

RESEÑA ANALÍTICA

# Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación

**Jeannette Marrero-Coto, Arelys Díaz-Valdivia y Orquídea Coto-Pérez.**

Laboratorio de Biotecnología de los Metales, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, calle 25 entre calles J e I El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: jean@fbio.uh.cu

Recibido: 21 de marzo de 2009.

Aceptado: 20 de julio de 2009.

Palabras clave: metales pesados, resistencia, determinantes genéticos, biorremediación.  
Key words: heavy metal, resistance, genetic determinants, bioremediation.

**RESUMEN.** La diseminación de metales pesados en sedimentos superficiales y aguas subterráneas aún constituye un problema mundial y su solución es un reto para el saneamiento ambiental. Algunos metales pesados son nutrientes traza esenciales para las bacterias, pero en concentraciones micro o milimolares resultan tóxicos. Una de las características que distinguen a estos elementos de los contaminantes orgánicos, es que no son biodegradables por lo que representan una amenaza para todos los organismos. Solo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos. En la actualidad, el tratamiento de los residuos que contienen metales se realiza fundamentalmente por métodos físico químicos, que son complicados, de elevados costos, con una baja eficiencia y presentan desventajas no solo económicas, sino también, ambientales, al permitir la liberación de grandes volúmenes de desechos líquidos y sólidos que aún presentan elevados contenidos de metales pesados. Existen evidencias de procesos de saneamiento económicamente viables basados en la utilización de microorganismos. Sin embargo, muchos aspectos de la interacción microorganismo – metal son aún desconocidos y su aplicación requiere de un conocimiento profundo de las vías genéticas que codifican la resistencia y biotransformación desarrollada por los organismos que integran la comunidad microbiana autóctona de esos ecosistemas. El objetivo de este artículo es revisar los mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados descritos en las bacterias, así como sus aplicaciones en la biorremediación.

**ABSTRACT.** Heavy-metal dissemination in superficial sediments and subground water is considered as a worldwide problem and its solution constitutes a challenge for the environmental cleaning-up. Several heavy-metals are essential nutrients required in trace concentrations for bacteria (range of nanomolar); however they are toxic in concentrations higher than micromolar. Heavy metals are considered as a biological threat for microorganisms because these elements are not biodegradable, contrary to organic pollutants. Only microorganisms encoding heavy metal resistance genetic determinants are able to survive in environments with high concentrations of these elements. Currently, heavy metals containing wastes are treated basically by chemical and physical methods but these are complicated, expensive and their efficiency is low. Release of great volumes of liquid and solid wastes which still contain high amounts of heavy metals is another of the disadvantages of the aforementioned methods. Bioremediation of effluents and waste waters using heavy metal resistant microorganisms based technologies may provide an alternative for environmental protection. Microorganisms might be effective metal accumulators and evidences support that the biomass-based clean-up processes are economically viable. However, many aspects of metal-microbe interactions remain unknown and unexploited in biotechnology. The application of bioremediation processes required a deeper knowledge of the biotransformation pathways and genetic determinants encoded by organisms from indigenous microbial communities of these ecosystems. The aim of this paper is to review the molecular mechanisms of heavy metal resistance described in bacteria and their applications in bioremediation.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental con metales pesados constituye un creciente problema mundial. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables. Solo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos. Los microorganismos resistentes a metales pesados presentan potencialidades para el diseño de tecnologías aplicables en el campo de la biorremedia-

ción de ambientes contaminados. Este tema es de gran importancia para Cuba porque la industria niquelífera, segundo reglón de la economía cubana, genera grandes volúmenes de residuos contaminantes que se acumulan diariamente y que contienen cantidades apreciables de metales aún utilizables.

Los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados presentan gran importancia desde el punto de vista de la biotecnología ambiental o biorremediación y existen tres áreas fundamentales de aplicación: 1) incorporación de los determinantes de resistencia desde un

organismo a otro que sería utilizado en procesos relacionados con metales pesados, 2) en la bioextracción de metales estratégicos, preciosos o radiactivos, directamente desde los minerales o por recobrado de metales desde los efluentes de los procesos industriales y 3) en la restauración de los ambientes contaminados con metales.<sup>1</sup> Las aplicaciones industriales de las bacterias resistentes a metales o sus genes incluyen el uso de biosensores para el control y seguimiento de la concentración de estos elementos en una gran variedad de sustratos y suelos,<sup>2,3</sup> el desarrollo de biorreactores para extraer o eliminar metales pesados desde efluentes contaminados o suelos,<sup>4,5</sup> bioaumentación<sup>6</sup> y fitorremediación.<sup>7</sup>

Los metales pesados no pueden ser degradados cuando se cambia el estado de oxidación, como ocurre con los compuestos orgánicos tóxicos. Existen sólo tres mecanismos a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a metales pesados: (i) disminución de la acumulación de un determinado ión mediante su transporte activo fuera de la célula; (ii) segregación de los cationes por moléculas que contienen grupos tioles; (iii) reducción de algunos iones metálicos pesados a un estado de oxidación menos tóxico.<sup>8-11</sup> Sin embargo, (ii) y (iii) no pueden funcionar como mecanismos de detoxificación únicos en una célula. Por consiguiente, el “metabolismo” de los metales pesados es llevado a cabo fundamentalmente por un “metabolismo” de transporte o en última instancia por una combinación de mecanismos.

Los suelos de serpentina o ultramáficos contienen elevadas cantidades de metales, [especialmente, Ni(II) y Co(II)], bajas concentraciones de elementos como: C, N, P, K(I), Ca(II) y presentan elevada relación Mg(II):Ca(II)<sup>12</sup> por lo que constituyen un sustrato difícil para la colonización y crecimiento de microorganismos. Estos suelos representan un sistema ideal para el estudio de la genética de la adaptación al hábitat y evolución de nuevas ecovariedades microbianas.<sup>13,14</sup>

Este trabajo tuvo como objetivo abordar los aspectos básicos de los mecanismos genéticos de resistencia a metales pesados en bacterias y revisar las interacciones microorganismo – metal y sus aplicaciones potenciales en la biorremediación de ambientes contaminados con metales.

## ORÍGENES DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS

Bajo la denominación de metales pesados se incluye a un conjunto de aproximadamente 65 elementos de la Tabla Periódica, con una densidad mayor o igual a 5 g/cm<sup>3</sup> en su forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Estos presentan diferentes características físicas, químicas y biológicas; se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos.<sup>15</sup>

Los metales suelen concentrarse en el proceso de transformación natural de las rocas durante la formación de los suelos, pero su concentración final no rebasa los umbrales de la toxicidad y se encuentran bajo formas que son muy poco asimilables por los organismos. Sin embargo, la actividad humana ha incrementado su contenido en el medio ambiente de forma accidental o deliberada, por medio de prácticas agrícolas o industriales, como la producción de estaño u otras aleaciones, galvanización de hierro, confección de baterías, tubos de televisores y pigmentos, la industria minera y la lixiviación de depósitos naturales.

Ciertos metales de transición como cobalto, cobre, níquel y cinc, a concentraciones traza (10<sup>-1</sup> mmol/L), son esenciales para algunos procesos celulares, ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas.<sup>16</sup> Sin embargo, a concentraciones superiores ejercen un marcado efecto citotóxico, por lo que el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de ellos constituye un factor importante para lograr la homeostasis celular.<sup>17-19</sup>

La propia célula presenta frecuentemente para un mismo nutriente mecanismos de adquisición y exportación. Esto está bien ilustrado en la bacteria *Escherichia coli* en la cual se han definido al menos dos sistemas de transporte responsables de la adquisición de iones Zn(II)<sup>20,21</sup> y dos para asegurar la exportación de su exceso.<sup>22-25</sup>

Muchas células contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados. Uno es rápido e inespecífico, expresado constitutivamente y utilizado por una variedad de sustratos. Estos sistemas rápidos son generalmente dependientes del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo de sistema de captura posee una gran especificidad de sustrato, es más lento y generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía en adición al gradiente quimiosmótico. Este sistema consumidor de energía solo se induce en la célula cuando esta lo necesita, en condiciones nutricionales desfavorables o en alguna situación metabólica especial.<sup>26</sup> Los cationes metálicos Co(II), Ni(II), Zn(II) y Mn(II), se acumulan rápida e inespecíficamente a través del sistema de captura de magnesio CorA, conocido como sistema de transporte inorgánico de iones metálicos en las bacterias Gram negativas,<sup>27-29</sup> arqueas<sup>30</sup> y *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>31</sup> Además, existen otros mecanismos de transporte específicos para esos iones tales como ATPasas tipo P para el transporte de magnesio que son inducibles, transportadores ABC para el Mn(II), el Zn(II) y el Ni(II) y transportadores quimiosmóticos específicos y lentos de la familia de HoxN para el Ni(II) y el Co(II).<sup>32</sup>

