

Revisión crítica

Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos

J. Félix Gutiérrez Corona^{1*}, Ángeles E. Espino Saldaña¹, Alejandro Coreño Alonso^{1,3}, Francisco Javier Acevedo Aguilar², Georgina E. Reyna López¹, Francisco José Fernández³, Araceli Tomasini³, Kazimierz Wrobel² y Katarzyna Wrobel²

¹Departamento de Biología y ²Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato. Noria Alta s/n, C.P. 36050, Guanajuato, Gto.

³Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col.Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa, México, D.F.

* Autor de correspondencia: felixg@quijote.ugto.mx

Resumen

Esta contribución tiene como objetivo revisar los estudios realizados acerca de los mecanismos fúngicos de interacción con el cromo y las aplicaciones de dichos mecanismos en el contexto de la Biotecnología Ambiental, haciendo énfasis en algunas de las direcciones futuras de investigación y desarrollo tecnológico.

El cromo es considerado como un contaminante ambiental, debido a su amplio uso en distintas actividades industriales, entre las cuales se encuentran el cromado electrolítico, el curtido de pieles, la fabricación de explosivos, etc. Las formas del cromo estables en el ambiente son el cromo trivalente [Cr(III)] y el cromo hexavalente [Cr(VI)], siendo este último altamente tóxico y mutagénico para distintas formas de vida. A esto se suma que el Cr(VI) es altamente soluble, lo que lo hace móvil en el suelo y en ambientes acuáticos, con la consecuente toxicidad para los ecosistemas.

La influencia negativa de la acumulación de cromo sobre las poblaciones de microorganismos del suelo ha sido ampliamente descrita, así como la consecuente aparición de poblaciones de organismos adaptados (tolerantes) al ambiente hostil. En el caso de los hongos, organismos predominantes del suelo que actúan como eficientes biotransformadores, se han realizado estudios sobre los mecanismos de interacción con el cromo, la mayoría de los cuales se han centrado en los procesos de biosorción, caracterizándose éste por la unión pasiva del metal con componentes de la superficie celular, y de bioacumulación, en el cual ocurre la entrada del metal a las células con gasto de energía. Las especies reportadas incluyen levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp., *Pichia* sp. y los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. En estudios recientes, se han descrito cepas fúngicas capaces de realizar el proceso de transformación de Cr(VI) a especies reducidas, por un mecanismo bioquímico desconocido hasta la fecha. Dichas cepas comprenden levaduras como *Candida* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Lecytophora* sp., *Candida* sp., *Aureobasidium pullulans* y los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Aspergillus tubingensis* y *Penicillium* sp. Con algunos de dichos organismos se han implementado procesos biotecnológicos de biotratamiento de efluentes industriales.

Palabras clave: hongos; cromo; biosorción, bioacumulación, biotransformación; biotratamiento de efluentes industriales, biorremediación.

Abstract

This contribution aims to review studies on the fungal mechanisms of interaction with chromium and the applications of these mechanisms in the context of environmental biotechnology, with emphasis on some future directions for research and technological development

The metal Chromium (Cr) is considered an environmental pollutant due to its widespread use in several industrial activities, among them electroplating, leather tanning, manufacture of explosives, etc. The stable forms of chromium in the environment are trivalent chromium [Cr(III)] and hexavalent chromium [Cr(VI)], the latter being highly toxic and mutagenic to various life forms. Added to this, is the fact that Cr(VI) is highly soluble, making it mobile in soil and aquatic environments with toxic consequences for ecosystems. The negative influence of the accumulation of chromium on soil microbial populations has been widely described, and the consequent emergence of populations of organisms adapted (tolerant) to the hostile environment. In the case of fungi, soil predominant organisms that act as efficient bioconverters, there have been several studies on the mechanisms of interaction with chromium, most of which have been focused on biosorption processes, characterized by the passive binding of the metal to components of the cell surface, and bioaccumulation, in which case the entry of the metal to the cells occurs with energy expenditure. The reported species include yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp, *Pichia* sp and the filamentous fungi *Aspergillus* sp, and *Rhizopus* sp.

