from tannery effluent. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 28(4):659-67.
67. Mabrouk MEM, 2008. Statistical optimization of medium components for chromate reduction by halophilic *Streptomyces* sp. MS-2. *Afr J Microbiol Res.* (2):103-9.
68. Malasarn D, Keefe JR and Newman DK, 2008. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J Bacteriol.* 190(1):135-42. Epub 2007 Oct 19.
69. Martin JE, Waters LS, Storz G and Imlay JA, 2015. The *Escherichia coli* small protein MntS and exporter MntP optimize the intracellular concentration of manganese. *PLoS Genet.* 16;11(3):e1004977. doi: 10.1371/journal.pgen.1004977. eCollection 2015.
70. Mary Mangaiyarkarasi MS, Vincent S, Janarthanan S, Subba Rao T and Tata BV, 2011. Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi J Biol Sci.* 18(2):157-67.
71. Marzluf GA, 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(3):716-21.
72. Mazoch J, Tesářík R, Sedláček V, Kucera I and Turánek J, 2004. Isolation and biochemical characterization of two soluble iron(III) reductases from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.* 271(3):553-62.
73. Mollet C, Drancourt M and Raoult D, 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol.* 26(5):1005-11.
74. Monsieurs P, Moors H, Van Houdt R, Janssen PJ, Janssen A, Coninx I, Mergeay M and Leys N, 2011. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals.* 24(6):1133-51.
75. Morokutti A, Lyskowski A, Sollner S, Pointner E, Fitzpatrick TB, Kratky C, Gruber K and Macheroux P, 2005. Structure and function of YcnD from *Bacillus subtilis*, a flavin-containing oxidoreductase. *Biochemistry.* 44(42):13724-33.

76. Narayani M and Shetty KV, 2013. Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. 43(9):955-1009. doi:10.1080/10643389.2011.627022.
77. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelsky A, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, McLean J, Lasken R, Clingenpeel SR, Woyke T, Tesler G, Alekseyev MA and Pevzner PA, 2013. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: Deng M., Jiang R., Sun F., Zhang X. (eds) Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science, vol 7821. Springer, Berlin, Heidelberg.
78. O'Connell KP and Thomashow MF, 2000. Transcriptional organization and regulation of a polycistronic cold shock operon in *Sinorhizobium meliloti* RM1021 encoding homologs of the *Escherichia coli* major cold shock gene *cspA* and ribosomal protein gene *rpsU*. Appl Environ Microbiol. 66, 392–400. doi: 10.1128/AEM.66.1.392-400.2000.
79. Ohtake H, Fuji E and Toda K, 1990. A survey of effective electron donors for reduction of toxic hexavalent chromium by *Enterobacter cloacae* (strain HO1). J Gen Appl Microbiol. 36(3):203-8.
80. Opperman DJ, Piater LA and van Heerden E, 2008. A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. J Bacteriol. 190(8):3076-82.
81. Opperman DJ and van Heerden E, 2008. A membrane-associated protein with Cr(VI)-reducing activity from *Thermus scotoductus* SA-01. FEMS Microbiol Lett. 280(2):210-8.
82. Ozdemir G, Ozturk T, Ceyhan N, Isler R and Cosar T, 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. Bioresour Technol. 2003 Oct;90(1):71-4.
83. Palma M, DeLuca D, Worgall S and Quadri LEN, 2004. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. J of Bacteriol. 186(1):248-51.
84. Pal A, Dutta S and Paul AK, 2005. Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil. Curr Microbiol. 51(5):327-30.
85. Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S and Matin A, 2000. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. Appl Environ Microbiol. 66(5):1788-95.

86. Prentki P and Krisch HM, 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*. 29(3):303-13.
87. Pereira Y, Lagniel G, Godat E, Baudouin-Cornu P, Junot C and Labarre J, 2008. Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicol Sci*. 2008;106(2):400-12. doi:10.1093/toxsci/kfn193.
88. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [<http://www.R-project.org>].
89. Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Beatty JT and Yurkov V, 2002. Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol*. 68(9):4613-22.
90. Roberts KR and Marzluf GA, 1971. The specific interaction of chromate with the dual sulfate permease systems of *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys*. 142(2):651-9.
91. Robertson G, Schein J, Chiu R, Corbett R, Field M, Jackman SD, Mungall K, Lee S, Okada HM, Qian JQ, Griffith M, Raymond A, Thiessen N, Cezard T, Butterfield YS, Newsome R, Chan SK, She R, Varhol R, Kamoh B, Prabhu AL, Tam A, Zhao Y, Moore RA, Hirst M, Marra MA, Jones SJ, Hoodless PA and Birol I, 2010. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. *Nat Methods*. 7(11):909-12. doi: 10.1038/nmeth.1517. Epub 2010 Oct 10.
92. Robins KJ, Hooks DO, Rehm BH and Ackerley DF, 2013. *Escherichia coli* NemaA is an efficient chromate reductase that can be biologically immobilized to provide a cell free system for remediation of hexavalent chromium. *PLoS One*. 8(3):e59200.
93. Rosen BP, 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett*. 529(1):86-92.
94. Rhodius VA, Suh WC, Nonaka G, West J and Gross CA, 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol*. 4(1):e2.
95. Santos-Escobar F, Gutiérrez-Corona JF and Pedraza-Reyes M, 2014. Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system in counteracting hexavalent chromium-promoted oxidative DNA damage. *Appl Environ Microbiol*. 80(17):5493-502.
96. Sass BM and Rai D, 1987. Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid solutions. *Inorg Chem*. 26(6):2228-32. doi:10.1021/ic00261a013.
97. Sau GB, Chatterjee S and Mukherjee SK, 2010. Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Pol J Microbiol*. 59(3):185-90.
98. Shapiro LR, Scully ED, Straub TJ, Park J, Stephenson AG, Beattie GA, Gleason ML, Kolter R, Coelho MC, De Moraes CM, Mescher MC and Zhaxybayeva O, 2016. Horizontal Gene

- Acquisitions, Mobile Element Proliferation, and Genome Decay in the Host-Restricted Plant Pathogen *Erwinia Tracheiphila*. *Genome Biol Evol.* 2016 Mar 18;8(3):649-64. doi: 10.1093/gbe/evw016
99. Shen H and Wang YT, 1993 Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl Environ Microbiol.* 59(11):3771-7.
100. Shi XG and Dalal NS, 1990. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch Biochem Biophys.* 277(2):342-350.
101. Shi XL, Dalal NS and Vallyathan V, 1991. One-electron reduction of carcinogen chromate by microsomes, mitochondria, and *Escherichia coli*: identification of Cr(V) and ·OH radical. *Arch Biochem Biophys.* 290(2):381-6.
102. Silver S and Phung LT, 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol.* 71(2):599-608.
103. Slade PG, Hailer MK, Martin BD and Sugden KD, 2005. Guanine-specific oxidation of double-stranded DNA by Cr(VI) and ascorbic acid forms spiroiminodihydroantoin and 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol.* 18(7):1140-9.
104. 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(16):5340-5.
105. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30: 2725-9.
106. Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A and Conesa A, 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 21(12):2213-23. doi: 10.1101/gr.124321.111. Epub 2011 Sep 8.
107. Tebo BM and Obraztsova AY, 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters.* 162(1):193-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12998.x.
108. Thompson DK, Chourey K, Wickham GS, Thieman SB, VerBerkmoes NC, Zhang B, McCarthy AT, Rudisill MA, Shah M and Hettich RL, 2010. Proteomics reveals a core molecular response of *Pseudomonas putida* F1 to acute chromate challenge. *BMC genomics.* 11:311.

109. Thompson MR, VerBerkmoes NC, Chourey K, Shah M, Thompson DK and Hettich RL, 2007. Dosage-dependent proteome response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to acute chromate challenge. *J Proteome Res.* 6(5):1745-57.
110. Verma T, Garg SK and Ramteke PW, 2009. Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *J Appl Microbiol.* 107(5):1425-32.
111. Viamajala S, Peyton BM, Apel WA and Petersen JN, 2002. Chromate/nitrite interactions in *Shewanella oneidensis* MR-1: evidence for multiple hexavalent chromium [Cr(VI)] reduction mechanisms dependent on physiological growth conditions. *Biotechnol Bioeng.* 30;78(7):770-8.
112. Villalobos-Aragon A, Ellis AS, Armienta MA, Morton-Bermea O and Johnson TM, 2012. Geochemistry and Cr stable isotopes of Cr contaminated groundwater in Leon valley, Guanajuato, Mexico. *Appl Geochem.* 27(9):1783–94. doi : 10.1016/j.apgeochem.2012.02.013.
113. Viollier E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN and Cappellen P Van, 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Appl Geochem.* 15(6):785-90.
114. Viti C, Marchi E, Decorosi F and Giovannetti L, 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 38(4):633-59.
115. Wang CC and Newton A, 1969. Iron transport in *Escherichia coli*: relationship between chromium sensitivity and high iron requirement in mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 98(3):1135-41.
116. Wang PC, Toda K, Ohtake H, Kusaka I and Yabe I, 1991. Membrane-bound respiratory system of *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown anaerobically with chromate. *FEMS Microbiol Lett.* 62(1):11-5.
117. Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 10(1):57-63. doi: 10.1038/nrg2484.
118. Wani PA and Omozele AB, 2015. Cr(VI) removal by indigenous *klebsiella* species PB6 isolated from contaminated soil under the influence of various factors. *Curr Res Bacteriol.* 8(3):62-9.

119. Wei D, Wang M, Shi J and Hao J, 2012. Red recombinase assisted gene replacement in *Klebsiella pneumoniae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39(8):1219-26. doi: 10.1007/s10295-012-1117-x. Epub 2012 Mar 20.
120. Whalen J, and Warman P, 1996. Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. *Biol Fert Soils.* 22, 373–8.
121. Xiao W, Yang X, He Z and Li T, 2014. Chromium-resistant bacteria promote the reduction of hexavalent chromium in soils. *J Environ Qual.* 2014;43(2):507-16. doi:10.2134/jeq2013.07.0267.
122. Xu L, Luo M, Jiang C, Wei X, Kong P, Liang X, Zhao J, Yang L and Liu H, 2012. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by cytoplasmic fractions of *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 under aerobic and anaerobic conditions. *Appl Biochem Biotechnol.* 166(4):933-41. doi: 10.1007/s12010-011-9481-y. Epub 2011 Dec 13.
123. Xue XM, Yan Y, Xu HJ, Wang N, Zhang X and Ye J, 2014. ArsH from *Synechocystis* sp. PCC 6803 reduces chromate and ferric iron. *FEMS Microbiol Lett.* 356(1):105-12.
124. Zeng L, Zhang L, Li W, Zhao S, Lei J and Zhou Z, 2010. Molybdenum carbide as anodic catalyst for microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae*. *Biosens Bioelectron.* 25(12):2696-700. doi: 10.1016/j.bios.2010.05.002.
125. Zhang J, Cao T, Tang Z, Shen Q, Rosen BP and Zhao FJ, 2015. Arsenic methylation and volatilization by arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase in *Pseudomonas alcaligenes* NBRC14159. *Appl Environ Microbiol.* 81(8):2852-60. doi: 10.1128/AEM.03804-14. Epub 2015 Feb 13.
126. Zhang L, Zhou S, Zhuang L, Li W, Zhang J, Lu and Deng L, 2008. Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochem Commun.* 10(10):1641–43.
127. Zhang X, Wu W, Virgo N, Zou L and Liu P, 2014. Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. *Ecotoxicology.* 2014, 23(8):1534-45. doi: 10.1007/s10646-014-1294-7. Epub 2014 Aug 3.
128. Zhao C, Zhang Y, Chan Z, Chen S and Yang S, 2015. Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *Front Microbiol.* 6:986. doi: 10.3389/fmicb.2015.00986. eCollection.

XII. APENDICES.

APENDICE 1

Oligonucleótidos utilizados para mutagenesis por recombinación homóloga	
Nombre	Secuencia 5'→3'
>396kpn1	tgcctgaaatcatcaacgaa
>396kpn2	gacatgattgctccttgg
>396kpn3	ccaaaggagcaatcatgtcagttaggctggagctgcttc
>396kpn4	atgctttaaccgccgaataattccggggatccgctgac
>396kpn5	attcggcgggttaaagcat
>396kpn6	tccttcacgggtacctcgtc
>2515kpn1	ataactacgccgccattcc
>2515kpn2	taagcgctccgctattcg
>2515kpn3	cgaatagcggagcgttaagtgtaggctggagctgcttc
>2515kpn4	ggctacctgctggcgaataattccggggatccgctgac
>2515kpn5	attcggcagcaggtagcc
>2515kpn6	agcagtaactcgggtgttt
>2917kpn1	cttgatactggcgcagtca
>2917kpn2	cacgcctctccggttgata
>2917kpn3	tatcaaccggagagcgtgaattccggggatccgctgac
>2917kpn4	gatagcggttctcatgcaccagtgtaggctggagctgcttc
>2917kpn5	ggtgcatgagaaccgctatc
>2917kpn6	ggatcaccgcataaagtgt
>4310kpn1	tgcgtaaaattcagcgtgac
>4310kpn2	gtcactctcgggaagaacg
>4310kpn3	cgttctccgcagagtgcacgtgtaggctggagctgcttc
>4310kpn4	cagcttccacttatagcgaacaattccggggatccgctgac
>4310kpn5	gtttcgctataagtggagctg
>4310kpn6	ttttccgattaccgtgagg
>266kpn1	ttccacgttaaaagggcatt
>266kpn2	aaacatctgatgggtggcaat
>266kpn3	attgccaccatcagatgttaattccggggatccgctgac
>266kpn4	cagagaaccgcgaccgtagttaggctggagctgcttc
>266kpn5	acggtcgcggttctctg
>266kpn6	agcgaccttcggtgatactg
>4253kpn1	cctgctggcctactatcagc
>4253kpn2	gcttccgacatagtgactcctg
>4253kpn5	acaccgattaccgactctgt
>4253kpn6	ttgtaaccgtccggatcttc
>4253kpn3	caggagtcaactatgtcggaaagcaattccggggatccgctgac
>4253kpn4	acagagtcgggtaatcgggtgagttaggctggagctgcttc