Cuando una célula se enfrenta a grandes concentraciones de algún metal pesado que es acumulado por el sistema inespecífico, el catión del metal pesado es transportado al citoplasma, a pesar de su elevada concentración, porque estos transportadores inespecíficos son expresados constitutivamente. Por consiguiente, esta entrada no puede cerrarse. Esta “puerta abierta” es la primera razón del porqué los iones metálicos pesados son tóxicos.<sup>26</sup> Cuando el gen que codifica este sistema transportador rápido e inespecífico se muta, entonces se obtienen mutantes que son tolerantes a metales. Por ejemplo, los mutantes CorA resultaron tolerantes a Co(II)<sup>33,34</sup> y los mutantes Pit resultaron tolerantes a arsenato.<sup>35</sup>

Una vez dentro de la célula, cuando estos elementos se encuentran en exceso, pueden formar enlaces coordinados con aniones que bloquean grupos funcionales de enzimas, inhibir sistemas de transporte, desplazar metales esenciales desde los sitios nativos de enlace e interrumpir la integridad de la membrana celular.<sup>8</sup> Así, cationes de los metales pesados pueden interactuar con iones fisiológicos: el Cd(II) con el Zn(II) o el Ca(II), el Ni(II) y el Co(II) con el Fe(II), el Zn(II) con el Mg(II), inhibiendo sus funciones en la célula. También tienden a unirse a grupos sulfhidrilo, lo cual origina la inhibición de la actividad de enzimas sensibles,<sup>32</sup> o pueden enlazarse al glutatión (GSH) en las bacterias Gram negativas, y dar lugar a la formación de complejos

que pueden reaccionar con el oxígeno molecular para generar bis-glutationato (GS-SG), el catión del metal y peróxido de hidrógeno.<sup>36</sup> Debido a que la reducción del GS-SG requiere la participación del NADPH y los cationes metálicos se enlazan inmediatamente a otras moléculas de GSH, los cationes de los metales pesados provocan un considerable estrés oxidativo<sup>37-39</sup> que es, en muchos casos, la base de su genotoxicidad.<sup>40,41</sup>

La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en ecosistemas naturales, en adición a su toxicidad potencial y a la situación de "puerta abierta", han conducido durante la evolución de la vida al desarrollo de la homeostasis de metales pesados. Este fenómeno se debe a un proceso de adaptación espontánea al medio, debido al desarrollo o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula.<sup>42</sup> Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal,<sup>43,44</sup> mientras que los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del elemento. Tanto los microorganismos resistentes como los tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden presentar la capacidad de extraer estos contaminantes.<sup>45</sup>

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES

La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares.<sup>46</sup> Otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confirmando la capacidad de resistencia a metales pesados.<sup>8,47</sup> En *Cupriavidus metallidurans* CH34 y *Serratia marcescens* C-1 se han identificado la inducción de genes y sobreexpresión y proteínas relacionados con el estrés oxidativo, en respuesta a elevadas concentraciones de cobre y cobalto, respectivamente.<sup>48,49</sup> Estos son hallazgos pioneros en relación con los mecanismos celulares requeridos para contrarrestar los efectos oxidativos de elevadas concentraciones de metales pesados en el interior celular en bacterias muy resistentes, por lo que constituye un campo aún por investigar. Los sistemas desarrollados por las bacterias para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos son diversos.<sup>9</sup> Entre ellos, se encuentran principalmente los que involucran: i) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, ii) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y iii) transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular.<sup>10,32</sup>

### Captura de iones en la célula bacteriana

La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior celular. En ella intervienen polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura (bioabsorción)<sup>50</sup> o proteínas que se unen a los iones metálicos por los que poseen una gran afinidad,

evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo.<sup>51</sup>

Entre las proteínas periplasmáticas que capturan metales se han descrito la proteína de unión a plata SilE<sup>52</sup> y las de unión a cobre, como el sistema CopABCD<sup>53</sup> y la proteína CopH.<sup>54</sup> La chaperona CopZ<sup>55,56</sup> y la metalotio-neína SmtA,<sup>9,57</sup> funcionan como captoras de metales en el citoplasma celular.

Algunos ejemplos del secuestro de metales en el citosol resultan muy interesantes, como es el caso de la acumulación de uranio por *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado solamente en el citoplasma, al igual que en la levadura *S. cerevisiae*.<sup>58</sup>

### Transformaciones mediadas por enzimas

Entre las transformaciones enzimáticas de los metales se incluyen la oxidación, reducción, metilación y demetilación,<sup>9</sup> y estas pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles.

La detoxificación por reducción requiere que el potencial redox del metal pesado se encuentre entre el potencial redox de la pareja  $H_2/H^+$  (-421 mV) y el potencial redox de la pareja  $O_2/H_2$  (+808 mV) [calculado a partir de Weast (1984) a 30 °C y pH 7,0], que constituye el intervalo redox fisiológico para muchas células aerobias. De esta manera, por ejemplo, el Hg(II) (+430 mV), el arseniato [As(V)] (+139 mV) y el Cu(II) (+268 mV), pueden ser reducidos por la célula, pero no así el Zn(II) (-1.18 V), el Cd(II) (-824 mV), el Co(II) (-701 mV) y el Ni(II) (-678 mV).<sup>32</sup> Si un metal pesado no puede ser reducido por las vías celulares o su reducción no es conveniente, entonces el metal puede ser acomplejado o transportado al exterior celular, o pueden suceder ambos eventos.

La reducción del Hg(II) a su forma volátil menos tóxica Hg<sup>0</sup>, por la enzima citoplasmática mercurio reductasa (junto a la enzima organomercurio liasa en el caso de los compuestos organomercuriales), ha sido la más estudiada debido a la importancia de ese elemento como contaminante ambiental y al papel primordial de los microorganismos dentro del ciclo biogeoquímico del mercurio.<sup>59</sup>

La enzima cromato reductasa elimina la toxicidad del Cr(VI) al reducirlo a Cr(III), disminuyendo su solubilidad<sup>46,60,61</sup> y se encuentra muy bien caracterizada en *Pseudomonas ambigua*. Además, se conoce que otras reductasas celulares pueden también llevar a cabo la reducción del cromato, como la DT-diaforasa,<sup>62</sup> aldehído oxidasa,<sup>63</sup> el citocromo P450<sup>64</sup> y algunas nitrorreductasas.<sup>40</sup>

Algunos sistemas de eflujo activo de iones tóxicos, incluyen la transformación enzimática mayormente por mecanismos redox.<sup>17</sup> Tal es el caso de la proteína ArsC, involucrada en el mecanismo de resistencia a arsénico en bacterias. Esta es una reductasa que convierte el ion arseniato [As(V)] a arsenito [As(III)],<sup>65</sup> que constituye el sustrato del sistema de eflujo de este ion. También se ha descrito la enzima arsenito oxidasa codificada por los genes *aso*, que funciona como donante primario de electrones en el mecanismo de resistencia a arsenito en aerobiosis<sup>9</sup> y la enzima multicobre oxidasa, CueO, que protege las enzimas periplasmáticas del daño por unión a este metal en *E. coli*.<sup>25,66</sup>

### Expulsión de iones metálicos

La mayoría de los sistemas de resistencia a metales se basan en el eflujo activo de iones tóxicos tales como los que expulsan iones derivados del cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y cinc.<sup>67</sup> En este proceso intervienen fundamentalmente tres sistemas diferentes: los

facilitadores de difusión de cationes (CDF, por sus siglas en inglés: *Cation diffusion facilitator*), las ATPasas tipo P y los transportadores compuestos por miembros de la familia de resistencia, nodulación, división celular (RND, por sus siglas en inglés: *resistance, nodulation, cell division*) (Fig. 1). Estos aparecen en una gran variedad de bacterias resistentes a metales pesados,<sup>68</sup> donde conforman una red muy eficiente que asegura la homeostasis celular y garantiza la supervivencia en ecosistemas con elevadas concentraciones de metales.<sup>69</sup>

**ATPasas tipo P.** Las ATPasas tipo P son la defensa básica contra cationes de metales pesados. Estas ATPasas constituyen una familia de proteínas de transporte que son dirigidas por la hidrólisis del ATP. Los miembros de esta familia se presentan en los tres dominios de la vida.<sup>10</sup> Sus sustratos son cationes inorgánicos tales como el H(I), el Na(I), el K(I), el Mg(II), el Ca(II), el Cu(I), la Ag(I), el Zn(II) y el Cd(II).<sup>70</sup> Una ATPasa tipo P individual importa su sustrato desde el exterior o desde el periplasma al citoplasma (ATPasa tipo P importadora) o lo exporta desde el citoplasma al periplasma (ATPasa tipo P exportadora). Respecto a la homeostasis de metales pesados, este tipo de transportadores pueden ser importantes por dos razones: primero, los sistemas de importación de macroelementos como el del Mg(II) pueden también importar metales pesados y segundo, las ATPasas tipo P exportadoras pueden detoxificar los cationes de metales pesados a través de su eflujo.