Recent studies have described fungal strains capable of performing the transformation of Cr(VI) to reduced species by an unknown biochemical mechanism. These strains include yeasts such as *Candida* sp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lecythophora* sp, *Aureobasidium pullulans* and the filamentous fungi *Aspergillus* sp, *Aspergillus tubingensis* and *Penicillium* sp. With some of these organisms studies have been carried out to implement biotechnological processes for the clean up of industrial effluents.

Key words: *fungi; chromium; biosorption, bioaccumulation, biotransformation; biotreatment of industrial effluents and bioremediation.*

1. El cromo en el ambiente

Entre los metales, el cromo ha atraído amplio interés público y de agencias regulatorias debido a la toxicidad que ejerce sobre los ecosistemas, incluyendo microorganismos y animales.

El cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la Tabla Periódica. Aunque puede existir en varios estados de oxidación, las formas más comunes y estables en el ambiente son el Cr trivalente Cr(III) y el Cr hexavalente Cr(VI), las cuales poseen propiedades químicas distintas. El Cr(VI), considerado la forma más tóxica del cromo, se encuentra usualmente asociado al oxígeno en forma de cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$),

que debido a su gran solubilidad son altamente móviles en el suelo y en ambientes acuáticos. Por otra parte, el Cr(III) se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos poco solubles, por lo cual es mucho menos móvil, y existe unido a materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos (Palmer y Wittbrodt, 1991). El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr(III); esta transformación es más rápida en ambientes ácidos (McGrath y Smith, 1990). Sin embargo, niveles elevados de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y puede así persistir como un contaminante. Actualmente se ha establecido que diversos compuestos de cromo, en forma de óxidos, cromatos y dicromatos, son

contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras, tales como cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos, etc. (Calder, 1988).

2. Toxicidad del cromo

Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación. El Cr(VI) es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Borst-Pauwels, 1981). El Cr(VI) es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en animales y mutagénico en bacterias (Losi *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la toxicidad del Cr(VI) se debe a que dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que en presencia de H₂O₂ funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Ercal *et al.*, 2001; Liu y Shi, 2001). Sumner *et al.* (2005) establecieron que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la oxidación de proteínas es el principal mecanismo de toxicidad de Cr(VI), siendo las proteínas glicolíticas y las de choque térmico las principalmente oxidadas, además de que la oxidación es isoforma específica. Hasta la fecha se desconoce si dicho mecanismo explica la toxicidad del Cr(VI) en otros sistemas biológicos. Por otra parte, los compuestos de Cr(III) son relativamente inocuos debido a que son insolubles y no pueden atravesar las membranas biológicas,

aunque en altas concentraciones pueden presentar los mismos efectos tóxicos que los de Cr(VI) (Wong y Trevors, 1988; Katz y Salem, 1993). El Cr(III) funciona como un oligoelemento esencial para los seres humanos (Anderson, 1989).

3. Interacciones de los hongos con el cromo

Los hongos son organismos ubicuos en la naturaleza, que predominan en el suelo, poseen propiedades fundamentales como biotransformadores y juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos de los metales (Gadd, 1993; Burford *et al.*, 2003). La influencia negativa de la acumulación del cromo sobre las poblaciones de microorganismos del suelo ha sido ampliamente descrita, así como la consecuente aparición de poblaciones de organismos adaptados (tolerantes) al ambiente hostil (Cervantes *et al.*, 2001). Las células fúngicas interactúan con el cromo a diferentes niveles, desde la pared celular, el periplasma y la membrana plasmática, hasta el citoplasma y los organelos celulares. Dichos microorganismos requieren detectar y regular los niveles intracelulares de cromo a través de sistemas de homeostasis que mantienen un balance entre la incorporación, expulsión y captura del metal. Es común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromo muestren resistencia al ión, debido a que poseen mecanismos activos o pasivos que les permiten removerlo o destoxificarlo. En ciertas especies se conocen con detalle dichos mecanismos, algunos de los cuales son de interés básico y de importancia biotecnológica, esto último en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de efluentes industriales y para la biorremediación de sitios contaminados. De manera general dichos mecanismos comprenden: (Fig. 1).