>Ars1kpn1	tggtgtttatcactccttcacg
>Ars1kpn2	cagcacggacgtaagttcac
>Ars1kpn3	gtgaacttacgtccgtgctgagtgtaggctggagctgcttc
>Ars1kpn4	atggatttaaactgctgcaaaattccggggatccgtcgac
>Ars1kpn5	ttgcagcagtgtttaaaccat
>Ars1kpn6	gcgtttcttaaacaccggtta
>Ars2kpn1	ataaggagcgcctggcttac
>Ars2kpn2	gccgcagcagtaccatagtg
>Ars2kpn3	cactatggactgctgcggcagtgtaggctggagctgcttc
>Ars2kpn4	cctttctgacctccggtagaaattccggggatccgtcgac
>Ars2kpn5	tctaccggaaggtcagaaagg
>Ars2kpn6	aatgaccagcacagtcgtga
>Ars3kpn1	cagcagctgcggttgaata
>Ars3kpn2	gcgatatcaccggcttc
>Ars3kpn3	gaaagccggtgatatcgcagtgtaggctggagctgcttc
>Ars3kpn4	attggcgtgaaagatctggaaattccggggatccgtcgac
>Ars3kpn5	tccagatcttcacgccaat
>Ars3kpn6	agcgcagagagaacggatag
>Ars4kpn1	gtaaaggacggatgccgtaa
>Ars4kpn2	gccgtgttaatcctcctgt
>Ars4kpn3	acaggaggattaacacggcagtgtaggctggagctgcttc
>Ars4kpn4	attctccctgctgaacaggacaattccggggatccgtcgac
>Ars4kpn5	gtcctgttcagcagggagaat
>Ars4kpn6	tgttcattgagtggcagca

APENDICE 2

Genes seleccionados activados en presencia de 11mM de Cr(VI)				
Designación del ORF	Gen	Función del producto del gen	KO	Log2 Nivel de cambio
Transporte de electrones y fosforilación oxidativa				
<i>BHE81_25140</i>	<i>cybC</i>	Citocromo soluble b562, función biológica no asignada	K15536	1.50
<i>BHE81_07325</i>	<i>cybB</i>	Citocromo soluble b561, acarreador de electrones transmembranal.	K12262	1.94
<i>BHE81_19030</i>	<i>bisC</i>	Cadena A de la dimetilsulfoxido reductasa (anaeróbica), acarreador transmembranal de electrones	K08351	1.95
<i>BHE81_19460</i>	<i>gltA</i>	Citrato sintasa	K01647	1.51
<i>BHE81_19465</i>	<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa, subunidad de citocromo b-556	K00241	1.95
<i>BHE81_19470</i>	<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa, subunidad hidrofóbica de anclaje a membrana	K00242	1.71
<i>BHE81_19480</i>	<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	K00239	1.56
<i>BHE81_22675</i>	<i>atpH</i>	ATP sintasa subunidad delta	K02113	1.83
<i>BHE81_22680</i>	<i>atpF</i>	ATP sintasa subunidad b	K02109	1.64
<i>BHE81_22685</i>	<i>atpE</i>	ATP sintasa subunidad c	K02110	1.73
<i>BHE81_22695</i>	<i>atpI</i>	ATP sintasa proteína I	K02116	1.54
Replicación, recombinación y reparación				
<i>BHE81_26455</i>	<i>ssbp</i>	Proteína de unión a cadena sencilla de ADN, replicación, reparación y recombinación de DNA	K03111	2.01
<i>BHE81_10860</i>	<i>nfo</i>	Endonucleasa IV, reparación de ADN por escisión de base	K01151	1.76
<i>BHE81_12780</i>	<i>recN</i>	RecN: reparación de ruptura de doble cadena de DNA, recombinación homologa	K03631	1.56
<i>BHE81_03730</i>	<i>cho</i>	Excinucleasa cho, endodeoxiribonucleasa sitio específica, reparación de ADN	K05984	1.53
<i>BHE81_21170</i>	<i>dinI</i>	Proteína I inducida por daño a ADN, factor de respuesta SOS	K12149	1.79
<i>BHE81_21980</i>	<i>dinI</i>	Proteína I inducida por daño a ADN, factor de respuesta SOS		4.83
<i>BHE81_13045</i>	<i>nrdH</i>	NrdH2C, requerida para reducción de la enzima reductasa de ribonucleosido-difosfato clase Ib	K06191	6.72
<i>BHE81_13055</i>	<i>nrdA</i>	Subunidad alfa de reductasa de ribonucleosido-difosfato clase Ib, esencial para síntesis y reparación de ADN	K00525	3.43
<i>BHE81_13060</i>	<i>nrdB</i>	Subunidad beta de reductasa de ribonucleosido-difosfato clase Ib, esencial para síntesis y reparación	K00526	2.53

		de ADN		
<i>BHE81_08655</i>	<i>hns</i>	Proteína H-NS de unión a ADN, reparación de rupturas de doble cadena de ADN por recombinación ilegítima	K03746	1.75
<i>BHE81_02385</i>		ADN polimerasa IV		4.67
Respuesta a estrés oxidativo				
<i>BHE81_12570</i>	<i>rpoE</i>	Subunidad de RNA polimerasa RpoE	K03088	1.62
<i>BHE81_13040</i>	<i>ahpD</i>	Alkilhidroperoxidasa		3.29
<i>BHE81_04165</i>	<i>tpx</i>	Tiol peroxidasa, protección contra estrés por peróxido de hidrogeno	K11065	1.85
<i>BHE81_24245</i>	<i>soxS</i>	SoxS activador transcripcional del regulón SoxRS,	K13631	1.75
<i>BHE81_23030</i>	<i>Mn-sod</i>	Mn-superóxido dismutasa	K04564	1.76
Biosíntesis de centros [Fe-S]				
<i>BHE81_12370</i>	<i>hscB</i>	Proteína chaperona HscB, biogénesis del centro [Fe-S]	K04082	1.77
<i>BHE81_12375</i>	<i>iscA</i>	Proteína de unión a Fe IscA, ensamble de centro [Fe-S]	K13628	1.81
<i>BHE81_12385</i>	<i>iscS</i>	Desulfurasa de cisteína	K04487	2.31
<i>BHE81_12390</i>	<i>iscR</i>	Regulador transcripcional Rrf2, ensamble de centro[Fe-S]	K13643	1.73
<i>BHE81_08295</i>	<i>sufS</i>	Desulfurasa de cisteína SufS/ selenocisteína liase	K11717	2.09
<i>BHE81_08300</i>	<i>sufD</i>	Proteína SufD, ensamble del centro [Fe-S]	K09015	2.16
<i>BHE81_08310</i>	<i>sufB</i>	Proteína SufB, ensamble del centro [Fe-S]	K09014	2.73
<i>BHE81_08315</i>	<i>sufA</i>	Proteína de unión a hierro SufA, ensamble del centro [Fe-S]	K05997	2.47
Adquisición y metabolismo de azufre				
<i>BHE81_25425</i>	<i>sulP</i>	Permeasa de sulfato		4.56
<i>BHE81_25430</i>	<i>can</i>	anhidrasa carbónica	K01673	6.36
<i>BHE81_15265</i>	<i>aslA</i>	Arilsulfatasa	K07184	3.35
<i>BHE81_02200</i>	<i>aslA</i>	Arilsulfatasa	K01130	2.78
<i>BHE81_13785</i>	<i>ssuD</i>	Alcanosulfonato monooxigenasa	K04091	2.64
<i>BHE81_13795</i>		Proteína de unión a alcanosulfonato		4.17
<i>BHE81_15005</i>	<i>cbs</i>	Cistationina beta sintasa	K01697	3.24
<i>BHE81_15010</i>	<i>cth</i>	Cistationina gama-liasa	K01758	3.65
<i>BHE81_15015</i>	<i>lysR</i>	Regulador transcripcional LysR		2.61
<i>BHE81_20670</i>	<i>ssuB</i>	Proteína de unión a ATP, sistema de transporte de sulfonato	K15555	4.07
<i>BHE81_20675</i>	<i>ssuC</i>	Permeasa, sistema de transporte de sulfonato	K15554	4.07
<i>BHE81_20680</i>	<i>ssuD</i>	Alquensulfonato monooxigenasa	K04091	4.02

<i>BHE81_20685</i>	<i>ssuA</i>	Proteína de unión a alquenosulfonato, sistema de transporte de sulfonato	K15553	5.28
<i>BHE81_20690</i>	<i>ssuE</i>	FMN reductasa, metabolismo de sulfuro	K00299	3.89
<i>BHE81_04410</i>	<i>metQ</i>	Sistema de transporte de metionina, proteína de unión a sustrato	K02073	7.61
<i>BHE81_04415</i>	<i>metN</i>	Sistema de transporte de metionina, proteína de unión a ATP	K02071	3.26
<i>BHE81_04420</i>	<i>metL</i>	Sistema de transporte de metionina, permeasa	K02072	2.69
<i>BHE81_05670</i>	<i>metN</i>	Sistema de transporte de metionina, proteína de unión a ATP	K02071	4.69
<i>BHE81_05675</i>	<i>metQ</i>	Sistema de transporte de metionina, proteína de unión a sustrato	K02073	4.55
<i>BHE81_08135</i>	<i>ssuB</i>	Permeasa, sistema de transporte de sulfonato/nitrato/taurina	K02050	2.96
<i>BHE81_08140</i>	<i>tauT</i>	Proteína de unión a sustrato, sistema de transporte de sulfonato/nitrato/taurina	K02051	3.59
<i>BHE81_08145</i>	<i>ssuA</i>	Proteína de unión a sustrato, sistema de transporte de sulfonato	K15553	2.32
<i>BHE81_08155</i>	<i>ssuD</i>	Alquenosulfonato monooxigenasa	K04091	2.99
<i>BHE81_08170</i>	<i>rsft</i>	Sulfurtransferase		3.81
<i>BHE81_02450</i>	<i>tauA</i>	Proteína periplasmática de unión a sustrato, sistema de transporte de taurina	K15551	3.08
<i>BHE81_02455</i>	<i>tauB</i>	Proteína de unión a ATP, sistema de transporte de taurina	K10831	2.71
<i>BHE81_02460</i>	<i>tauC</i>	Permeasa, sistema de transporte de taurina	K15552	1.84
<i>BHE81_02465</i>	<i>tauD</i>	Taurina dioxigenasa	K03119	2.63
Adquisición de hierro y manganeso				
<i>BHE81_26615</i>	<i>fecl</i>	RNA polimerasa factor sigma Fecl	K03088	3.06
<i>BHE81_26625</i>	<i>fecA</i>	Proteína de transporte de Fe(III) dicitrato	K16091	2.65
<i>BHE81_26630</i>	<i>fecB</i>	Proteína periplasmática de unión a sustrato FecB, transporte de Fe(III) dicitrato	K02016	2.66
<i>BHE81_26635</i>	<i>fecC</i>	Permeasa FecC, transporte de Fe(III) dicitrato	K02015	4.30
<i>BHE81_26640</i>	<i>fecD</i>	Permeasa FecD, transporte de Fe(III) dicitrato	K02015	1.76
<i>BHE81_26645</i>	<i>fecE</i>	Proteína de unión a ATP FecE, transporte de Fe(III) dicitrato	K02013	3.88
<i>BHE81_10835</i>	<i>cirA</i>	Receptor de ferrienterocolina y colicina I	K16089	2.58
<i>BHE81_13420</i>	<i>sitA</i>	Sistema de transporte Fe ²⁺ /Mn ²⁺ , proteína de unión a sustrato	K11604	3.97
<i>BHE81_13425</i>	<i>sitB</i>	Sistema de transporte Fe ²⁺ /Mn ²⁺ , proteína de unión a ATP	K11607	4.53
<i>BHE81_13430</i>	<i>sitC</i>	Sistema de transporte Fe ²⁺ /Mn ²⁺ , permeasa	K11605	4.60
<i>BHE81_13435</i>	<i>sitD</i>	Sistema de transporte Fe ²⁺ /Mn ²⁺ , permeasa	K11606	4.34
<i>BHE81_13465</i>	<i>hemR</i>	Receptor de membrana externa de hemina, dependiente de TonB	K16087	4.00