En bacterias, la ATPasa tipo P más estudiada es la proteína CadA codificada en el plásmido *pI258* de *Staphylococcus aureus*.<sup>71</sup> En el genoma de *C. metallidurans* CH34, es notable la presencia de genes que codifican para 10 ATPasas tipo P que, en conjunto, participan en la homeostasis o en la resistencia a cadmio, cobre, plomo y cinc.<sup>68</sup>

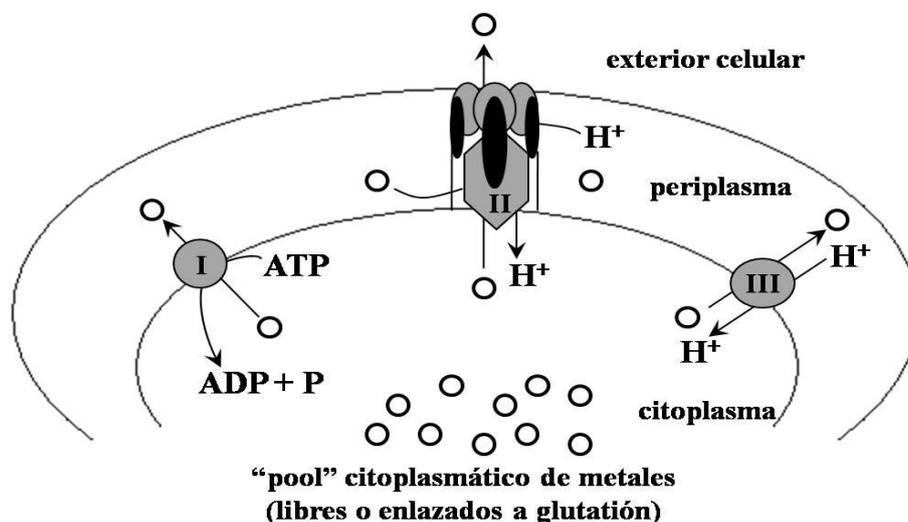
**Transportadores de la familia RND.** La familia de proteínas RND fue primero descrita como un grupo de proteínas de transporte bacteriano involucrado en la resistencia a metales pesados (*C. metallidurans*), nodulación (*Mesorhizobium loti*) y división celular (*E. coli*).<sup>72</sup> Actualmente, constituye una enorme familia que incluye siete familias de proteínas que pueden ser encontradas en los principales reinos de la vida.<sup>73</sup> En bacterias y arqueas, los miembros de esta familia están involucrados en el transporte de metales pesados, com-

puestos hidrofóbicos, anfífilicos y factores de nodulación y en la excreción de proteínas (SecDF). En eucariontes, los miembros de la familia RND transportan esteroides o sirven como receptores.<sup>74-76</sup>

Adyacentes al gen que codifica una proteína RND se ubica, por lo general, un segundo gen que codifica para un miembro de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP, siglas en inglés: *membrane fusion protein*).<sup>72</sup> Esta familia ha sido también designada familia de proteínas de exportación periplasmática<sup>77</sup> o familia de proteínas adaptadoras periplasmáticas.<sup>78</sup> Además de la proteína MFP, muchas proteínas RND cooperan con una tercera proteína que pertenece a la familia de factores de membrana externa (OMF, por sus siglas en inglés: *outer membrane factor*).<sup>77,79</sup> Estas tres proteínas forman un complejo que puede exportar sus sustratos desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma a través de la membrana externa directamente al exterior;<sup>80,81</sup> a diferencia de los sistemas de expulsión anteriores, que solo translocan su sustrato al espacio periplasmático. Esta característica hace que sea considerado como el sistema de resistencia a metales de mayor importancia y complejidad en bacterias. El sistema *CzcABC*, codificado en el locus *czc* del plásmido *pMOL30* de *C. metallidurans* CH34, ha sido el ejemplo mejor estudiado de transportadores RND en bacterias resistentes a metales.<sup>24,68,69</sup>

La topología de algunas proteínas RND ha sido investigada mediante la fusión a genes reporteros.<sup>82-84</sup> Son proteínas de más de 1 000 residuos aminoácidos y están compuestas por dos mitades que son probablemente el resultado de una duplicación inicial de genes y una posterior fusión.<sup>72</sup> Cada una contiene un gran lazo periplasmático de alrededor de 300 residuos aminoácidos, que es enmarcado por 12 segmentos  $\alpha$ -hélices de transmembrana, TMH I a TMH XII.

Goldberg *et al.* propusieron un modelo preliminar que explica el posible funcionamiento de las proteínas RND (Fig. 1).<sup>82</sup> Este modelo explica la exportación de cationes citoplasmáticos por los sistemas de exportación RND y puede ser fácilmente adaptado a otras funciones adjudicadas a estas proteínas. No es relevante si los sustratos acceden a los sitios periplasmáticos de unión de sustrato desde el citoplasma [como en el caso del Zn(II)], desde el periplasma [como en el caso del Cu(I)], o desde el interior de la membrana citoplasmática [quizás en el



**Fig. 1.** Prototipos de los principales sistemas de eflujo de iones metálicos. I) ATPasas tipo P, II) sistemas RND y III) facilitadores de difusión (CDF). Tomado de Legatzki *et al.*<sup>69</sup>

caso de los sustratos hidrofóbicos para las proteínas de exportación de compuestos hidrofóbicos y anfífilicos (HAE-RND, por sus siglas en inglés: *hydrophobic and amphiphilic compounds export proteins*).<sup>68</sup>

En todos los casos, un ciclo de protonación/desprotonación se acopla al proceso de unión del sustrato y posteriormente se produce la liberación de este acoplada a la importación de protones mediante una reacción exergónica. Además, la protonación puede fácilmente cambiar el sitio de unión del sustrato de negativamente cargado a neutral (proteínas de eflujo de metales pesados [HME-RND, por sus siglas en inglés: *heavy metal efflux protein family*]) o de hidrofóbico a hidrofílico (proteínas HAE-RND).

**Facilitadores de difusión de cationes.** La familia de CDF funciona como un filtro secundario de cationes en bacterias. Las proteínas CDF forman una familia de transportadores (TC 2.A.4.1.2)<sup>65</sup> que están presentes en los tres reinos del árbol de la vida: Archaea, Bacteria y Eucaria.<sup>79</sup> El sustrato primario de las proteínas CDF es el ion Zn(II) y también pudieran transportar los iones Co(II), Ni(II), Fe(II) y Cd(II).<sup>86</sup> El transporte mediado por los CDF es dirigido por un gradiente de concentración quimiosmótico,  $\Delta\psi$ , de pH o de potasio.<sup>87,88</sup>

Todas las proteínas CDF que se han estudiado hasta el momento en las bacterias están involucradas en la resistencia a Zn(II) y otros cationes de metales pesados. El arquetipo de la familia, CzcD de *C. metallidurans* CH34, se describió inicialmente como un regulador de la expresión del sistema de alta resistencia CzcABC,<sup>82</sup> pero también confiere un grado pequeño de resistencia a Zn(II)/Co(II)/Cd(II) en ausencia del sistema de gran resistencia CzcABC.<sup>88</sup> La presencia de CzcD disminuye la concentración citoplasmática de estos metales<sup>88</sup> que sirven como inductores de la expresión de los genes *czc*.<sup>89</sup>