Biotransformación de Cr(VI) a especies reducidas (reducción química), que puede ser:

1) directa (enzimática) o

2) indirecta (no enzimática);

3) Incorporación y bioacumulación;

4) Biosorción de Cr(III) y Cr(VI); y

5) Inmovilización.

MECANISMOS DE INTERACCIÓN CON CROMO EN CÉLULAS FÚNGICAS

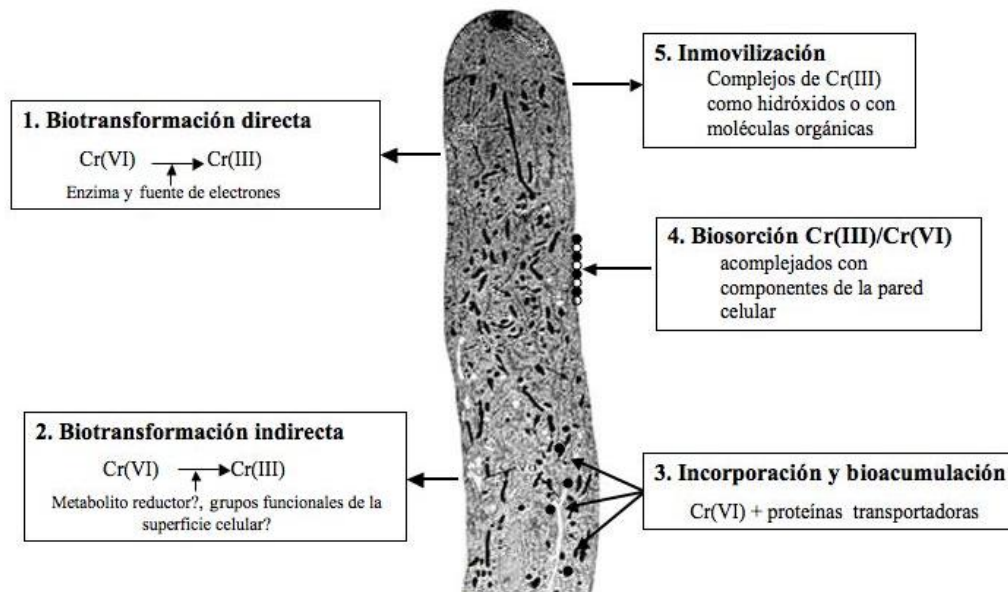


Figura 1. Mecanismos de interacción de los hongos con el cromo. Se ilustran los posibles modos de transformación química, así como las maneras de unión e incorporación a las células y la inmovilización mediante la formación de complejos.

4. Biotransformación de Cr(VI) a especies reducidas (reducción química)

Dentro de las células microbianas el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III) por sistemas reductores, que pueden incluir rutas enzimáticas y no enzimáticas. Hace varios años se habían descrito algunos reportes sobre hongos capaces de reducir el Cr (VI) a Cr (III) (Cervantes *et al.*, 2001). En años recientes dichos estudios se han incrementado; los organismos descritos incluyen levaduras como *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2004), una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Ksheminska *et al.*, 2006), *Candida sp.* FGSFEP (Guillén-Jiménez, 2008), así como

Lecythophora sp. NGV-1, *Candida sp.* NGV-9 y *Aureobasidium pullulans* (Villegas *et al.*, 2008). Entre los hongos filamentosos se han descrito cepas de *Aspergillus sp.* (Acevedo Aguilar *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2008), *Penicillium chrysogenum* (Pazouki *et al.*, 2007), *Penicillium sp.* (Acevedo Aguilar *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2008) y *Aspergillus versicolor* (Das *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, los organismos descritos poseen tolerancia a Cr(VI) y fueron aislados de sitios contaminados con cromato, ya sea de efluentes o licor de curtido de tenerías o suelo conteniendo residuos industriales.