<i>BHE81_13470</i>	<i>hmuS</i>	Proteína de transporte de hemina HmuS	K07225	3.57
<i>BHE81_13475</i>	<i>fhuD</i>	Proteína periplasmática de unión a hemina	K02016	4.61
<i>BHE81_13480</i>	<i>fhuB</i>	Permeasa, transportador de hemina ABC	K02015	4.07
<i>BHE81_13485</i>	<i>fhuC</i>	ATPasa, transportador de hemina ABC	K02013	4.92
<i>BHE81_15690</i>	<i>yqiH</i>	Reductasa de Fe-sideroforo	K07229	2.06
<i>BHE81_16810</i>	<i>bfd</i>	Ferredoxina asociada a bacterioferritina	K02192	6.81
<i>BHE81_18780</i>	<i>fepA</i>	Receptor de membrana extrema para ferric-enterobactina dependiente de Ton-B	K19611	4.23
<i>BHE81_18785</i>	<i>fes</i>	Esterasa de enterobactina	K07214	3.45
<i>BHE81_18790</i>	<i>ybdZ</i>	Proteína periplasmica, biosíntesis de enterobactina		3.28
<i>BHE81_18795</i>	<i>entF</i>	Enterobactina sintetasa, componente F	K02364	2.65
<i>BHE81_18800</i>	<i>fepC</i>	ATPasa, sistema de transporte ABC de Fe(III)-enterobactina	K02013	3.51
<i>BHE81_18805</i>	<i>fepG</i>	Permeasa FepG, sistema de transporte de Fe(III)-enterobactina	K02015	2.03
<i>BHE81_18810</i>		Proteína hipotética		3.00
<i>BHE81_18815</i>	<i>entS</i>	Exportador de enterobactina EntS	K08225	4.47
<i>BHE81_18820</i>	<i>fepB</i>	Proteína periplasmica de unión sustrato, sistema de transporte de fe(III) enterobactina	K02016	3.50
<i>BHE81_18825</i>	<i>entC</i>	Isocorismato sintasa, biosíntesis de enterobactina	K02361	4.17
<i>BHE81_18830</i>	<i>entE</i>	2,3-dihydroxybenzoato-AMP ligasa, biosíntesis de enterobactina	K02363	4.72
<i>BHE81_18835</i>	<i>entB</i>	Isochorismato liasa / aril acarreador, biosíntesis de enterobactina	K01252	4.59
<i>BHE81_18840</i>	<i>entA</i>	2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoatp deshidrogenasa, biosíntesis enterobactina	K00216	3.37
<i>BHE81_18845</i>	<i>entH</i>	Tioesterasa, biosíntesis de enterobactina		2.49
<i>BHE81_08215</i>	<i>mhp</i>	Activador transcripcional de operón Mhp	K05818	2.67
<i>BHE81_08220</i>	<i>fecB</i>	Proteína periplasmica de unión a sustrato, sistema de transporte ABC de Fe(III)-enterobactina	K02016	3.44
<i>BHE81_08225</i>	<i>fecD</i>	Permeasa, sistema de transporte ABC de Fe(III)-enterobactina	K02015	2.47
<i>BHE81_08230</i>	<i>fecE</i>	ATPasa, sistema de transporte ABC de cobalamina/Fe(III)-enterobactina	K02013	2.00
<i>BHE81_08360</i>	<i>fecB</i>	Proteína periplasmica de unión a sustrato, sistema de transporte ABC de Fe(III)-sideróforo	K02016	2.50
<i>BHE81_08365</i>	<i>fecD</i>	Permeasa, sistema de transporte ABC de Fe(III)-sideróforo	K02015	3.05
<i>BHE81_08370</i>	<i>fecE</i>	ATPasa, sistema de transporte ABC de cobalamina/Fe(III)-sideróforo	K02013	2.36
<i>BHE81_08445</i>	<i>hemP</i>	Internalización de hemina		1.95
<i>BHE81_09125</i>	<i>fhuA</i>	Proteína receptora de Fe	K02014	2.26

<i>BHE81_26060</i>	<i>fhuA</i>	Proteína receptora de Fe	K02014	1.65
<i>BHE81_01495</i>	<i>fhuA</i>	Proteína receptora de Fe	K02014	2.64
<i>BHE81_03560</i>	<i>fhuC/fecE</i>	ATPasa, sistema de transporte ABC Fe(III)	K02013	1.86
<i>BHE81_03565</i>	<i>fecD</i>	Permeasa, sistema de transporte ABC de Fe(III)	K02015	2.08
<i>BHE81_03570</i>	<i>fecB</i>	Proteína periplasmica de unión a sustrato FecB, transporte de Fe(III) dicitrato	K02016	1.99
<i>BHE81_03575</i>		Proteína hipotética		3.44
<i>BHE81_11640</i>		Proteína hipotética		1.89
<i>BHE81_11645</i>	<i>mntH</i>	Transportador de manganeso dependiente de protones	K03322	2.21
Respuesta a limitación de fosfato				
<i>BHE81_21040</i>	<i>phoH</i>	Proteína inducible por deficiencia de fosfato, ATPasa predicha	K06217	2.33
<i>BHE81_02595</i>	<i>phoB</i>	Proteína reguladora de respuesta PhoB, sistema de dos componentes (PhoR-PhoB)	K07657	2.29
<i>BHE81_22625</i>	<i>pstS</i>	Sistema ABC de transporte de fosfato, proteína periplasmática de unión a fosfato	K02040	2.89
Transporte de molibdato				
<i>BHE81_19645</i>	<i>modA</i>	Transportador de molibdato tipo ABC, proteína de unión a sustrato ModA	K02020	1.66
<i>BHE81_19650</i>	<i>modB</i>	Transportador de molibdato tipo ABC, permeasa ModB	K02018	1.96
Respuesta a estrés osmótico				
<i>BHE81_10710</i>	<i>osmF</i>	Proteína de unión a glicina-betaína, sistema de transporte tipo ABC, respuesta a estrés osmótico	K05845	1.54
<i>BHE81_13065</i>	<i>proV</i>	Permeasa de glicina-betaína	K02000	2.10
<i>BHE81_03725</i>		Proteína relacionada a formación de esferoplastos		4.72
<i>BHE81_04010</i>	<i>osmB</i>	Precursor de lipoproteína B inducible por shock osmótico	K04062	4.29
<i>BHE81_04015</i>		Proteína hipotética		8.29
<i>BHE81_07440</i>		Inhibidor de lisozima unido a membrana		2.23
<i>BHE81_00470</i>	<i>osmY</i>	OsmY proteína periplasmática inducida por shock osmótico	K04065	2.48
<i>BHE81_27505</i>	<i>osmC</i>	Peroxiredoxina OsmC, proteína inducida por estrés osmótico	K04063	2.48
Respuesta a estrés en la envoltura celular				
<i>BHE81_12570</i>	<i>rpoE</i>	Factor sigma de RNA polimerasa RpoE	K03088	1.62
<i>BHE81_03725</i>		Proteína periplasmática relacionada a formación de esferoplastos		4.72
<i>BHE81_10435</i>	<i>wzc</i>	Proteína tirosina quinasa Wzc	K16692	3.17
<i>BHE81_23050</i>	<i>cpxP</i>	CpxP, proteína periplasmática de respuesta a estrés en la envoltura celular	K06006	2.88

Síntesis, degradación y modificación de lípidos				
<i>BHE81_13000</i>	<i>lpxO</i>	Fe(2+)/alfacetoglutarato dioxigenasa LpxO (modificación de lípido A)	K12979	1.86
<i>BHE81_14165</i>	<i>lgt</i>	Fosfatidilglicerol-prolipoproteína diacilgliceril transferasa (modificación de lípidos de polipoproteínas)	K13292	1.50
<i>BHE81_14340</i>	<i>atoB</i>	Acetil-CoA C-acetiltransferasa	K00626	2.09
<i>BHE81_09095</i>		Desaturasa de ácidos grasos		5.41
<i>BHE81_24330</i>	<i>acs</i>	Acetil-CoA sintetasa	K01895	2.35
<i>BHE81_24760</i>	<i>psd</i>	Fosfatidilserina decarboxilasa	K01613	1.63
<i>BHE81_02930</i>	<i>tesC</i>	Tioesterasa	K12500	2.22
<i>BHE81_01820</i>	<i>fadE</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	K06445	2.74
<i>BHE81_23670</i>	<i>fadA</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa	K00632	2.40
<i>BHE81_23675</i>	<i>fadB</i>	Enoil-CoA hidratasa	K01825	1.86
<i>BHE81_11550</i>	<i>fadL</i>	Transportador de ácidos grasos de cadena larga	K06076	1.59
<i>BHE81_02200</i>	<i>aslA</i>	Arilsulfatasa	K01130	2.78
Síntesis, reparación y degradación de proteínas				
<i>BHE81_15345</i>	<i>S21p</i>	Proteína ribosomal S21p (SSU)	K02970	2.34
<i>BHE81_16205</i>	<i>L27p</i>	Proteína ribosomal L27p (LSU)	K02899	2.18
<i>BHE81_16380</i>	<i>S9p</i>	Proteína ribosomal S9p (SSU)	K02996	1.71
<i>BHE81_16385</i>	<i>L13p</i>	Proteína ribosomal L13p (LSU)	K02871	1.78
<i>BHE81_18145</i>	<i>L28p</i>	Proteína ribosomal L28p (LSU)	K02902	1.96
<i>BHE81_06740</i>	<i>S22p</i>	Proteína ribosomal S22p (LSU)		1.73
<i>BHE81_03725</i>		Chaperona periplasmática de replegamiento proteico		4.72
<i>BHE81_09355</i>	<i>htpX</i>	Proteasa de unión a membrana controlada por estrés	K03799	2.25
<i>BHE81_01550</i>	<i>htrA/depG</i>	Endoproteasa, factor de control de calidad proteica de membrana externa	K04771	3.32
<i>BHE81_23050</i>	<i>cpxP</i>	Chaperona periplasmática de adaptación a estrés	K06006	2.88
Metabolismo y transporte de aminoácidos				
<i>BHE81_13455</i>	<i>ilv</i>	Acetolactato sintasa	K01652	2.64
<i>BHE81_03695</i>	<i>astC</i>	Acetilornitina aminotransferasa	K00840	2.17
<i>BHE81_03700</i>	<i>astA</i>	Arginina N-succiniltransferasa	K00673	1.60
<i>BHE81_03705</i>	<i>astD</i>	Succinilglutamato semialdehído deshidrogenasa	K06447	1.59
<i>BHE81_03710</i>	<i>astB</i>	Succinilarginina dihidrolasa	K01484	1.90
<i>BHE81_03715</i>	<i>astE</i>	Succinilglutamato desuccinilasa	K05526	2.22
<i>BHE81_14340</i>	<i>atoB</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	K00626	2.09
<i>BHE81_15005</i>	<i>cbs</i>	Cistationina gama-liasa	K01697	3.24
<i>BHE81_15010</i>	<i>cth</i>	Cistationina beta-sintasa	K01758	3.65
<i>BHE81_15015</i>		Regulador transcripcional, Familia LysR		2.61
<i>BHE81_16510</i>	<i>qutE</i>	3-dehidroquinato deshidratasa	K03786	2.91
<i>BHE81_17350</i>	<i>puuE</i>	Gamma-aminobutirato:alfa-cetoglutarato	K00823	3.14

		aminotransferasa		
<i>BHE81_19035</i>	<i>mtn</i>	Acireductona dioxigenasa	K08967	2.00
<i>BHE81_19765</i>	<i>hutU</i>	Urocanato hidratasa	K01712	1.52
<i>BHE81_20900</i>	<i>puuA</i>	Gamma-glutamyl-putrescina sintetasa	K09470	3.14
<i>BHE81_04625</i>	<i>paaG</i>	Enoil-CoA hidratasa PaaB	K15866	6.75
<i>BHE81_08295</i>	<i>sufS</i>	Cisteína desulfurasa	K11717	2.09
<i>BHE81_09145</i>	<i>alr</i>	Alanina racemasa	K01775	1.73
<i>BHE81_09150</i>	<i>dadA</i>	D-amino ácido deshidrogenasa subunidad pequeña	K00285	1.98
<i>BHE81_00145</i>	<i>gabD</i>	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	K00135	1.98
<i>BHE81_00150</i>		Proteína hipotética		2.76
<i>BHE81_02465</i>	<i>tauD</i>	Taurina dioxigenasa	K03119	2.63
<i>BHE81_23670</i>	<i>fadA</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	K00632	2.40
<i>BHE81_23675</i>	<i>fadB</i>	Enoil-CoA hidratasa	K01825	1.86
<i>BHE81_24975</i>	<i>cycA</i>	Transportador de D-serina/D-alanina/glicina	K11737	1.80
<i>BHE81_02390</i>	<i>livF</i>	Transportador de aminoácidos ramificados, proteína de unión a ATP LivF	K01996	3.23
<i>BHE81_05670</i>	<i>metN</i>	Transportador de metionina, proteína de unión a ATP	K02071	4.69
<i>BHE81_05675</i>	<i>metQ</i>	Transportador de metionina, proteína de unión a sustrato	K02073	4.55
<i>BHE81_05695</i>		Glutamato sintasa [NADPH] subunidad grande		2.46
<i>BHE81_05700</i>		Regulador transcripcional de la familia AraC		2.51
<i>BHE81_07005</i>		Transportador tipo ABC, proteína de unión a sustrato	K02030	5.63
<i>BHE81_07010</i>		Transportador de metionina, proteína de unión a ATP	K02028	8.98
<i>BHE81_07015</i>		Transportador de metionina, permeasa	K02029	5.62
<i>BHE81_07020</i>		N-acetiltransferasa, familia GNAT		5.17
<i>BHE81_07025</i>		Transportador tipo ABC, proteína de unión a sustrato	K02030	5.75
<i>BHE81_19775</i>	<i>hutT</i>	Transportador de histidina, permeasa	K16234	3.00
<i>BHE81_19235</i>	<i>gltI</i>	Transportador tipo ABC glutamato/aspartato, proteína de unión a sustrato	K10001	2.21

Genes seleccionados reprimidos en presencia de 11mM de Cr(VI)

Designación del ORF	Gen	Función del producto del gen	KO	Log2 Nivel de cambio
Transporte de electrones y fosforilación oxidativa				
Generación de energía				
<i>BHE81_12590</i>	<i>pfl</i>	Piruvato formato liasa	K06866	-5.22
<i>BHE81_17935</i>	<i>hydN</i>	Formato deshidrogenasa H HydN	K05796	-3.43
<i>BHE81_19510</i>	<i>cydA</i>	Citocromo d ubiquinol oxidasa subunidad I	K00425	-2.62