Usualmente las bacterias contienen muy pocos genes que codifican CDF. En eucariontes, el número de genes que codifican CDF aumenta en paralelo con la evolución desde levaduras a plantas y animales.<sup>8</sup>

Otros sistemas de exportación de metales pesados: familia de proteínas CHR, NreB, CnrT

Estos tres sistemas están asociados a los determinantes de resistencia que permiten a una bacteria sobrevivir en ambientes específicos de serpentina ricos en níquel, cobalto y cromato.<sup>90</sup> Las proteínas similares a ChrA de la familia de proteínas CHR<sup>91</sup> detoxifican el anión cromato mediante su expulsión del citoplasma en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria.<sup>92</sup> Este sistema se ha identificado en plasmidios de *P. aeruginosa* y de *C. metallidurans*.<sup>61</sup> NreB y CnrT son sistemas de exportación de níquel. CnrT es un probable transportador de metales y su gen se encuentra ubicado adyacente al determinante genético *cnrABC* de resistencia a níquel, cobalto y cadmio.<sup>93</sup>

El locus *nre* codifica el transportador NreB y se puede encontrar adyacente al determinante *ncc* en *Achromobacter xylosoxidans* 31a<sup>94</sup> o como parte del determinante *ncr* en enterobacterias.<sup>95</sup> El sistema NreB del tipo *ncc-nre* confiere un bajo nivel de resistencia a níquel en cepas de *Ralstonia* sp. y *E. coli*.<sup>96</sup> Este locus fue descrito por Grass *et al.*<sup>94</sup> como el primer ejemplo de la familia MFS (MFS, por sus siglas en inglés: *major facilitator superfamily*) que cataliza el transporte de iones metálicos acoplado a un gradiente quimiosmótico. Recientemente, se ha descrito la presencia del determinante *ncrABC* de resistencia a níquel y cobalto en *Klebsiella oxytoca* CCUG 15788<sup>97</sup> (NCBI: AY492000), *Hafnia alvei* 5-5,<sup>98</sup> *Serratia marcescens* C-1<sup>49,99</sup> y *Leptospirillum ferrophilum*

UBK03.<sup>100</sup> Este determinante codifica las proteínas NcrA, NcrB y NcrC siendo NcrA una proteína del tipo NreB y componente central de transporte de níquel y cobalto. NcrC de *S. marcescens* C-1 es una proteína de captura de cobalto y níquel por lo que esta capacidad pudiera ser aplicada en el diseño de sistemas de bioacumulación para el saneamiento de sitios contaminados con estos metales pesados.<sup>99</sup>

## DETERMINANTES DE RESISTENCIA A METALES PESADOS Y SU LOCALIZACIÓN GENÉTICA

Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plasmidios o transposones o en ambos (Tabla 1).<sup>101,102</sup>

Los determinantes plasmídicos que confieren resistencia a metales, poseen una gran especificidad, comparable con la que presentan los productos codificados por otros genes que intervienen en el metabolismo celular,<sup>103</sup> y constituyen sistemas inducibles en la mayoría de los casos.<sup>1,104</sup> Hasta el momento, se han descrito genes de resistencia a plata, arsénico, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, antimonio y cinc localizados en plasmidios.<sup>103,105,106</sup> En algunos casos, estos presentan un elevado peso molecular, como los megaplasmidios pMOL28 (163kb) y pMOL30 (238kb) de *C. metallidurans* CH34,<sup>107</sup> y pTOM8 (340kb) y pTOM9 (200kb) de *A. xylosoxidans* 31a<sup>108</sup> (Tabla 1).

Estos hallazgos son de vital importancia ya que los plasmidios generalmente confieren resistencia a elevadas concentraciones de metales<sup>109</sup> y pueden moverse fácilmente de una célula a otra por transmisión horizontal de material genético, de modo que contribuyen considerablemente en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados.<sup>1,110</sup> Los estudios de Smets *et al.*<sup>111</sup> corroboran esta hipótesis, pues demostraron que en comunidades microbianas de sedimentos, la retención o transferencia de plásmidos exógenos se incrementó al aumentar la exposición de estas a concentraciones superiores de metales.

El ejemplo más conocido de determinantes de resistencia a metales localizados en transposones es el locus *mer*<sup>112</sup> presente en los megaplasmidios de *C. metallidurans* (pMOL30 contiene el transposón Tn4380, y pMOL28 contiene el transposón Tn4378), que en ambos casos confieren un bajo nivel de resistencia a mercurio.<sup>42,113</sup>

Los determinantes cromosomales de resistencia a metales (Tabla 1), son en algunos casos muy similares a los plasmídicos, como los que confieren resistencia-Ni(II) de *A. denitrificans* 4a-2, que mostraron una gran homología con los del plasmidio pMOL28 de *C. metallidurans*, al ser transferidos a las cepas conjugantes H16, G29 y AE104.<sup>114</sup> Se ha comprobado que algunos genes de resistencia a metales localizados en el cromosoma pueden complementar a los plasmídicos, como los genes *cadA* y *zntA* del cromosoma de *C. metallidurans*, los cuales codifican ATPasas de tipo P, que contribuyen al eflujo de Zn(II) y Cd(II) llevado a cabo principalmente por el sistema de eflujo *czcABC*, codificado en el plasmidio pMOL30. Otros, como los de resistencia a Ni(II) en *K. oxytoca*, se han clonado en *E. coli* y *Citrobacter freundii*.<sup>115,116</sup>

La existencia de genes de resistencia a metales en el cromosoma, soporta la hipótesis de que este carácter se ha convertido en vital para algunas bacterias. Este fenómeno es muy frecuente en aislamientos realizados en zonas muy contaminadas por largos períodos de

**Tabla 1.** Determinantes genéticos de resistencia a metales en bacterias.

| Determinante genético | Metal al que confiere resistencia | Localización                           | Cepa bacteriana  | Mecanismo involucrado   |
|-----------------------|-----------------------------------|--|--|---|
| ars.                  | As(V), As(III), Sb(III).          | pR773.                                 | <i>E. coli.</i> <sup>117,118</sup>                                 | Reducción enzimática de arseniato a arsenito (ArsC).  |
|                       | arsénico.                         | pI258.                                 | <i>S. aureus.</i> <sup>65,119,120</sup>                            | Expulsión de arsenito y antimonio mediante ATPasa tipo P (ArsA/B).  |
| cad.                  | Cd(II), Zn(II).                   | pI258.                                 | <i>S. aureus.</i> <sup>65,71,119,120</sup>                         | Expulsión mediante ATPasa tipo P (CadA).  |
|                       | Cd(II), Zn(II).                   | Cromosoma.                             | <i>C. metallidurans.</i> <sup>69</sup>                             |   |
| chr.                  | Cr(VI).                           | pMOL28.                                | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>60,121</sup>                    | Eflujo mediante proteína de membrana (ChrA).  |
| cnr.                  | Co(II), Ni(II), Zn(II).           | pMOL28.                                | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>116,122-126</sup>               | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CnrABC). Expulsión mediante transportador tipo CDF (CnrT).  |
| cop.                  | Cu(II).                           | pPT23D.                                | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato.</i> <sup>127,128</sup>           | Oxidación mediante una enzima multicobre oxidasa (CopA).  |
|                       |                                   | Cromosoma.                             | <i>Xanthomonas campestris.</i> <sup>129</sup>                      |   |
|                       |                                   | pMOL30.                                | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>48,130</sup>                    | Expulsión mediante ATPasa tipo P (CopF). Actividad oxidorreductasa (CopI) y multicobre oxidasa (CopA).  |
| czc.                  | Cd(II), Zn(II), Co(II).           | pMOL30.                                | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>24,69,121,123,125,131-133</sup> | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CzcABC). Expulsión mediante transportador tipo CDF (CzcD). Expulsión mediante ATPasa tipo P (CzcP).                       |
| pbr.                  | Pb(II).                           | pMOL30.                                | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>59</sup>                        | Expulsión mediante ATPasa tipo P (PbrA) y captura intracelular (PbrD).  |
| mer.                  | Hg(II).                           | pMOL28. (Tn4378).<br>pMOL30. (Tn4380). | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>113,134</sup>                   | Proteínas de unión periplasmática (MerP), transporte al interior celular (Mer T) y reducción enzimática de Hg (II) a Hg(0) en el citosol (MerA).  |
|                       |                                   | Cromosoma.                             | <i>C. metallidurans</i> CH34. <sup>135</sup>                       |   |
| ncc.                  | Co(II), Ni(II), Cd(II).           | pTOM9.                                 | <i>A. xylosoxydans</i> 31A. <sup>96,114</sup>                      | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(NccABC).  |
|                       | Cd(II), Zn(II), Co(II), Ni(II).   | pGOE2.                                 | <i>C. metallidurans</i> KTO2. <sup>114</sup>                       |   |
| nre.                  | Ni(II).                           | pTOM9.                                 | <i>A. xylosoxydans</i> 31A. <sup>96,114</sup>                      | Eflujo del catión mediante una proteína de la familia MFS (NreB).   |
|                       |                                   | pGOE2.                                 | <i>C. metallidurans</i> KTO2. <sup>114</sup>                       |   |
| nrp.                  | Ni(II).                           | pNi15.                                 | <i>Enterobacter</i> sp. Ni15. <sup>136</sup>                       | Eflujo del catión mediante las proteínas NrpA y NrpB.   |
| sil.                  | Ag(I).                            | pMG101.                                | <i>Salmonella</i> sp. <sup>137,138</sup>                           | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(SilCFBA). Secuestro mediante la proteína periplasmática de unión a plata (SilE). Expulsión mediante ATPasa tipo P (SilP). |
|                       |                                   | pMOL30.                                | <i>C. metallidurans.</i> <sup>47</sup>                             | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(SilCBA).  |
| pco.                  | Cu(II).                           | pRJ1004.                               | <i>E. coli.</i> <sup>139-143</sup>                                 | Captura (PcoE, PcoC) y oxidación (multicobre oxidasa PcoA), mediante proteínas periplasmáticas.   |
| cue.                  | Cu(II).                           | Cromosoma.                             | <i>E. coli.</i> <sup>144,145</sup>                                 | Enzima multicobre oxidasa (CueO). Expulsión mediante ATPasa tipo P (CopA).  |