<i>BHE81_19515</i>	<i>cydB</i>	Citocromo d ubiquinol oxidasa subunidad II	K00426	-2.60
<i>BHE81_19520</i>		Proteína hipotética		-2.40
<i>BHE81_19525</i>	<i>ybgE</i>	Proteína YbgE (función desconocida) del operon Cyd		-1.76
<i>BHE81_20105</i>	<i>pflD</i>	Piruvato formato liasas/ formato C-acetiltransferasa	K00656	-2.26
<i>BHE81_20495</i>	<i>pflD</i>	Piruvato formato liasas/ formato C-acetiltransferasa	K00656	-1.71
<i>BHE81_09055</i>	<i>pflD</i>	Piruvato formato liasas/ formato C-acetiltransferasa	K00656	-2.49
<i>BHE81_09060</i>	<i>tdcD</i>	acetato quinasa	K00932	-3.37
<i>BHE81_24355</i>	<i>fdoG, fdfH</i>	Formato deshidrogenasa H (subunidad mayor)	K00123	-4.06
<i>BHE81_24725</i>	<i>frdD</i>	Fumarato reductasa subunidad D	K00247	-3.79
<i>BHE81_24730</i>	<i>frdC</i>	Fumarato reductasa subunidad C	K00246	-4.16
<i>BHE81_24735</i>	<i>frdB</i>	Fumarato reductasa, proteína Fe-S	K00245	-3.92
<i>BHE81_24740</i>	<i>frdA</i>	Fumarato reductasa subunidad flavoproteína	K00244	-4.39
<i>BHE81_03385</i>	<i>gltA</i>	Citrato sintasa (si)	K01647	-4.34
Metabolismo de nitrógeno				
<i>BHE81_16965</i>	<i>nirB</i>	Nitrito reductasa [NAD(P)H] subunidad grande	K00362	-6.78
<i>BHE81_16970</i>	<i>nirD</i>	Nitrito reductasa [NAD(P)H] subunidad pequeña	K00363	-4.43
<i>BHE81_16975</i>	<i>cysG</i>	Sirohemo sintasa / Precorrina-2 oxidasa	K02302	-2.21
<i>BHE81_08705</i>	<i>narI, narV</i>	Nitrato reductasa subunidad gamma	K00374	-8.49
<i>BHE81_08710</i>	<i>narJ, narW</i>	Nitrato reductasa subunidad delta	K00373	-8.03
<i>BHE81_08715</i>	<i>narH, narY</i>	Nitrato reductasa subunidad beta	K00371	-7.81
<i>BHE81_08720</i>	<i>narG, narZ</i>	Nitrato reductasa subunidad alfa	K00370	-8.33
<i>BHE81_08730</i>	<i>NRT, narK, nrtP, nasA</i>	Transportador MFS, nitrato/nitrito transportador	K02575	-7.76
<i>BHE81_08735</i>	<i>narX</i>	Proteína histidina quinasa sensora de nitrato/nitrito, sistema de dos componentes	K07673	-2.27
<i>BHE81_08740</i>	<i>narL</i>	Proteína reguladora de respuesta a nitrato/nitrito, sistema de dos componentes	K07684	-2.47
<i>BHE81_13360</i>	<i>hypD</i>	Proteína involucrada en la maduración de [NiFe]-hidrogenasas HypD	K04654	-4.15
<i>BHE81_13365</i>	<i>hypE</i>	Proteína involucrada en la maduración de [NiFe]-hidrogenasas HypE	K04655	-4.17
<i>BHE81_20365</i>	<i>hcp</i>	Hidroxilamina reductasa/Nitrito reductasa	K05601	-1.76
<i>BHE81_06840</i>	<i>fdnI</i>	Formato deshidrogenasa N subunidad gamma, inducible por nitrato	K08350	-9.28
<i>BHE81_06845</i>	<i>fdnH</i>	Formato deshidrogenasa N subunidad beta, inducible por nitrato	K08349	-7.26
<i>BHE81_06850</i>	<i>fdnG</i>	Formato deshidrogenasa N subunidad alfa, inducible por nitrato	K08348	-7.12
<i>BHE81_06855</i>	<i>fdnG</i>	Formato deshidrogenasa N subunidad alfa	K08348	-6.59
Biosíntesis de menaquinona				
<i>BHE81_11200</i>	<i>menE</i>	O-ácido succinilbenzoico--CoA ligasa, biosíntesis de quinona	K01911	-1.92

<i>BHE81_11205</i>	<i>menC</i>	O-succinilbenzoato sintasa, biosíntesis de quinona	K02549	-2.37
<i>BHE81_11210</i>	<i>menB</i>	Naftoate sintase, biosíntesis de quinona	K01661	-3.10
<i>BHE81_11215</i>	<i>menH</i>	2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadieno-1-carboxilato sintasa, biosíntesis de quinona	K08680	-2.11
<i>BHE81_11220</i>	<i>menD</i>	2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-carboxilato sintasa, biosíntesis de quinona	K02551	-2.72
<i>BHE81_11225</i>	<i>menF</i>	Isocorismato sintasa específica para biosíntesis de menaquinonas	K02552	-2.21
<i>BHE81_20940</i>	<i>wrbA</i>	Flavoproteína WrbA, NAD(P)H deshidrogenasa, quinona reductasa	K03809	-1.59
Respuesta a estrés oxidativo y daño a DNA				
<i>BHE81_19080</i>	<i>uspG</i>	Proteína de estrés universal G	K11932	-1.78
<i>BHE81_21560</i>		Exodeoxiribonucleasa VIII		-2.52
<i>BHE81_04460</i>	<i>uspF</i>	Proteína de estrés universal F	K14061	-3.60
<i>BHE81_04980</i>	<i>uspE</i>	Proteína de estrés universal E	K14055	-1.67
<i>BHE81_06605</i>	<i>katG</i>	Catalasa/peroxidasa	K03782	-2.82
<i>BHE81_07530</i>	<i>sod2</i>	Superóxido dismutasa [Fe]	K04564	-3.15
Síntesis de cobalamina				
<i>BHE81_13895</i>	<i>cobP</i>	Adenosilcobinamida-fosfato guanililtransferase	K02231	-2.20
<i>BHE81_13900</i>	<i>cbiP</i>	Ácido cobárico sintasa	K02232	-2.07
<i>BHE81_13905</i>	<i>cbiO</i>	Componente ATPasa, transportador de cobalto del ECF	K02006	-1.75
<i>BHE81_13910</i>	<i>cbiQ</i>	Componente transmembranal, transportador de cobalto del ECF	K02008	-3.41
<i>BHE81_13915</i>	<i>cbiN</i>	Componente sustrato específico adicional, transportador de cobalto del ECF	K02009	-3.28
<i>BHE81_13920</i>	<i>cbiM</i>	Componente sustrato específico, transportador de cobalto del ECF	K02007	-3.87
<i>BHE81_13925</i>	<i>cbiL</i>	Precorrina-2/cobalto-factor-2 C20-metiltransferasa	K03394	-3.41
<i>BHE81_13930</i>	<i>cbiK</i>	Sirohidroclorina cobalto quelatasa	K02190	-3.35
<i>BHE81_13935</i>	<i>cbiJ</i>	Cobalto-precorrina-6A reductasa	K05895	-4.50
<i>BHE81_13940</i>	<i>cbiH</i>	Cobalto-precorrina-3b C17-metiltransferasa	K05934	-4.61
<i>BHE81_13945</i>	<i>cbiG</i>	Proteína de biosíntesis de cobalamina	K02189	-4.73
<i>BHE81_13950</i>	<i>cbiF</i>	Cobalto-precorrina-4 C11-metiltransferasa	K05936	-5.64
<i>BHE81_13955</i>	<i>cbiT</i>	Cobalto-precorrina-6B C15-metiltransferasa	K02191	-6.01
<i>BHE81_13960</i>	<i>cbiE</i>	Cobalto-precorrina-7 (C5)-metiltransferasa	K03399	-4.71
<i>BHE81_13965</i>	<i>cbiD</i>	Cobalto-precorrina-5B (C1)-metiltransferasa	K02188	-5.40
<i>BHE81_13970</i>	<i>cbiC</i>	Cobalto-precorrina-8X metilmutasa	K06042	-5.50
<i>BHE81_13975</i>	<i>cbiB</i>	Adenosilcobinamida-fosfato sintasa	K02227	-4.91
<i>BHE81_13980</i>	<i>cbiA</i>	Ácido cobárico A2CC-diamida sintasa	K02224	-4.52
Síntesis de pili				

<i>BHE81_12940</i>	<i>fimA</i>	Subunidad mayor de fimbria tipo1 FimA		-2.41
<i>BHE81_14435</i>	<i>fimE</i>	Proteína reguladora de fimbria tipo 1 FimE		-2.14
<i>BHE81_14445</i>	<i>fimA</i>	Subunidad mayor de fimbria tipo 1 FimA	K07345	-4.15
<i>BHE81_14460</i>	<i>fimD</i>	Proteína de anclaje de fimbria tipo 1 FimD	K07347	-1.73
Metabolismo de aminoácidos				
<i>BHE81_03655</i>	<i>ynjE</i>	Tiosulfato sulfurtransferasa	K01011	-3.53
<i>BHE81_11350</i>	<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa	K13788	-1.62
<i>BHE81_13740</i>	<i>sdaB</i>	L-serina deshidratasa, subunidad beta	K01752	-2.12
<i>BHE81_18035</i>	<i>gpml</i>	Fosfoglicerato mutasa	K15633	-2.40
<i>BHE81_05250</i>	<i>ynfE</i>	Dimetil sulfoxido reductasa, cadena A	K07309	-2.51
<i>BHE81_05545</i>	<i>dapA</i>	Dihidrodipicolinato sintasa	K01714	-2.20
<i>BHE81_06605</i>	<i>katG</i>	Catalasa/peroxidasa	K03782	-2.82
<i>BHE81_23285</i>	<i>ilvC</i>	Cetol-ácido reductoisomerasa	K00053	-1.61
Adquisición de níquel				
<i>BHE81_17475</i>	<i>nikA</i>	Transportador de níquel tipo ABC, proteína de unión a sustrato	K15584	-2.73
<i>BHE81_17480</i>	<i>nikB</i>	Transportador de níquel tipo ABC, permeasa	K15585	-1.81
<i>BHE81_17490</i>	<i>nikC</i>	Transportador de níquel tipo ABC, permeasa	K15586	-4.10
<i>BHE81_17495</i>	<i>nikD</i>	Transportador de níquel tipo ABC, proteína de unión a ATP		-2.57
<i>BHE81_17500</i>	<i>nikD</i>	Transportador de níquel tipo ABC, proteína de unión a ATP		-2.84
<i>BHE81_17505</i>	<i>nikR</i>	Regulador de respuesta a níquel	K07722	-2.31
Sistemas PTS				
<i>BHE81_13205</i>	<i>srlA</i>	PTS, transportador glucitol/sorbitol subunidad IIC	K02783	-2.51
<i>BHE81_13210</i>	<i>srlE</i>	PTS, transportador glucitol/sorbitol subunidad IIB	K02782	-2.58
<i>BHE81_13215</i>	<i>srlB</i>	PTS, transportador glucitol/sorbitol subunidad IIA	K02781	-1.62
<i>BHE81_13220</i>	<i>srlD</i>	Sorbitol-6-fosfate 2-deshidrogenasa	K00068	-2.40
<i>BHE81_00330</i>	<i>gfrC</i>	PTS, transportador de manosa subunidad IIC	K19508	-4.09
<i>BHE81_00335</i>	<i>gfrD</i>	PTS, transportador de manosa subunidad IID	K19509	-3.37
<i>BHE81_00340</i>	<i>gfrE</i>	Glucosamina--fructosa-6-fosfate aminotransferasa	K19504	-2.51
<i>BHE81_00345</i>	<i>gfrF</i>	Glucosamina--fructosa-6-fosfate aminotransferasa	K19510	-2.22
<i>BHE81_00415</i>	<i>celB</i>	PTS, transportador de celobiosa subunidad IIC	K02761	-2.65
<i>BHE81_23760</i>	<i>dcuB</i>	transportador de C4-dicarboxilato DcuB	K07792	-4.41
<i>BHE81_23765</i>	<i>celC</i>	PTS, transportador de diacetilquitobiosa componente IIA	K02759	-1.99
<i>BHE81_03075</i>	<i>ptsG</i>	PTS, transportador glucosa subunidad IIC	K02778	-3.51
<i>BHE81_22420</i>	<i>glvB</i>	PTS, transportador de maltosa y glucosa subunidad IIC	K02749	-1.55
<i>BHE81_22425</i>	<i>yidP</i>	Regulador transcripcional de la familia GntR	K03482	-1.71
<i>BHE81_22430</i>		Transportador	K07085	-2.12