(Continúa en la página siguiente.)

**Tabla 1** (Continuación de la página anterior.)

| Determinante genético | Metal al que confiere resistencia | Localización | Cepa bacteriana   | Mecanismo involucrado  |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------|---|--|
| <i>znt.</i>           | Zn(II), Co(II).                   | Cromosoma.   | <i>S. aureus</i> . <sup>146</sup>   | Expulsión mediante transportador tipo CDF (RzcB).  |
|                       | Zn(II), Cd(II).                   | Cromosoma.   | <i>C. metalidurans</i> CH34. <sup>69</sup>  | Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA).   |
|                       | Zn(II), Cd(II), Pb(II).           | Cromosoma.   | <i>E. coli</i> . <sup>22</sup>  | Expulsión mediante transportador tipo CDF (ZitB).<br>Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA).  |
| <i>cus.</i>           | Cu(II).                           | Cromosoma.   | <i>C. metalidurans</i> CH34. <sup>68,140</sup>  | Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CusCBA).       |
|                       | Cu(II), Ag(I).                    | Cromosoma.   | <i>E. coli</i> . <sup>147-149</sup>   | Unión del metal a proteínas (CusF).  |
| <i>cup.</i>           | Cu(II).                           | Cromosoma.   | <i>C. metalidurans</i> CH34. <sup>48,130</sup>  | Eflujo mediante ATPasa tipo P (CupA).  |
| <i>nir.</i>           | Ni(II).                           | Cromosoma.   | <i>K. oxytoca</i> CCUG 15788. <sup>97,116</sup> (NCBI: AY492000).   | Eflujo del catión mediante las proteínas NirA (del tipo MFS) y NirC (del tipo RND).            |
| <i>ncr-nre.</i>       | Ni(II), Co(II).                   | Cromosoma.   | <i>H. alvei</i> 5-5. <sup>98</sup><br><i>S. marcescens</i> C-1. <sup>49,99</sup><br><i>L. ferriphilum</i> UBK03. <sup>100</sup> | Eflujo del catión mediante una proteína de la familia MFS (NreB).<br>Captura del metal (NcrC). |

tiempo. En contraste, la resistencia a metales codificada en plasmidios se ha encontrado en bacterias que habitan ecosistemas ocasionalmente contaminados con el metal, por lo que dicho carácter en esos casos, pudiera no ser esencial para los microorganismos,<sup>150</sup> sino que se le otorga un importante valor adaptativo.

#### INTERACCIÓN MICROORGANISMO-METAL Y POSIBLES APLICACIONES

El conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a metales pesados y especialmente, su regulación ha constituido un impulso para la investigación en el campo de la ecología microbiana y en la biotecnología ambiental. Las interacciones metal – microorganismos han sido estudiadas en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objetivo de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos.<sup>58,151</sup> Los microorganismos pueden realizar dos posibles transformaciones que dependen del estado de oxidación del metal y de la especie que esté conformando. La primera corresponde a la movilización del metal (biolixiviación) y la segunda a la inmovilización de este.<sup>45</sup> Las propiedades de los microorganismos resistentes o tolerantes o ambos pueden ser empleadas en mecanismos de inmovilización de metales pesados que incluyen: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimisorción.

En el presente, los efluentes industriales contaminados con metales pesados son tratados principalmente por métodos químicos, tales como: oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico o tecnologías de membrana y recuperación por evaporación. Estos métodos son parcialmente efectivos y su implementación muy costosa, especialmente, cuando las concentraciones de metales son bajas.<sup>152,153</sup> La alternativa del empleo de biosorbentes microbianos para la remoción y recuperación de metales tóxicos a partir

de efluentes industriales resulta un método eficiente y menos costoso, que puede actuar como suplemento o sistema de pulimento para los procesos existentes.<sup>154,155</sup>

La capacidad de remoción de metales de los microorganismos que incluyen bacterias, microalgas y hongos, es superior a la de los métodos convencionales y la adquisición, remoción de los metales puede ser selectiva.<sup>156-158</sup> Las células microbianas pueden también utilizarse con costos muy bajos en procesos de fermentación industriales así como en plantas biológicas de tratamiento de aguas residuales.<sup>159</sup>

En las últimas décadas, la resistencia bacteriana a metales pesados, sus mecanismos y determinantes genéticos, han recibido especial atención debido a que las cepas resistentes pueden utilizarse como una alternativa en la detoxificación de ecosistemas contaminados por estos agentes.<sup>160</sup> Existen tres áreas fundamentales de aplicación de los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados en la Biotecnología: 1) incorporación de los determinantes de resistencia desde un organismo a otro que sería utilizado en bioprocesos relacionados con metales pesados, 2) bioextracción de metales estratégicos, preciosos o radiactivos, directamente desde los minerales o por recobrado de metales desde efluentes de procesos industriales y 3) restauración de ambientes contaminados con metales.<sup>32</sup>

Las aplicaciones industriales de las bacterias resistentes a metales y sus genes, también incluyen el uso de biosensores para el control de la concentración de metales en una gran variedad de sustratos y suelos,<sup>2,3</sup> el desarrollo de biorreactores para remover metales pesados desde efluentes contaminados o suelos,<sup>4,5</sup> bioaumento<sup>6</sup> y fitorremediación.<sup>7</sup> Por ejemplo, una cepa recombinante de *C. metalidurans* CH34 que expresa un gen para una metalotioneína de ratón se utilizó exitosamente para inmovilizar metales en suelos y llevar a cabo su reforestación.<sup>151,161</sup>

Los marcadores de resistencia a metales pesados con un amplio rango de hospederos para su expresión, son útiles para la manipulación genética de cepas de *Pseudomonas* diseñadas para ser liberadas en el medio ambiente.<sup>162</sup> Un amplio rango de expresión del determinante *ncc-nre* fue confirmado por Dong *et al.*,<sup>6</sup> al encontrar resistencia a níquel asociada a la presencia de este en *Comamonas* spp., *Sphingobacterium heparinum*, flavobacterias y en bacterias Gram positivas relacionadas con *Arthrobacter* spp.