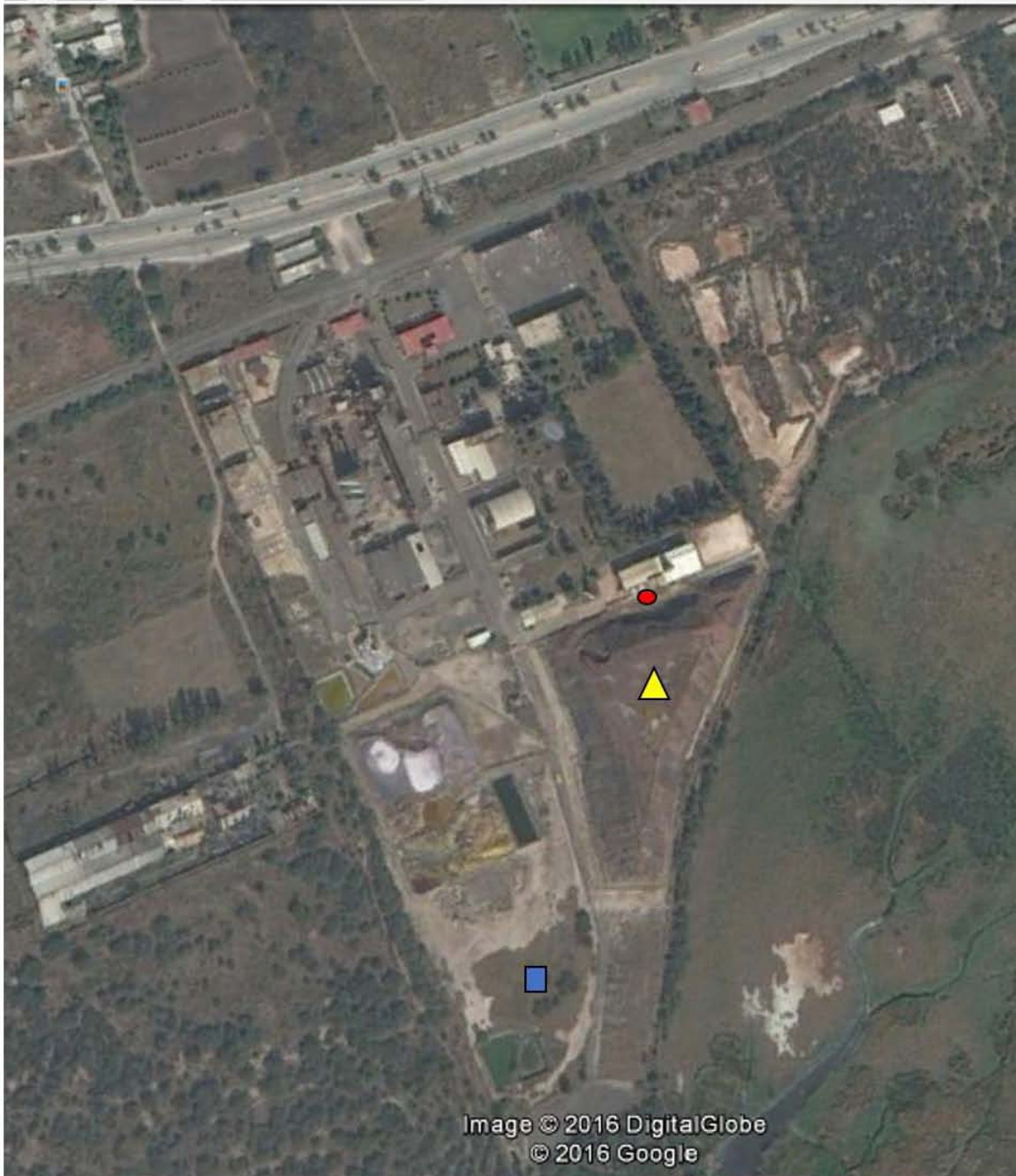
Transporte y almacenamiento de hierro				
<i>BHE81_17105</i>	<i>feoB</i>	Transporte de Fe(II), proteína B	K04759	-2.01
<i>BHE81_09660</i>	<i>fnA</i>	Ferritina	K02217	-2.30
Genes de fagos y transposones				
<i>BHE81_15380</i>		Proteína de tallo de fago		-2.00
<i>BHE81_15385</i>		Proteína de tallo de fago		-3.63
<i>BHE81_15395</i>		Proteína principal del tubo del tallo de fago	K06908	-3.65
<i>BHE81_15400</i>		Proteína de tallo de fago	K06907	-4.52
<i>BHE81_15410</i>		Fibra de tallo de fago		-2.24
<i>BHE81_15420</i>		Proteína de ensamble de la base del fago		-1.94
<i>BHE81_15425</i>		Proteína de ensamble de la base del fago	K06903	-2.01
<i>BHE81_15430</i>		Proteína de ensamble de la base del fago		-2.66
<i>BHE81_15435</i>		Proteína de morfogénesis del fago		-3.01
<i>BHE81_15440</i>		Proteína del tallo del fago		-2.64
<i>BHE81_15455</i>		Lisina de fago		-1.91
<i>BHE81_15475</i>		Terminasa de fago, subunidad endonucleasa		-5.04
<i>BHE81_15480</i>		Proteína de capsido del fago		-4.55
<i>BHE81_15485</i>		Proteína de andamiaje de la capsido de fago		-3.17
<i>BHE81_15490</i>		Terminasa de fago, subunidad ATPasa		-1.86
<i>BHE81_21690</i>		Proteína portal del fago		-2.86
<i>BHE81_21695</i>		Proteasa de fago		-3.30
<i>BHE81_21700</i>		Principal proteína de capsido de fago		-2.04
<i>BHE81_27600</i>		Transposasa		-2.41
<i>BHE81_27725</i>		Transposasa		-2.57
<i>BHE81_27830</i>		Sistema de transferencia conjugativa tipo, pilina acetilasa TraX		-1.83

XII. ANEXOS

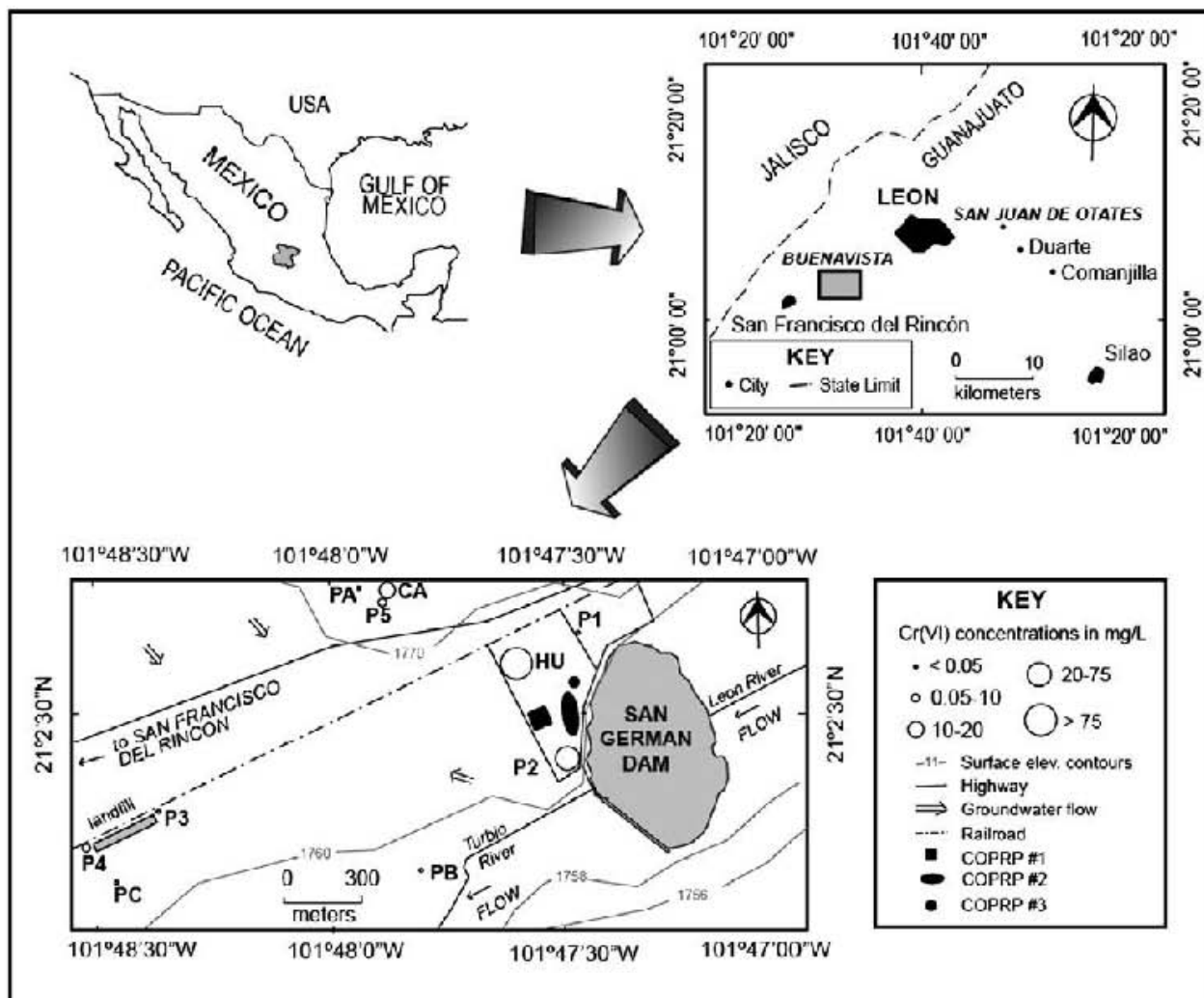
ANEXO 1. Propiedades fisicoquímicas de una muestra de suelo del sitio de depósito de residuos con Cr(VI) localizado en León Guanajuato. (Análisis realizados por Fertilab, Celaya Guanajuato, México).

Clase Textural				Franco Arcillo Arenoso				pH (1.2 agua)		8.22	Alcalino					
Arena: 52.04 %		Arcilla: 31.24 %		Limo: 16.72 %		pH Buffer		ND								
Punto de Saturación		56.0 %		Alto		Carbonatos Totales (%)		5.62 %		Mod. Bajo						
Capacidad de Campo		30.0 %		Alto		Salinidad (CE Extracto)		27.0 ds/m		Requieren de Lavado						
Punto March. Perm.		17.8 %		Alto		Requerimientos de Yeso		216		Ton/Ha						
Cond. Hidráulica		1.05 cm/hr		Bajo		Requerimientos de Cal		No Requiere								
Dens. Aparente		1.28 g/cm ³														
Fertilidad del Suelo										Cationes Intercambiables						
Det	Result	Unid	Muy Bajo	Bajo	Mod. Bajo	Med.	Mod. Alto	Alto	Muy Alto	Gráfico Basado en % de Saturación						
MO	0.08	%								Muy Alto						
P-Olsen	3.52	ppm								Alto						
K	928	ppm								Mod. Alto						
Ca	8909	ppm								Medio						
Mg	316	ppm								Mod. Bajo						
Na*	16432	ppm								Bajo						
Fe	2.42	ppm								Muy Bajo						
Zn	1.56	ppm														
Mn	0.96	ppm														
Cu	0.87	ppm														
B	17.9	ppm														
S	206	ppm														
N-NO3	256	ppm														
Relación Entre Cationes (Basadas en me/100g)										% Sat						
Relación	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/Mg												
Resultados	18.8	1.10	19.9	17.1												
Interpretación	Alto	Bajo	Bajo	Muy Alto												
										meq/100g						
										44.5	2.60	2.37	71.5	ND	ND	121
										Cación						
										Ca	Mg	K	Na*	Al*	H*	CIC

ANEXO 2. Imagen satelital del área de estudio (Google earth 2016). Triangulo amaerillo: Pila de residuos industriales con Cr(VI). Circulo rojo: Zona de muestreo de suelo. Cuadro azul: Piezometro número 2, utilizado para muestrear agua subterránea.



ANEXO 3. Mapa de la localización del sitio de deposito de residuos industriales con Cr(VI) en león Guanajuato, México (Villalobos-Aragón et al., 2012). Se indican algunas características del sitio.



Heavy Metal Adaptation

Ángel A Guevara-García, *Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Paloma Lara F, *Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Katy Juárez L, *Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Luis R Herrera-Estrella, *Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV Campus Guanajuato, Irapuato, Guanajuato, Mexico*

Based in part on the previous versions of this eLS article 'Heavy Metal Adaptation' (2001, 2009).

Fifty-three chemical elements, those with densities higher than 5 g cm^{-3} , are categorized as heavy metals. Ecologically speaking, any element that is not used in basic metabolism or biodegradable should be regarded as a heavy metal. Heavy metals are natural components of the biosphere and as such are part of biogeochemical cycles; however, as a consequence of human activities, heavy metal concentrations have reached toxic levels in the soils and water bodies of many ecosystems around the world. Actually, using multidisciplinary approaches, including 'omics' strategies, several factors involved in heavy metal adaptation have been identified. In the coming years, the detailed study of the contribution of these factors to the heavy metal tolerance mechanism, as well as the crosstalk between them, should produce the necessary knowledge for the development of heavy metal-tolerant crops that would improve agricultural productivity to meet growing food demand.

Introduction

Heavy metals have been defined as the group of elements that have densities exceeding 5 g cm^{-3} , and 53 chemical elements fall into this category. However, several definitions – based on

eLS subject area: Plant Science

How to cite:

Guevara-García, Ángel A; Lara F, Paloma; Juárez L, Katy; and Herrera-Estrella, Luis R (January 2017) Heavy Metal Adaptation. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
DOI: 10.1002/9780470015902.a0001318.pub3

Advanced article

Article Contents

- Introduction
- Biogeochemical Cycles of Heavy Metals
- Plant-heavy Metals Adaptation
- Perspectives
- Concluding Remarks

Online posting date: 16th January 2017

physical, chemical or toxic properties – have been proposed to describe heavy metals. Interestingly, the concept of heavy metal can include elements lighter than carbon but excludes some of the heaviest metals. In an ecological sense, a heavy metal could be considered to be any solid chemical element that causes environmental pollution, that does not serve any vital function and is toxic at low concentrations (e.g. lead and mercury), that has a vital function but is harmful to the organisms in high concentrations (e.g. copper and molybdenum) or that cannot be biologically degraded and tends to bioaccumulate. Wherever heavy metals are defined, living species must actively respond to protect themselves from metal poisoning in contaminated sites. See also: [Plant Macro- and Micronutrient Minerals](#)

Heavy metals are natural components of the Earth's crust mainly localized as dispersed components in rock formations. Few ecosystems present natural heavy metal toxicity; however, heavy metal concentrations in soil and water bodies are at toxic levels based on agriculture, manufacturing and mining or industrial waste disposal practices in a considerable number of places. Recent findings suggest that the adaptive response of living organisms to contaminated environments may be a rapid and efficient process. Insights into the mechanisms involved in heavy metal adaptation making use of multidisciplinary approaches including 'omics' strategies are in progress. See also: [Adaptation and Natural Selection: Overview](#)

Biogeochemical Cycles of Heavy Metals

On Earth, tectonics and photochemical processes continuously supply substrates and remove chemical elements via the so-called biogeochemical cycles. In these cycles, geochemical reactions (abiotics) are based on acid/base reactions, and the chemistry of life (biotic) is based on redox reactions. Four solid chemical elements (carbon, nitrogen, phosphorus and sulfur), together with oxygen and hydrogen gases, are the primary constituents of all biomolecules, and their biological fluxes are controlled by redox

reactions taking place in microbes whose activity alters the chemical composition of all ecosystems. The idea of heavy metals as part of biogeochemical cycles has been proposed as an explanation for the maintenance of environmental equilibrium. Iron and manganese, two typical heavy metals, are the two most abundant redox-active metals in the Earth's crust. Even the origin of life may have been intimately connected to the ability of iron to readily cycle between Fe(III) (ferric ion) and Fe(II) (ferrous ion) states. In fact, Fe(III) reduction has been proposed as one of the first forms of microbial respiration. On modern Earth, Fe(III) and Mn(IV) reduction are important processes for the oxidation of organic matter in a diversity of sedimentary environments (e.g. freshwater and marine sediments, shallow aquifers). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction has an important influence on the geochemistry of modern environments (Falkowski *et al.*, 2008). See also: Biogeochemical Cycles

Plant-heavy Metals Adaptation

Differences in ecology

Soil properties and the adaptive response

The distribution of living organisms in ecosystems affected by heavy metal toxicity depends not only on the kind, combination and concentration of metals but also on environmental factors such as soil chemistry, heterogeneity and, in particular, nutrient status (principally nitrogen, phosphorus and potassium). Gradients of soil conditions often determine areas of increasing stress or disturbance that impose strong selective pressure on the colonising species. During evolution, adaptations have developed in a very wide range of organisms from all major taxonomic groups. This adaptation mechanism is reflected in the high number of plant species that have become endemic in sites polluted with heavy metals. In each case, these plants have the ability to survive and grow in the presence of potentially toxic concentrations of heavy metals. See also: Natural Selection: Responses to Current (Anthropogenic) Environmental Changes; Plant Stress Physiology

Acid soils with pH 5.5 and lower, which significantly limit crop production worldwide, deserve special attention with respect to the heavy metal toxicity. The acid soils problem includes toxic levels of iron and manganese, as well as deficiencies of several essential mineral elements, principally phosphorous. Around of 30% the world's total soil and 50% of potentially arable land are acid soils. For this reason, revealing the biochemical mechanisms and gene products involved in plant tolerance to acid soils has been the objective of many laboratories around the world. See also: Soils and Decomposition

In the coming years, it will be necessary to focus more efforts on understanding the nature of heavy metal toxicity and mechanisms that plants have evolved to contend with this kind of stress. The application of modern technologies on a global scale ("omics" strategies) should prove very useful for these purposes.

Heavy metal effects on natural populations

All soils contain heavy metals and, with the exception of iron, which can attain a concentration in soil of 10%, all heavy metals reaching a concentration higher than 0.1% generate a polluted and toxic environment that changes the structure of plant communities. In reality, each plant species has its own threshold at which each heavy metal is toxic. Any plant adapted to live in heavy metal-contaminated soils is called a metallophyte, and these plants represent roughly 0.2% of all higher plants. Metallophytes can be classified in absolute, strict or cumetallophytes, which grow only in contaminated soils, and facultative or pseudometallophytes, which grow in both contaminated and noncontaminated soils (Bothe, 2011).

Soils in which metallophytes grow are classified based on the heavy metal that they mostly contain: serpentine soils basically contain nickel, seleniferous soils are rich in selenium, calamine soils have high levels of zinc and soils of the African Copper Belt contain a mixture of copper, cobalt, chromium, nickel and zinc (Alford *et al.*, 2010). A special case is soils contaminated with mercury; mercury-adapted metallophytes appear to not exist. Interestingly, *Polygonum aviculare* (Figure 1a), a plant species growing in a highly contaminated area in Northern Italy, is a good accumulator of mercury (Massa *et al.*, 2010).

Metallophytes are the result of tens, hundreds and often millions of years of strong selective pressures that metal-loaded soils exert on plants. Therefore, metallophytes can be used as



Figure 1 Plant heavy metal hyperaccumulator and metallophytes growing in polluted soils (a) *Polygonum aviculare* (mercury-accumulator); (b) *Mirabilis vera* (zinc-metallophyte); (c) *Viola lutea* ssp. *lukarniatica* (zinc metallophyte); (d) *Armeria maritima* ssp. *halleri* (zinc metallophyte); (e) *Thlaspi goesingenseas* (Pb-accumulator); (f) *Viola lutea* ssp. *westfalica* (lead-accumulator); (g) *Cardaminopsis halleri* (heavy metal-accumulator); (h) *Thlaspi caerulescens* (cadmio-accumulator); (i) *Silene vulgaris* (heavy metal-accumulator) (j) *Alyssum wulfenianum* (heavy metal-accumulator); (k) *Thlaspi cepaifolium* (heavy metal-accumulator); (l) *Viola tricolor* (metallophyte facultative). Images taken from <http://images.google.com>.

biomarkers of heavy metal-polluted soils. Good examples in this regard are spring sandwort (*Minuartia verna*; Figure 1b), *Viola lutea* ssp. *calaminaria* (Figure 1c) and *Armeria maritima* ssp. *halleri*, (Figure 1d), which grow in soils with high zinc concentrations. There is also the nickel-hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* (Figure 1e) and *V. lutea* ssp. *westfalica* (Figure 1f), which grow in soils with high lead concentrations. These two species also grow well in nonpolluted soils; *Cardaminopsis halleri* (Figure 1g), *Thlaspi caerulescens* (Figure 1h) and *Silene vulgaris* (Figure 1i), *Abyssum wulfenianum* (Figure 1j) and *Thlaspi cepaifolium* (Figure 1k) grow only in heavy metal heaps. In addition, *Viola tricolor* (Figure 1l) is a metallophyte facultative (Bothe, 2011).

Toxic metals are believed to be reducing the abundance and diversity of species; they also select for the proliferation of resistant/tolerant populations. Several studies have shown the high specificity of species distributions in metal-poisoned ecosystems. In plants, the formation of endemisms has been documented in different ecosystems around the world. For example, on the tropical island of New Caledonia (approximately 16 000 km² in area) serpentine soils containing toxic levels of nickel, chromium, cobalt and manganese cover about one-third of the island's surface. These typically infertile soils contain approximately 1500 native flora comprising woody perennials, epiphytic orchids and Cyperaceae growing in xerophytic scrub at low altitude. One of the endemic species from New Caledonia is the shrub *Maytenus founieri*, which is one of the nine manganese-hyperaccumulator plant species recognised worldwide (Morat *et al.*, 1986; Fernando *et al.*, 2008). In the copper region of Upper Shaba in Zaire, which comprises about 100 copper-cobalt ore deposits totalling some 20 km² disseminated in a metallogenic province, a number of distinct metalliferous habitats exist, such as copper clearings and naturally isolated copper hillocks. These areas bear specific plants, notably small annual herbs and grasses. Approximately 220 taxa are present on these outcroppings, of which 42 are endemic. Some of these plant species are located on a single hillock (Malaisse, 1983). In the mining area of Stolberg (South Aachen, Germany), *Betula* trees grow well on hills of mining smelter ash that have a total lead content of up to 10–20 g kg⁻¹. In each of these cases, the diversity of plant species is severely restricted, and edaphic ecotypes, which are tolerant to the specific metal present in excess in the soil, are often quickly selected. Endemisms are typical in areas polluted for fewer than 20 years. Other habitats in which adaptation takes place rapidly include spaces beneath galvanised fences and on roadsides. See also: **Environmental Heterogeneity: Temporal and Spatial**

Colonisers of specific sites

The abilities of certain plant species to colonise environments polluted by heavy metals have been widely described. Interestingly, molecular studies have demonstrated a higher diversity of eukaryotic than prokaryotic organisms living in heavy metal-contaminated habitats. Approximately 60% of the total biomass is represented by eukaryotic microalgae related to the neutrophilic species, such as *Dyctiosphaerium chlorelloides*. Owing to the predominance of eukaryotic microalgae in extreme acidic environments, it has been suggested that the adaptation

to this kind of conditions must have been relatively fast over evolutionary timescales. See also: **Ecophysiological Responses of Plants to Air Pollution**

In the plant kingdom, it seems clear that tolerance to heavy metals has arisen independently in the full spectrum of families. It is common to find species of *Gramineae*, *Caryophyllaceae*, *Lamiaceae* and *Fabaceae* widely distributed among heavy metal-contaminated ecosystems. The families *Flacourtiaceae*, *Violaceae* and *Brassicaceae* contain most of the so-called hyperaccumulators, in which the genera *Abyssum* (50 species) and *Thlaspi* (about 20 species) have been the most widely characterised. Metallophytes can be excluders (such as *Viola* sp.) or hyperaccumulator of heavy metals. Hyperaccumulators are defined as plants that actively take up and translocate large amounts of one or more heavy metals from the soil, thereby accumulating them in aboveground organs (especially leaves), at concentrations 100- to 1000-fold higher than those found in nonhyperaccumulating species. In metallophytes, the concentration of heavy metals in buds and leaves is high and the metal partition between shoots and roots differs from one metallophyte to another, even for plants growing side by side and for each heavy metal (Bothe, 2011; Krämer, 2010). In any case, they show no symptoms of phytotoxicity; about 450 angiosperm species have been identified thus far as heavy metal hyperaccumulators, although new reports of such plants are continually being published. Most plants are hyperaccumulators for a single heavy metal, but some plants can hyperaccumulate multiple metals (arsenic, cadmium, cobalt, copper, manganese, nickel, lead, antimony, selenium and thallium/zinc). *T. caerulescens*, *C. halleri* and *Sedum alfredii* hyperaccumulate zinc and cadmium but not lead. *Haumaniastrum katangense* is a hyperaccumulator of copper, *Abyssum murale*, *Abyssum bertolonii* and *Berkheyia cooldii* hyperaccumulate nickel, *Pteris vittata* accumulates selenium and *Viola baoshanensis* is a cadmium hyperaccumulator. One extreme hyperaccumulator is *Sebertia acuminata*, which can accumulate up to 26% (w/w) of nickel in its latex (Bothe, 2011; Broadley *et al.*, 2007; Chipeng *et al.*, 2010; Wu, 2010; Verbruggen *et al.*, 2009).

Interestingly, hyperaccumulating plants have not only evolved a mechanism to live in toxic concentrations of heavy metals but hyperaccumulation may also function as a strategy to prevent predation. As an example, the nickel-rich leaves of *Strephantus polygaloides* prevent the development of the herbivorous larvae of *Pieris rapae* and inhibit the growth of the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris*. A repellent effect of the plant sap from *S. acuminata* (25% nickel dry wt) was observed on the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Sagner *et al.*, 1998). The defensive effects of eight heavy metals against *Plutella xylostella* larvae have also been demonstrated. Copper, zinc, lead, chromium, cobalt, cadmium, manganese and nickel are often accumulated by plants. Unexpectedly, five of these metals (cadmium, manganese, nickel, lead and zinc) are toxic below accumulator levels, and three of them (cadmium, lead and zinc) are also toxic at near-normal-range concentrations to *P. xylostella*. These findings suggest that a metal hyperaccumulation defence mechanism to herbivores may be widespread among plants (Jhee *et al.*, 2006).

Hyperaccumulator plants have been used as 'indicators' for metallic deposits for hundreds of years. Their commercial

importance for metal prospecting is indisputable. The shrub *Hybanthus floribundus* is used as an indicator for nickel in Australia. A wild variety of the plant *Impatiens balsamina*, found in lead–zinc metal dumps in India, is regarded as a local bioindicator for these metals. *Eragrostis inflatum* (desert trumpet), *Oenothera caespitosa* and some species of the genus *Astragalus* (*A. pultersoni*, *A. presussi*, *A. thompsonae*) have been successfully used as indicator plants in uranium prospecting.

Finally, it is important to note that hyperaccumulator plants have gained considerable attention owing to their potential use in environmental technologies such as the biorecovery of contaminated sites (phytoremediation) or the recovery of commercially valuable metals from metal-loaded soils (phytomining). **See also: Bioremediation**

An extensive list of hyperaccumulator plants of different heavy metals can be found at <https://en.wikipedia.org/wiki/Hyperaccumulator>.

Mechanisms of metal uptake, exclusion, transport and storage

Uptake of some metal solutes from the soil environment may occur via a carrier-mediated system. Alternatively, as in the case of cations, they can be driven across the plasma membrane largely by the negative potential generated in part by proton extrusion mediated by the membrane enzyme H^+ ATPase (adenosine triphosphatase). In fact, the first cell structure exposed to heavy metals is the plasma membrane, in which an H^+ ATPase generates the driving force (proton electrochemical gradient) that mediates metal uptake (or exclusion) from the soil. The plasma membrane H^+ ATPase activity is finely regulated by reversible phosphorylation in response to many endogenous and exogenous signals, including heavy metal exposure. In plants, the mechanism of detoxification of heavy metals implies their chelation and deposition into the central vacuole. Metal transport into the vacuole is mediated by a tonoplast (vacuolar membrane) H^+ ATPase, sometimes referred to as an 'eco-enzyme' due to its ability to alter its activity in response to environmental stresses. Plants use several strategies to assimilate essential metals and, at the same time, to prevent metal toxicity. Plant genomes encode large families of metal transporters that coordinate their activities to maintain metal homeostasis. Transporters involved in metal efflux include the P_1B -ATPase family and the cation diffusion facilitator (CDF) family. Other transporters' families involved in metal uptake are the natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP), the ZIP (zinc-iron-regulated transporter) proteins and the plant-specific Yellow Stripe1-like (YSL) of metal uptake transporters (Kabala *et al.*, 2008). **See also: ATPases: Ion-motive; Ion Motive ATPases: P-type ATPases; Cell Membranes: Intracellular pH and Electrochemical Potential; Cell Membrane Features**

Biological exudates, including microbial siderophores and analogous compounds of plants termed phytosiderophores, are known to take part in the mobilization and differential uptake of certain elements. In this way, molybdenum and copper have been shown to form strong complexes with this class of molecules, facilitating their uptake. Understanding the mechanisms of synthesis, secretion, metal scavenging and

siderophore-mediated metal uptake have been the objectives of several research groups. Phytosiderophores are produced by *Graminaceous* plants in response to iron deficiency as part of a phytosiderophore-mediated iron uptake system. This system is also effective at transporting other metals including zinc, copper, nickel and cadmium, suggesting its participation in preventing heavy metal toxicity (Clemens *et al.*, 2013).