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el Cd(II), Cr(II), Pb(II), Ni(II), Zn(II) y Cu(II).<sup>163-165</sup> Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con las disoluciones de los metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, pues no requiere el agregado de nutrientes al sistema porque el microorganismo no requiere de un metabolismo activo. La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de los sistemas acuosos por lo que la biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como por ejemplo, la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados.<sup>166,167</sup>

La bioacumulación es un mecanismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H<sup>+</sup>-ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfidrilos llamadas metalotioneínas (MT) o también puede ser compartimentado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.<sup>58</sup>

Los métodos que se aplican en la actualidad para la remoción de Ni(II) desde residuos líquidos incluyen la biosorción con algas y la precipitación química. Ambos métodos son sensibles a las condiciones ambientales, como: pH, fuerza iónica y la presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos. La biosorción y la precipitación presentan baja especificidad en el enlazamiento a metales y la precipitación química es efectiva solamente en elevadas concentraciones de metales.<sup>168</sup> Por otro lado, las propiedades más importantes de las técnicas de saneamiento de ambientes contaminados con metales mediante el empleo de sistemas biológicos son flexibles para la manipulación de un amplio intervalo de variables físico químicas en los efluentes, la selectividad para remover solamente los metales deseados y la efectividad en los costos.<sup>169</sup> Los organismos modificados genéticamente permiten la introducción en la célula de propiedades útiles para lograr alguno de estos criterios. Este procedimiento ha sido utilizado para la construcción de células con aplicación en la biorremediación de Hg(I).<sup>170</sup>

Un sistema transportador muy específico para Ni(II), NixA, se identificó en *Helicobacter pylori*.<sup>171</sup> El producto del gen *nixA* es una proteína integral de membrana de 37 kDa que consiste de ocho dominios transmembrana que tienen una afinidad elevada para el Ni(II) con una constante de disociación de 11,3 nmol/L.<sup>172</sup> La cepa *Escherichia coli* JM109 fue modificada mediante ingeniería genética para expresar simultáneamente el sistema de transporte de Ni(II) codificado por el gen *nixA*

y sobreexpresar una metalotioneína (MT) de guisante fusionada al extremo carboxilo de la enzima glutatión-S-transferasa.<sup>173</sup> Las MTs son proteínas de unión a metales de bajo peso molecular que poseen abundantes residuos de cisteína en su estructura primaria.<sup>174,175</sup> Estas se encuentran en muchos organismos eucariontes donde se inducen como respuesta a elevadas concentraciones de metales pesados y son capaces de enlazar una variedad de ellos.<sup>57</sup>

## CONCLUSIONES

La presencia de elevadas concentraciones de metales pesados en sitios antropogénicos o ecosistemas naturales, representa una presión selectiva permanente, recalcitrante y ampliamente distribuida, con importancia medioambiental, que ha contribuido al surgimiento y dispersión de nuevos genotipos microbianos que determinan la resistencia a metales. La búsqueda de nuevas cepas microbianas potencialmente resistentes frente a cada vez mayores concentraciones de estas especies tóxicas, ha abierto el camino al descubrimiento de nuevas tecnologías basadas en el empleo de microorganismos resistentes para el saneamiento ambiental. Los determinantes de resistencia a metales poseen un gran número de aplicaciones en este campo, que incluyen el uso de biosensores para el control de las concentraciones de metales pesados en muestras ambientales, la construcción de biorreactores para el recobrado de metales de efluentes contaminados y la descontaminación de los suelos mediante las técnicas de fitorremediación, entre otras.

Por otra parte, el desarrollo vertiginoso en el conocimiento de los genomas de microorganismos resistentes a metales, ha permitido una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que les permiten sobrevivir en estos ecosistemas contaminados a la vez que presupone disponer de herramientas que permitan comprender la relación entre la expresión de los genes involucrados en estos mecanismos y la solución a los problemas biológicos. Aún queda mucho por estudiar en lo referido a la resistencia bacteriana a metales. El conocimiento actual acerca de este tema constituye un punto de partida importante que marca las pautas de las futuras investigaciones, que deberán encaminarse tanto al aislamiento de nuevas cepas autóctonas resistentes a metales en ecosistemas naturales y sitios antropogénicos, como al esclarecimiento de los mecanismos genéticos y moleculares responsables de estas capacidades.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nies DH, Silver S. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;51:730-50.
2. Tibazarwa C, Corbisier P, Mench M, Bossus A, Solda P, Mergeay M, *et al.* A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ Pollut.* 2001;113:19-26.
3. Heijerick DG, Janssen CR, Karlen C, Wallinder IO, Leygraf C. Bioavailability of zinc in runoff water from roofing materials. *Chemosphere.* 2002;47:1073-80.
4. Diels L, van Roy S, Somers K, Willems I, Doyen W, Mergeay M, *et al.* The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *J Membr Sci.* 1995;100:249-58.
5. Diels L, Smet MD, Hooyberghs L, Corbisier P. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol Biotechnol.* 1999;12:149-58.
6. Alisi C, Musella R, Tasso F, Ubaldi C, Manzo S, Cremisini C, Sprocati AR. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci Total Environ.* 2009;407(8):3024-32.

7. Rajkumar M, Vara Prasad MN, Freitas H, Ae N. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit Rev Biotechnol*. 2009;29(2):120-30.
8. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:313-39.
9. Silver S, Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005;32:587-605.
10. Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez IL, Rivera-Cano ME, Avila-Rodríguez M, *et al*. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Lat Microbiol*. 2006;48(2):203-10.
11. Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *BBA-Bioenergetics*. 2005;1706:88-97.
12. Brooks R. *Serpentine and its Vegetation, a Multidisciplinary Approach*. London: Croom Helm; 1987.
13. Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbriellini R, Bazzicalupo M. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ Microbiol*. 2001;3(11):691-8.
14. Moser AM, Petersen CA, D'Allura JA, Southworth D. Comparison of ectomycorrhizas of quercus Garryana (fagaceae) on serpentine and nonserpentine soils in southwestern Oregon. *Amer J Botany*. 2005;92:224-30.
15. Duffus JH. "Heavy metals"—a meaningless term? *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):793-807.
16. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000;45:198-207.
17. Silver S. Genes for all metals. A bacterial view of Periodic Table. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1998;20:1-12.
18. Silver S, Phung LT, Lo JF, Gupta A. Toxic metal resistance: Molecular Biology and the Potential for Bioremediation. *Arab Environ Biotechnol*. 1999;Conference, Abu Dhabi.
19. Van Vliet AHM, Bereswill S, Kusters JG. Ion metabolism and transport. Washington DC: ASM Press; 2001.
20. Patzer SI, Hantke K. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1998;28:1199-210.
21. Patzer SI, Hantke K. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2000;275:24321-32.
22. Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernandez MN, Hughes MN, Poole RK. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the zntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol*. 1997;25:883-91.
23. Beard SJ, Hashim R, Wu G, Binet MR, Hughes MN, Poole RK. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;184:231-5.
24. Rensing CT, Pribyl T, Nies DH. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol*. 1997;179:6871-9.
25. Grass G, Fan B, Rosen BP, Franke S, Nies DH, Rensing C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2001;183:4664-7.
26. Nies DH, Silver S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1995;14:186-99.
27. Smith DL, Tao T, Maguire ME. Membrane topology of a P-type ATPase. The MgtB magnesium transport protein of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*. 1993;268:22469-79.
28. Smith RL, Maguire ME. Distribution of the CorA Mg<sup>2+</sup> transport system in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1995;177:1638-40.
29. Tao T, Snavelly MD, Farr SG, Maguire ME. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: mgtA encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg<sup>2+</sup> in a manner similar to that of the mgtB P-type ATPase. *J Bacteriol*. 1995;177:2654-62.
30. Smith RL, Gottlieb E, Kucharski LM, Maguire ME. Functional similarity between archaeal and bacteria CorA magnesium transporters. *J Bacteriol*. 1998;180:2788-91.
31. MacDiarmid W, Gardner RC. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem*. 1998;273:1727-32.
32. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51:730-50.
33. Bui DM, Gregan J, Jarosch E, Ragnini A, Schweygen RJ. The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 1999;274:20438-43.
34. Pfeiffer J, Guhl J, Waidner B, Kist M, Bereswill S. Magnesium uptake by CorA is essential for viability of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2002;70:3930-4.
35. Rosen BP. Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *J Biol Inorg Chem*. 1996;1:273-7.
36. Kachur AV, Koch CJ, Biaglow JE. Mechanisms of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radical Res*. 1998;28:259-60.
37. Xiang C, Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998;10:1539-50.
38. Dietz KJ, Baier M, Krämer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
39. Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot J, Botton B, *et al*. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Eur J Biochem*. 2001;268:3223-32.
40. Kwak YH, Lee DS, Kim HB. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:4390-5.
41. Luo H, Lu Y, Shi X, Mao Y, Delal NS. Chromium(IV)-mediated Fenton-like reaction causes DNA damage: implication to genotoxicity of chromate. *Ann Clin Lab Sci*. 1996;26:185-91.
42. Trajanovska S, Britz ML, Bhave M. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation*. 1997;8(2):113-4.
43. Silver S, Misra TK. Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. *Basic Life Sci*. 1984;28:23-46.
44. Zegers I, Martins JC, Willem R, Wyns L, Messens J. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nat Struct Biol*. 2001;8:843-7.
45. Rajkumar M, Ma Y, Freitas H. Characterization of metal-resistant plant-growth promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal. *J Basic Microbiol*. 2008;48(6):500-8.
46. Brown SD, Thompson MR, VerBerkmoes NC, Chourey K, Shah M, Zhou J, *et al*. Molecular Dynamics of the *Shewanella oneidensis* Response to Chromate Stress. *Mol Cell Prot*. 2006;5:1054-71.
47. Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, van der Lelie D, *et al*. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *J Bacteriol*. 2007;189(20):7417-25.
48. Mergey M, Monchy S, Vallaeys T, Auquier V, Bentomane A, Bertin P, *et al*. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:385-410.
49. Marrero J, Auling G, Coto O, Nies D. High-Level Resistance to Cobalt and Nickel in Cuban *Serratia marcescens* strains isolated from serpentine deposits. *Adv Mat Res*. 2007;20-21:521-5.
50. Demirbas A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J Hazard Mater*. 2008;157(2-3):220-9.
51. Kanan H. The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 1993;23:79-117.
52. Silver S, Gupta A, Matsui K, Lo JF. Resistance to Ag(I) Cations in Bacteria: Environments, Genes and Proteins. *Metal Based Drugs*. 1999;6(4-5):315-20.

53. Cooksey DA. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;14:381-6.
54. Sendra V, Cannella D, Bersch B, Fieschi F, Ménage S, Lascoux D, *et al.* CopH from *Cupriavidus metallidurans* CH34. A Novel Periplasmic Copper-Binding Protein *Biochem.* 2006;45(17):5557-66.
55. Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M, Dameron C. The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett.* 1999;445:27-30.
56. Solovieva IM, Entian KD. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: the copZ chromosomal gene is involved in cadmium resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(1):115-22.
57. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:267-94.
58. Lovley DR. Environmental Microbe-Metal Interactions. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2000.
59. Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, van der Lelie D. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol.* 2001;183:5651-8.
60. Peitzsch N, Eberz G, Nies DH. *Alcaligenes eutrophus* as a Bacterial Chromate Sensor. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(2):453-8.
61. Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, *et al.* Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25:335-47.
62. De Flora S, Morelli A, Basso C, Romano M, Serra D, De Flora A. Prominent role of DT-diphorase as a cellular mechanism reducing chromium(VI) and reverting its mutagenicity. *Cancer Res.* 1985;45:3188-96.
63. Banks RB, Cooke RTJ. Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;137:8-14.
64. Mikalsen A, Alexander J, Wallin H, Ingelman-Sundberg M, Andersen RA. Reductive metabolism and protein binding of chromium(VI) by P450 protein enzymes. *Carcinogenesis* 1991;12:825-31.
65. Ji G, Garber EA, Armes LG, Chen CM, Fuchs JA, Silver S. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry.* 1994;33:7294-9.
66. Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:902-8.
67. Nies DH. Heavy metal resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles.* 2000;4:77-82.
68. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:313-39.
69. Legatzki A, Franke S, Lucke S, Hoffmann T, Anton A, Neumann D, *et al.* First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation.* 2003;14:153-68.
70. Saier MHJ. Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol Microbiol.* 2003;48:1145-56.
71. Yoon KP, Silver S. A second gene in the *Staphylococcus aureus* cadA cadmium resistance determinant of plasmid pI258. *J Bacteriol.* 1991;173:7636-42.
72. Saier MH, Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol.* 1994;11:841-7.
73. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, *et al.* The RND superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999;1:107-25.
74. Osborne TF, Rosenfeld JM. Related membrane domains in proteins of sterol sensing and cell signaling provide a glimpse of treasures still buried within the dynamic realm of intracellular metabolic regulation. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:137-40.
75. Lange Y, Steck TL. Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8:435-9.
76. Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem.* 1998;70:242-51.
77. Johnson JM, Church GM. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* 1999;287:695-715.
78. Andersen C, Hughes C, Koronakis V. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:412-6.
79. Paulsen IT, Saier MH. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins *J Membr Biol.* 1997;156:99-103.
80. Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol.* 2000;37:219-25.
81. Zgurskaya HI, Nikaido H. Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2000;182:4264-7.
82. Goldberg M, Pribyl T, Juhnke S, Nies DH. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. *J Biol Chem.* 1999;274:26065-70.
83. Guan L, Ehrmann M, Yoneyama H, Nakae T. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA, B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 1999;274:10517-22.
84. Gotoh N, Kusumi T, Tsujimoto H, Wada T, Nishino T. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 1999;458:32-6.
85. Saier MH. A functional-phylogenetic classic cation system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:354-411.
86. Haney CJ, Grass G, Franke S, Rensing C. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005;32:215-26.
87. Bloss T, Clemens S, Nies DH. Characterisation of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta.* 2002;214:783-91.
88. Anton A, Grosse C, Reiman J, Pribyl T, Nies DH. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol.* 1999;181:6876-81.
89. Grosse C, Anton A, Hoffmann T, Franke S, Schleuder G, Nies DH. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter czcNp in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol.* 2004;182:109-18.
90. Baker C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006;14(4):176-82.
91. Nies DH, Koch S, Wachi S, Peitzsch N, Saier MHJ. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive forcedriven transporters probably containing chromate/sulfate transporters. *J Bacteriol.* 1998;180:5799-802.
92. Pimentel BE, Moreno-Sánchez R, Cervantes C. Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;212:249-54.
93. Grass G, Fricke B, Nies DH. Control of Expression of a Periplasmic Nickel Efflux Pump by Periplasmic Nickel Concentrations. *Biomaterials.* 2005;18(4):437-48.
94. Grass G, Fan B, Rosen BP, Lemke K, Schlegel HG, Rensing C. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J Bacteriol.* 2001;183:2803-7.
95. Park J, Young K, Schlegel H, Rhie H, Lee H. Conjugative plasmid mediated inducible nickel resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Int Microbiol.* 2003;6:57-64.
96. Schmidt T, Schlegel HG. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A *J Bacteriol.* 1994;176:7045-54.
97. Park JE, Lee SH. Nucleotide sequence and expression of nickel resistance determinant of genomic DNA from *Klebsiella oxytoca* CCUG 15788 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, accession number AY492000, 2003.