Once in the cell, the organism must critically balance the intracellular concentrations of these potentially toxic metals. In some bacteria and archaeans, animals and fungi, a class of small cysteine-rich metal-binding proteins called metallothioneins appear to be of primary importance in metal compartmentalisation and tolerance. These metallothionein genes have been used to produce heavy metal-tolerant transgenic plants. In plants, another class of metal-binding ligands called phytochelatins has been described. These proteins are rich in glutamine and cysteine residues and may protect sensitive enzymes by sequestering heavy metals, such as cadmium, lead and zinc. Metallothioneins are polypeptides encoded by a gene family, whereas phytochelatins are a family of peptides enzymatically synthesised. Both animals and plants contain metallothionein and chelatin synthase genes in their genomes and in both cases, cysteine-rich polypeptides have evolved as a mechanism to control the uptake and accumulation of heavy metals. The principal evidence for the function of phytochelatins in heavy metal detoxification derives from the characterisation of *Arabidopsis thaliana* and *Schizosaccharomyces pombe* mutants, which are affected in the phytochelatins synthase gene. Both mutants are highly sensitive to cadmium and arsenate concentrations that do not affect their wild-type counterparts. The study of metallothioneins in plants has been difficult, however, when metallothionein genes from *A. thaliana* are expressed in yeast and *Synechococcus* metallothionein-deficient strains they are able to confer copper and zinc tolerance, showing that plant metallothioneins have the biological function of bestowing metal tolerance (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008). **See also: Plant Stress Physiology; Transgenic Plants; Genetically Modified Plants**

The majority of organisms that inhabit metalliferous soils are known to exclude toxic metals. The production of extracellular polysaccharides and the excretion of chelating substances, such as organic acids, by plant species may participate in the immobilization of such toxic elements. Little is known about the molecular, biochemical and physiological processes that result in the hyperaccumulator phenotype, even so, low-molecular-weight chelators, including some amino acids and organic acids (e.g. citric acid), have been shown to participate in transport, compartmentalisation and detoxification mechanisms. Only a small fraction of the metal is found as free aqua ions. Therefore, the majority of ions must be bound to low-molecular mass ligands or to proteins. There are many metal-binding biomolecules that have been reported to be involved in sequestering, transporting or storing heavy metals in hyperaccumulator species. Examples of plant ligands include mugineic acid, nicotinamine, citric acid and histidine. In terms of hyperaccumulator plants, the genome-wide transcription analysis performed in *A. halleri* deserves special note as it enabled the identification of a set of novel genes involved in

metal hyperaccumulation and tolerance (Talke *et al.*, 2006). See also: **Bioremediation**

In the genus *Alyssum*, in which the nickel concentration can reach 3% of the leaf dry biomass, the tolerant response correlates with an increase in the levels of free histidine. The supply of this amino acid compared with a nonaccumulating species greatly increases both its nickel tolerance and transport to the shoot (Krämer *et al.*, 1996). Transcription levels of seven of the eight genes implicated in histidine biosynthesis were higher in the hyperaccumulator *A. lesbiacum* compared with the nonaccumulator *A. montanum*. Furthermore, the overexpression in *A. thaliana* of the ATP-phosphoribosyltransferase (the first histidine biosynthesis enzyme) results in nickel tolerance (Ingle *et al.*, 2005). See also: **Plant Cell: Overview**

Proline has also been associated with heavy metal tolerance. This amino acid has been extensively studied in the context of plant responses to salinity, water deficits, high temperatures and heavy metal stresses. Proline accumulation is heavy metal-inducible in several plant species, and the metal-tolerant populations of three different species (*Armeria maritima*, *Deschampsia cespitosa* and *S. vulgaris*) have higher proline levels compared with their nontolerant relatives. Moreover, higher proline production has been demonstrated to drive metal tolerance in transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* (Siripornadulsil *et al.*, 2002). The function of proline in heavy metal tolerance is unclear but apparently could be related to metal chelating or scavenging free radicals induced by redox metals such as cadmium, zinc, copper and mercury.

In barley (*Hordeum vulgare*), a heavy metal-inducible receptor-like protein kinase was recently identified. Interestingly, this receptor is also upregulated during leaf senescence, supporting the idea of an overlapping mechanism controlling heavy metal homeostasis and leaf senescence. Receptor-like protein kinases perform important functions in the perception and transduction of extra- and intracellular signals, but never before have been any of these kinases associated with heavy metal-stress response (Ouelhadj *et al.*, 2007).

The accumulation of organic acids, such as citric, isocitric, oxalic, tartaric, malic, malonic and aconitic acids, in roots and leaves of metal-tolerant plants has also been described. It is implied that these acids play an important role in metal hyperaccumulation. The formation of anionic or uncharged, zinc-citrate complexes results in more zinc passing through the excised stem of *Pinus radiata*, similar to copper in *Papyrus* stems. In response to zinc, the roots of *A. halleri* demonstrated an increase in their levels of organic acids. These complexes positively affect transport in the xylem by reducing adsorption to the vessel walls and by decreasing the rate of lateral escape. A causal relationship between organic acid accumulation and metal tolerance has even been proposed. This relationship is well established for nickel-accumulating plants, which complex nickel with malate, malonate and citrate. In the latex of *S. acuminata*, the most extreme nickel-hyperaccumulating tree known, most of the metal is bound to citrate. Apparently the organic acids bind to heavy metals in the cytoplasm and this complex is finally accumulated in the vacuole. However, it is likely that organic acids do not bind metal ions strongly enough to function as long-distance transporters. See also: **Rhizosphere**

Another significant cause of metal toxicity in acidic soils is manganese, which causes stunted growth, chlorosis and necrotic lesions on leaves. The physiological mechanisms conferring manganese toxicity (and tolerance) have not been elucidated. However, it has been suggested that manganese-induced oxidative stress may be the cause of its toxicity. With respect to manganese tolerance, plant genes that encode Mn^{2+} transporters have been identified, which, when overexpressed in transgenic plants, confer manganese tolerance via metal accumulation in both whole-plant and tonoplast vesicles. Apparently this transporter has a broad substrate range for divalent cations and may be implicated in tolerance to other heavy metals by sequestering them into vacuole. See also: **Plant Vacuoles**

Heavy metal tolerance has been developed for various plant species, and it is a very good example of evolutionary convergence. Then, it is not a surprise that strategies to contend with heavy metal contamination differ between different plant species. *A. maritima* ssp. *halleri* has special glands that are apparently used to excrete excess heavy metals. *V. tricolor* secretes heavy metals into the hairs of leaves and stems, which are discarded when overloaded. Other plant species such as *V. lutea* and *Berkheya codii* establish symbiotic associations with arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraredices* Br1), thereby allowing them to grow in soils with a diversity of heavy metals (Bothe, 2011).

In summary, plants can cope with the adverse effects of heavy metals using one or a combination of the following strategies:

- Formation and excretion of huge complex molecules (called siderophores) serving as chelators of heavy metals to form a large complex that cannot be absorbed by the cells.
- Synthesis of carboxylic acids (malate, citrate or oxalacetate) that can bind heavy metals in the rhizosphere or in root apoplasts to prevent their uptake.
- Synthesis of molecules with Sullydril-groups (SH-)groups, such as histidine or glutathione, or polyamines that can bind heavy metals to maintain their homeostasis in cytoplasm.
- Synthesis of small cysteine-rich proteins called metallothioneins that can bind heavy metals in the SH-groups of the cysteines.
- Synthesis of phytochelatins composed of multiple residues of glutamate-cysteine ending with a glycine, which can bind heavy metals in the SH-groups of cysteines. Phytochelatins are synthesised nontranslationally by phytochelatin synthase from glutathione.
- The activity of heavy metal transporters, plasma membrane and tonoplast includes several classes of transporters to heavy metals such as CPX-ATPases for copper and cadmio, ABC for cadmium, ZIP for iron and zinc and Nramp and the CDF family with a broad range of affinities for heavy metals. Plant genomes have several genes encoding for each class of transporter, and several of them are inducible by heavy metals and other factors (e.g. plant development state or annual season). In general, transporters cannot discriminate between essential elements or toxic heavy metals.
- On the basis of the synthesis of Reactive Oxygen Species-detoxifying (ROS-) detoxifying enzymes, plants have a battery of stress response genes such as glutathione

S-transferase, superoxide dismutase, cytochrome P450 and thioredoxin, whose transcription and/or activity is inducible by several types of stress including heavy metals that cause ROS production. Furthermore, heat-shock proteins are also expressed in response to heavy metal exposition; these proteins serve to protect and repair proteins from oxidative stress.

- Alteration in root morphology. While different metallophytes have all sorts of roots, it has been recently reported that *Thlaspi caurelescens*, a hyperaccumulator of zinc and cadmium, possesses a pericardodermal layer of cell with thickened tangential cell walls impregnated with lignin that apparently can be a morphological root adaptation to heavy metal stress. This structure is not present in its close relative, the non-metallophyte *Thlaspi arvense*. The significance, if any, of this particular root anatomy against heavy metal stress is not clear; alterations in the root morphology of other metallophytes have not been reported.

Heavy metal tolerance is the result of putting into operation different mechanisms. In fact, recent experimental data support the assertion that heavy metal tolerance and hyperaccumulation, earlier considered to be independent mechanisms, are closely related. Transcriptional studies have revealed approximately 30 genes related to metal hyperaccumulation in *A. halleri*, some of which have also been related to metal tolerance in nonhyperaccumulator plants. These kinds of comparative studies on the global scale are just beginning and should include intense research in the coming years.

Perspectives

The mechanism of metal hyperaccumulation is the object of intensive investigations, especially with regard to the ecological exploitation of such plants. The gradual depletion of ecosystems encourages researchers not only to investigate the natural response of organisms living on contaminated sites but also to suggest strategies for environmental cleanup. The lack of approaches for heavy metal remediation has created a major need for the development of novel strategies. Current research focuses on the identification of novel players in metal tolerance, employing postgenomic approaches such as metabolic profiling, global transcriptome and proteomic analysis and metagenomics sequencing. In addition, mutants need to be checked routinely for altered metal sensitivity. It would not be surprising if the list of genes and gene products involved in metal homeostasis and heavy metal defence expands in the near future. **See also: Metabolite Profiling in Plants; Transcriptomics and Proteomics: Integration?**

The applications of genetic engineering have been shown to be highly successful in obtaining heavy metal-resistant species. Transgenic plants tolerant to mercury, cadmium, arsenic, lead, zinc and selenium have already been generated. With regard to mercury and arsenic tolerance, an elegant two-transgenic approach was designed. The efficiency of the use of transgenic plants as strategy for environmental cleanup remains to be demonstrated in contaminated soils. It is clear that heavy

metal tolerance is a multifactor phenomenon. Therefore, altering a plant's metabolism via transgenesis may result in additional beneficial or detrimental effects. Two reported examples help to illustrate both cases. In the first one, ectopic overexpression of a P-type ATPase from *A. thaliana* (AtHMA3) complement the cadmium/lead-hypersensitive strain *yef1* of *Saccharomyces cerevisiae* and improved plant tolerance to cadmium, cobalt, lead and zinc (Morel *et al.*, 2009). In the second one, the overexpression of the *Escherichia coli* arsenate reductase (ArsC) gene in *A. thaliana* transgenic plants resulted not in arsenic resistance but in a hypersensitive phenotype, apparently due to the high affinity of arsenite for protein thiol groups and the consequent depletion of the cellular glutathione pool (Dhankher *et al.*, 2002). **See also: Transgenic Plants; Genetically Modified Plants**

Although there has been some success with heavy metal-resistant plants, the fact that we do not completely understand the limiting factors in increasing uptake, translocation and tolerance to toxic chemical elements makes the continuation of fundamental and applied research necessary. Improved genetic engineering strategies need to be devised, and powerful 'omics' strategies have already initiated. Moreover, hyperaccumulator species are being evaluated with respect to their potential use as molecular genetic model systems. All of this work should eventually make it possible to overcome, at low monetary and environmental costs, the problem of heavy metal contamination. Finally, it is very important to keep in mind that the eventual development of any safe environmental cleanup technology must be supported by multidisciplinary, labour-intensive research focused on the underlying processes on the genetic, molecular, biochemical, physiological, ecological and agronomic levels. **See also: Bioremediation**

Recent advances in global-scale studies, referred to as 'omics' (ionomics, metabolomics, transcriptomics, proteomics, etc.), have contributed to the identification of trace elements metabolites, transcription factors (TFs) and stress-inducible proteins involved in heavy metal tolerance. Eventually, this knowledge can be used to generate heavy metal-tolerant plants to help improve agricultural productivity.

The identification of all low-molecular-weight metabolites used by organisms throughout their developmental stages is referred to as metabolomics (Arbona *et al.*, 2013). Some metabolites such as amino acids and amides, organic acids, glutathione and alpha-tocopherol and phenols have been associated with heavy metal stress tolerance.

All macro- and micromineral nutrients (ionomes) are essential to proper plant development, but all of them can become toxic when present in high concentrations. They additionally play important roles in heavy metals stress (Baxter, 2010).

Studies of ionomics focusing on alterations in ionoma as a response to heavy metals treatments have made important contributions to our knowledge of the participation of mineral nutrients in heavy metal tolerance. It has accordingly been established that the effects of heavy metals on ionomes can be direct (changes in nutrient level or impairment of ion transport) or indirect (changes in cell wall structure).