98. Park J, Schlegel H, Rhie H, Lee H. Nucleotide sequence and expression of the *ncr* nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. *Int Microbiol.* 2004;7:27-34.
99. Marrero J. Estudio molecular de la Resistencia a níquel y cobalto en *Serratia marcescens* cepa C-1 Ciudad de La Habana: Universidad de la Habana, Cuba. 2008.
100. Tian J, Wu N, Li J, Liu Y, Guo J, Yao B, *et al.* Nickel-Resistant Determinant from *Leptospirillum ferriphilum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(7):2364-8.
101. Von Rozycki T, Nies DH. Cupriavidus metallidurans: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008. DOI: 10.1007/s10482-008-9284-5
102. Amoroso MJ, Schubert D, Mitscherlich P, Schumann P, Kothe E. Evidence of high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* sp. *J Basic Microbiol.* 2000;40:295-01.
103. Silver S, Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:753-89.
104. Collard J, Provoost A, Taghavi S, Mergeay M. A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance system. *J Bacteriol.* 1993;175:779-84.
105. Silver S, Ji G. Newer systems for bacterial resistance to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspectives.* 1994;102(3):107-13.
106. Shukla OP, Rai UN, Dubey S, Mishra K. Bacterial Resistance: A Tool For Remediation of Toxic Metal Pollutants. *Environ News.* 2006;12(2).
107. Mergeay M, Nies LD, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, van Gijsegem F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. *J Bacteriol.* 1985;162(1):328-34.
108. Schmidt T, Schlegel HG. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. *FEMS Microbiol Ecol.* 1989;62:315-28.
109. Mergeay M. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance *Trends Biotechnol.* 1991;9:17-24.
110. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997;277:1453-74.
111. Smets BF, Morrow JB, Pinedo CA. Plasmid Introduction in Metal-Stressed, Subsurface-Derived Microcosms: Plasmid Fate and Community Response *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(7):4087-97.
112. Kholodii GY, Yurieva OV, Lomovskaya OL, Gorlenko ZM, Mindlin SZ, Nikiforov VG. Tn5053, a mercury resistance transposon with integron ends. *J Mol Biol.* 1993;230:1103-7.
113. Diels L, Faelen M, Mergeay M, Nies D. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistances to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch Int Physiol Biochem.* 1985;93:B27-B8.
114. Schmidt T, Stoppel RD, Schlegel HG. High-level nickel resistance in *Alcaligenes xylosoxydans* 31A and *Alcaligenes eutrophus* KT02. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:3301-9.
115. Stoppel RD, Meyer M, Schlegel HG. The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*: conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. *Biometals.* 1995;8:70-9.
116. Stoppel RD, Schlegel HG. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:2276-85.
117. Chen CM, Misra TK, Silver S, Rosen BP. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem.* 1986;261:15030-8.
118. Gladysheva TB, Oden KL, Rosen BP. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 1994;33:7288-93.
119. Novick RP, Murphy E, Gryczan TJ, Baron E, Edelman I. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. *Plasmid.* 1979;2:109-29.
120. Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3544-8.
121. Nies DH, Silver S. Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J Bacteriol.* 1989;171:4073-5.
122. Siddiqui RA, Benthin K, Schlegel HG. Cloning of pMOL28-encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol.* 1989;171:5071-8.
123. Liesegang H, Lemke K, Siddiqui RA, Schlegel HG. Characterization of the *iducible* nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol.* 1993;175(3):767-78.
124. Nies DH. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes *Plasmid* 1992;27:17-28.
125. Nies DH, Nies A, Chu L, Silver S. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:7351-5.
126. Grass G, Grobe C, Nies DH. Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia* sp. Strain CH34. *J Bacteriol.* 2000;182:1390-8.
127. Mellano MA, Cooksey DA. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* 1988;170:4399-401.
128. Cha JS, Cooksey DA. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8915-9.
129. Cazorla FM, Arrebola E, Sesma A, Pérez-García A, Codina JC, Murillo J, De Vicente A. Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* Strains Isolated from Mango Is Encoded Mainly by Plasmids. *Phytopathology.* 2002;92(8):909-16.
130. Monchy S, Benotmane MA, Wattiez R, van Aelst S, Auquier V, Borremans B, *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of the pMOL30-encoded copper resistance in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Microbiology.* 2006;152:1765-76.
131. Diels L, Dong QH, van der Lelie D, Baeyens W, Mergeay M. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol.* 1995;14:142-53.
132. Nies DH. *CzcR* and *CzcD*, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 1992;174:8102-10.
133. Grobe C, Grass G, Anton A, Franke S, Navarrete A, Lawley B, *et al.* Transcriptional organization of the *czc* heavy metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 1999;181:2385-93.
134. Van Houdt R, Monchy S, Leys N, Mergeay M. New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2009; DOI 10.1007/s10482-009-9345-4.
135. Dressler C, Kües U, Nies DH, Friedrich B. Determinants encoding multiple metal resistance in newly isolated copper-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:3079-85.
136. Lee YK, Chang HH, Lee HJ, Park H, Lee KH, Joe MH. Isolation of a novel plasmid, pNi15, from *Enterobacter* sp. Ni15 containing a nickel resistance gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;257(2):177-81.
137. Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med.* 1999;5:183-8.
138. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:341-53.
139. Lee SM, Grass G, Rensing C, Barrett SR, Yates CJ, Stoyanov JV, *et al.* The *Pco* proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:616-20.
140. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2-3):197-213.
141. Tetaz TJ, Luke RK. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1983;154:1263-8.
142. Silver S, Nucifora G, Phung LT. Human Menkes X-chromosome disease and the staphylococcal cadmium-resistance

- ATPase: a remarkable similarity in protein sequences. *Mol Microbiol.* 1993;10:7-12.
143. Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BTO, Rouch DA. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol.* 1995;17(6):1153-66.
  144. Gatti D, Mitra B, Rosen BP. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem.* 2000;275:34009-12.
  145. Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Cell Biol.* 1999;97(2):652-6.
  146. Xiong A, Jayaswal RK. Molecular Characterization of a Chromosomal Determinant Conferring Resistance to Zinc and Cobalt Ions in *Staphylococcus aureus* J *Bacteriol.* 1998;180(16):4024-9.
  147. Franke S, Grass G, Nies DH. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology.* 2001;147:965-72.
  148. Grass G, Rensing C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183:2145-7.
  149. Munson GP, Lam DL, Outten FW, O'Halloran TV. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 2000;182:5864-71.
  150. Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol.* 2007;53(2):306-16.
  151. De J, Ramaiah N, Vardanyan L. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar Biotechnol (NY).* 2008;10(4):471-7.
  152. Vimala R, Das N. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: a comparative study. *J Hazard Mater.* 2009;168(1):376-82.
  153. Pagnanelli F, Mainelli S, Bornoroni L, Dionisi D, Toro L. Mechanisms of heavy-metal removal by activated sludge. *Chemosphere.* 2009;75(8):1028-34.
  154. Quintelas C, Fernandes B, Castro J, Figueiredo H, Tavares T. Biosorption of Cr(VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon: a comparative study. *J Hazard Mater.* 2008;153(1-2):799-809.
  155. Zheng Y, Fang X, Ye Z, Li Y, Cai W. Biosorption of Cu(II) on extracellular polymers from *Bacillus* sp. F19. *J Environ Sci (China).* 2008;20(11):1288-93.
  156. Li H, Li Z, Liu T, Xiao X, Peng Z, Deng L. A novel technology for biosorption and recovery hexavalent chromium in wastewater by bio-functional magnetic beads. *Bioresour Technol.* 2008;99(14):6271-9.
  157. Deng S, Ting YP. Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high-capacity biosorbent for Cr(VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms. *Environ Sci Technol.* 2005;39(21):8490-6.
  158. Tan KF, Chu KH, Gupta BS, Hashim MA. Studies on fixed-bed biosorption and elution of copper using polyvinyl alcohol-immobilized seaweed biomass. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2002;37(9):1621-32.
  159. Chen C, Wang JL. Characteristics of Zn<sup>2+</sup> biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Environ Sci.* 2007;20(6):478-82.
  160. Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol.* 2000;41:151-6.
  161. Valls M, Atrian S, de Lorenzo V, Fernandez LA. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol.* 2000;18:661-5.
  162. Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC, Vásquez CC. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):820-32.
  163. Gadd GM. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *The Science of The Total Environment.* 2000;258(1-2):119-27.
  164. Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere.* 2002;48(4):427-35.
  165. Tangaromsuk J, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Upatham ES. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass *Biores Technol.* 2002;85(1):103-5.
  166. McEldowney S. The Impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000;33:121-8.
  167. Lebeau T, Bagoth D, Jézéquila K, Fabrea B. Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of The Total Environment.* 2002;291(1-3):73-83.
  168. Baudet C, Dennis Sprott GD, Patel GB. Adsorption and uptake of nickel in *Methanothrix concilii*. *Archives of Microbiology.* 1988;150(4):338-42.
  169. Bijmans MF, van Helvoort PJ, Dar SA, Dopson M, Lens PN, Buisman CJ. Selective recovery of nickel over iron from a nickel-iron solution using microbial sulfate reduction in a gas-lift bioreactor. *Water Res.* 2009;43(3):853-61.
  170. Brim H, Venkateswaran A, Kostandarithes HM, Fredrickson JK, Daly MJ. Engineering *Deinococcus geothermalis* for bioremediation of high-temperature radioactive waste environments. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):4575-82.
  171. Wolfram L, Haas E, Bauerfeind P. Nickel represses the synthesis of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2006;188(4):1245-50.
  172. Fulkerson JF Jr, Mobley HL. Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J Bacteriol.* 2000;182(6):1722-30.
  173. Krishnaswamy P, Wilson DB. Construction and Characterization of an *Escherichia coli* Strain Genetically Engineered for Ni(II) Bioaccumulation. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(12):5383-6.
  174. Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness P, Sadler PJ, et al. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol Microbiol.* 2002;45:1421-32.
  175. Cavet JS, Borrelly GP, Robinson NJ. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:165-81.