With respect to transcriptomics, it should be clear that any kind of stress induces the expression of a set of genes that determine the plant's responses that confer stress tolerance (Nakashima

Table 1 Transcription factors (TFs) involved in heavy metal tolerance

TF	TF family	Source	ITM related	References
WRKY 6	WRKY	<i>A. thaliana</i>	As	Castrillo <i>et al.</i> (2013)
WRKY 22, 25 and 29	WRKY	<i>A. thaliana</i>	Cd and Cu	Opdenakker <i>et al.</i> (2012)
OXS2	C2-H2 Z1'	<i>A. thaliana</i>	Cd	Blanvillain <i>et al.</i> (2011)
STOP1	C2-H2 ZF	<i>A. thaliana</i>	Al	Iuchi <i>et al.</i> (2007)
bHLH38 and 39	bHLH	<i>A. thaliana</i>	Cd and Fe	Wu <i>et al.</i> (2012)
PYF	bHLH	<i>A. thaliana</i>	Fe	Long <i>et al.</i> (2010)
bHLH100	bHLH	<i>A. thaliana</i>	Zn and Fe	Van de Mortel <i>et al.</i> (2006)
ACE1		<i>A. thaliana</i>	Cu	Xu <i>et al.</i> (2009)
Hsf1	HSF	<i>A. muricata</i>	Cd	Herbette <i>et al.</i> (2006)
WRKY 45	WRKY	<i>A. muricata</i>	Zn and Fe	Van de Mortel <i>et al.</i> (2006)
OSISAP1	Zinc-finger protein	<i>N. tabacum</i>	Ca, Cd, Cu, Li and Zn	Mukhopadhyay <i>et al.</i> (2004)
ART1	C2-H2	<i>O. sativa</i>	Al	Yamaji <i>et al.</i> (2009)
ASR5		<i>O. sativa</i>	Al	Arenhart <i>et al.</i> (2013)
HsfA4a	HSF	<i>O. sativa</i>	Cd	Shim <i>et al.</i> (2009)
ACP1	AP2/EREBP	<i>P. patens</i>	Cd and Cu	Cho <i>et al.</i> (2007)
CaDF1	AP2/EREBP	<i>P. virginiana</i>	Cd, Cu and Zn	Tang <i>et al.</i> (2005)
	MYB, bHLH, bZIP	<i>S. alfredii</i>	Cd	Gao <i>et al.</i> (2013)

Adapted from Singh *et al.* (2016) ©Frontiers in Plant Science published under the CC-BY 4.0 licence.

et al., 2009; Tran *et al.*, 2010). A transcriptome analysis of a plant exposed to heavy metals stress reveals that this treatment induces the expression of several TFs, which in turn regulate several processes involved in heavy metal responses (Liang *et al.*, 2013). A list of TFs already involved in heavy metals tolerance is included in Table 1. See also: [Transcriptional Profiling in Plants](#)

Proteomics has also been used to compare variations in plant protein profiles under heavy metal stress (Ahsan *et al.*, 2009). On the basis of a comparison of the results of studies of heavy metal plant responses with transcriptomics and proteomics strategies, it is clear that gene expression changes are not always reflected on the protein level as posttranscriptional, translational and post-translational modification. Protein stability and localization and protein-protein interactions are determinants of a final protein function (Hossain and Komatsu, 2013; Dalcorso *et al.*, 2013). It is well established that several proteins act directly in plant adaptation to heavy metals stress (Kosová *et al.*, 2011). Under heavy metals stress, defence proteins and molecular chaperones play important functions for scavenging ROS and reestablishing functional protein conformation, respectively (Zhao, 2016; Sharmin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). However, housekeeping metabolic pathways such as photosynthesis, respiration and nitrogen metabolism are also altered (Hossain and Komatsu, 2013). Therefore, determining changes in the protein profile in response to heavy metals will be very useful for eventually understanding the mechanisms behind the tolerance to this type of stress. Such knowledge would result in proper approach for their control and management. Proteomic analysis has been made not only in plants whose consumption is regional, such as *Sauceda salsa*, growing in some intertidal zones of the Yellow River Delta severely contaminated with mercury, but also on plants cultivated and consumed worldwide as rice and maize exposed to high levels of mercury and chromium, respectively (Chen *et al.*, 2012;

Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). In each of these studies were identified proteins previously associated with turn-on biological processes to contend with the stress caused by heavy metals, as well as, proteins that cannot be directly related to the mechanism of heavy metal tolerance. In any case, that experimental data provide new insights that in the coming will facilitate understanding the molecular and physiological mechanisms underlying heavy metal stress in plants. See also: [Protein Characterisation in Proteomics](#)

Among the strategies to genomic scale used to study the mechanism of heavy metal tolerance, also deserves mention the Genome Wide Association (GWA) mapping. GWA allows the study of how the different alleles of a gene were selected in natural populations to adapt to a particular environmental condition and already it has been successfully used in *A. thaliana*, rice and maize for the identification of quantitative trait locus (QTL) and candidate genes for various ecological and agricultural traits (Korte and Farlow, 2013). Recently, GWA mapping, complemented with fine mapping and transgenic complementation, were successfully used to reveal that the Heavy Metal Associated3 gene (HMA3, a tonoplast localised ATPase3) is the principal genetic determinant of natural tolerance to multiple heavy metals including cadmium, zinc, cobalt and lead (Chao, *et al.*, 2012). See also: [Plant Quantitative Traits; Natural Variation as a Tool for Gene Identification in Plants; Genome-wide Association Studies: The Success, Failure and Future](#)

Concluding Remarks

In the last century, the extensive industrial use of metals has resulted in serious environmental pollution, which has exerted significant selective pressure on plants giving rise to new metabolic interactions with metal. Detailed knowledge of novel

metabolic interactions of plants with metals can be used to develop strategies for recuperation of soil and aquifers contaminated with heavy metals via a process called bioremediation. Some metals can be transformed to a less soluble and less toxic state via reduction (e.g. Se(VI), Cr(VI) and U(VI)) or oxidation (e.g. As(III)). For example, monovalent and cationic metals such as Cu(II), Pb(II) and Cd(II) can be extracted from soil and sediments via hyperaccumulator plants. When several environments are cocontaminated by different metals, for example salts of copper–chromium–arsenic, it is necessary to develop integral strategies that include the use of plants to perform effective bioremediation. **See also: Bioremediation**

On the other hand, pollution of the environment has had a negative impact on public health and food safety and water demands. In this article, some experimental strategies used by living organisms were described to address this serious problem. In the near future, novel 'omics' experimental strategies should make important contributions to addressing pollution problems that limit increasing agricultural productivity in a world with a constantly growing population and demand for food.

References

- Ahsan N, Renaut J and Komatsu S (2009) Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metal. *Proteomics* 9: 2602–2621.
- Alford LA, Pilon-Smits HAH and Paschke MW (2010) Metallophytes – a view from the rhizosphere. *Plant and Soil* 337: 33–50.
- Arbona V, Manzi M, Ollas CD and Goncz-Cadenao A (2013) Metabolites as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Science* 14: 4885–4911.
- Arenhart RA, De Lima JC, Pedron M, et al. (2013) Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant Cell Environment* 36: 52–67.
- Baxter I (2010) Ionomics: the functional genomics of elements. *Briefings in Functional Genomics* 9: 149–156.
- Blanvillain R, Wei S, Wei P, Kim JH and Ow DW (2011) Stress tolerance to stress escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family. *EMBO Journal* 30: 3812–3822.
- Bothe H (2011) Plants in heavy metal soil. In: Sherameti I and Varma A (eds) *Detoxification of Heavy Metals*, vol. 30, pp. 35–57. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Broadley MR, White P, Hammond JP, Zelko I and Lux A (2007) Zinc in plants. *New Phytologist* 173: 677–702.
- Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, et al. (2013) WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 2944–2957.
- Chao D-Y, Silva A, Baxter I, et al. (2012) Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 8: e1002923.
- Chen YA, Chi WC, Huang TL, et al. (2012) Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 23–32.
- Chipeng FK, Hermans C, Collinet G, et al. (2010) Copper tolerance in the eucalypt *Haumaniastrum katangense* (S. Moore) P.A. Duvign. & Plancke. *Plant and Soil* 328: 235–244.
- Cho SH, Hoang Q, Phee JW, et al. (2007) Modified suppression subtractive hybridization identifies an AP2-containing protein involved in metal responses in *Physcomitrella patens*. *Molecular Cells* 23: 100–107.
- Clemens S, Deinlein U, Ahmadi H, Hübner S and Uraguchi S (2013) Nicotianamine is a major player in plant Zn homeostasis. *Biometals* 26: 623–632.
- Cobbett C and Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Reviews in Plant Biology* 53: 159–182.
- Dalcorso G, Fasani E and Furini A (2013) Recent advances in the analysis of metal hyperaccumulation and hypertolerance in plants using proteomics. *Frontiers in Plant Science* 4: 280.
- Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, et al. (2002) Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology* 20: 1140–1145.
- Falkowski PG, Fenchel T and DeLong EF (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034–1039.
- Fernando DR, Woodrow IE, Jaffré T, et al. (2008) Foliar manganese accumulation by *Maytenus foenaria* (Celastraceae) in its native New Caledonian habitats: populational variation and localization by X ray microanalysis. *New Phytologist* 177: 178–185.
- Gao J, Sun L, Yang X and Liu JX (2013) Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *PLoS ONE* 8: e64643.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, et al. (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochemistry* 88: 1751–1765.
- Hossain Z and Komatsu S (2013) Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in Plant Science* 3: 310.
- Ingle RA, Smith JA and Sweetlove LJ (2005) Responses to nickel in the proteome of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Biometals* 18: 627–641.
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, et al. (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9900–9905.
- Jhee EM, Boyd RS and Eubanks MD (2006) Effectiveness of metal-metal and metal-organic compound combinations against *Plutella xylostella*: implications for plant elemental defense. *Journal of Chemical Ecology* 32: 239–259.
- Kabala K, Janicka-Russak M, Burzyński M and Kłobus G (2008) Comparison of heavy metal effect on the proton pumps of plasma membrane and tonoplast in cucumber root cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 278–288.
- Korte A and Varlow A (2013) The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* 9: 29.
- Krämer U, Colter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM and Smith C (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635–638.
- Kosová K, Vitámvás P, Prášil H and Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 74: 1301–1322.
- Krämer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 517–534.
- Liu X, Wu H, Ji C, et al. (2013) An integrated proteomic and metabolomic study on the chronic effects of mercury in *Suaeda salsa* under an environmentally relevant salinity. *PLoS One* 8: e64041 (13 pp).

- Liang WJ, Li L, Zhang Y, *et al.* (2013) Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of OsAQIP, a rice aquaporin gene. *Plant Growth Regulation* **69**: 21–27.
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, *et al.* (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **22**: 2219–2236.
- Malaisse F (1983) Phytogeography of the copper and cobalt flora of Upper Shaba, Zaïre, with emphasis on its endemism, origin and evolution mechanisms. *Bohemia* **14**: 173–180.
- Massa N, Andreucci V, Poli M, *et al.* (2010) Screening for heavy metal accumulators amongst autochthonous plants in a polluted site in Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 1988–1997.
- Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, *et al.* (2008) Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant Journal* **54**: 249–259.
- Morel M, Crouzet J, Grivot A, *et al.* (2009) AtHMA3, a PIB-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**: 894–904.
- Morat P, Jaffré T, Veillon JM and Mackee HS (1986) Affinités floristiques et considérations sur l'origine des maquis miniers de la nouvelle calédonie. *Adansonia* **2**: 133–182.
- van de Mortel JJ, Villanueva LA, Schat H, *et al.* (2006) Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **142**: 1127–1134.
- Mukhopadhyay A, Vij S and Tyagi AK (2004) Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6309–6314.
- Nakashima K, Ito Y and Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* **149**: 88–95.
- Opdenakker K, Remans T, Keunen E, Vangronsveld J and Cuypers A (2012) Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAP kinase transcript levels. *Environmental Experimental Botany* **83**: 53–61.
- Ouelhadj A, Kaminski M, Mittag M and Humbeck K (2007) Receptor-like protein kinase HlvisMR1 of barley (*Hordeum vulgare* L.) is induced during leaf senescence and heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1381–1396.
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, *et al.* (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* **47**: 339–347.
- Shamim SA, Alam I, Kim KH, *et al.* (2012) Chromium-induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Science* **187**: 113–126.
- Shim D, Hwang JU, Lee J, *et al.* (2009) Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* **21**: 4031–4043.
- Siripornadulsil S, Traina S, Verma DP and Sayre RT (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14**: 2837–2847.
- Talke IN, Hanikenne M and Krämer U (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* **142**: 148–167.
- Tang W, Charles TM and Newton RJ (2005) Overexpression of the pepper transcription factor CaPT1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Molecular Biology* **59**: 603–617.
- Tran LSP, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2010) Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops* **1**: 32–39.
- Verbruggen N, Hermans C and Schat H (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759–776.
- Wang Y, Hu H, Zhu LY and Li XX (2012) Response to nickel in the proteome of the metal accumulator plant *Brassica juncea*. *Journal of Plant Interactions* **7**: 230–237.
- Wang R, Gao F, Guo BQ, *et al.* (2013) Short-term chromium-stress-induced alterations in the maize leaf proteome. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 11125–11144.
- Wu H, Liao B, Wang SL, Zhang J and Li JT. (2010) Pb and Zn accumulation in a Cd hyperaccumulator (*Viola baoshanensis*). *International Journal of Phytoremediation* **12**: 574–585.
- Wu H, Chen C, Du J, *et al.* (2012) Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in Arabidopsis-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots. *Plant Physiology* **158**: 790–800.
- Xu J, Tian YS, Peng RH, *et al.* (2009) Yeast copper-dependent transcription factor ACE1 enhanced copper stress tolerance in Arabidopsis. *BMB Report* **42**: 752–757.
- Yamaji N, Huang CF, Nagao S, *et al.* (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **21**: 3339–3349.
- Zhao H (2016) A novel pathway of arsenate detoxification. *Molecular Microbiology* **100**: 928–930.

Further Reading

- Emanverdian A, Ding Y, Mokherdorian F and Xie Y (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal* **2015**: 18 pp.
- Gall JL, Boyd RS and Rajakaruna N (2015) Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**: 201 (21 pp).
- Madsen EL (2011) Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 456–464.
- Sade H, Meriga B, Surapu V, *et al.* (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *Biomaterials* **29**: 187–210.
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP and Prasad SM (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1143(36pp).
- Thakur S, Singh L, Walid ZA, *et al.* (2016) Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environmental Monitoring and Assessment* **188**: 206 (11pp).