La Figura 2 muestra la capacidad de transformación del Cr(VI) a Cr (III) en cultivos de las cepas tolerantes a Cr(VI) Ed8

de *Aspergillus* sp y H13 de *Penicillium* sp.; como se muestra, dicha transformación ocurrió con muy poca unión de cromo a la biomasa (≤ 1.0 % del cromo total presente en el medio), lo que indicó que la reducción

del Cr(VI) ocurre en el medio extracelular (Acevedo *et al.*, 2006). Después de 60 h, el color amarillo de los cultivos, debido a la presencia de Cr(VI), ha desaparecido completamente.

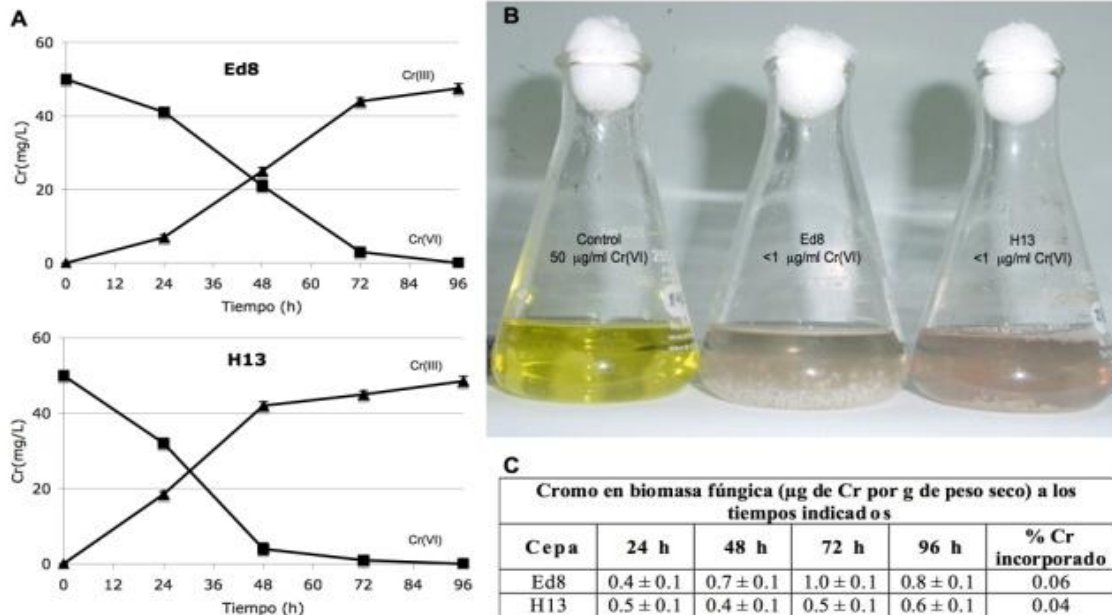


Figura 2. Reducción de Cr(VI) a Cr(III) por las cepas Ed8 de *Aspergillus* sp y H13 de *Penicillium* sp (A) y aspecto de los cultivos (B). Cromo total unido a la biomasa después de diferentes tiempos de incubación en presencia de Cr(VI) (C). Tomado de Acevedo Aguilar *et al.* (2006).

1) Biotransformación directa (reducción enzimática)

En los hongos se tiene poco conocimiento sobre los sistemas de reducción de Cr(VI); se desconoce que tipo de sistema participa en la detoxificación del Cr(VI), ya sea enzimático o no enzimático, intracelular o extracelular.

Además de las observaciones hechas con los hongos filamentosos *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., mencionadas líneas arriba (Fig. 2), se ha indicado que en cepas de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Ksheminska *et al.* 2006) y *Candida* sp (Villegas *et al.*, 2008) la reducción de Cr(VI) ocurre en el medio de cultivo, con muy poca unión de Cr a la biomasa, proponiéndose que esto refleja que la reducción de Cr(VI)

ocurre en el medio extracelular (Ksheminska *et al.* 2006). Hasta la fecha, sólo en la levadura *Candida maltosa* se ha reportado actividad de cromato reductasa en extractos libres de células (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2004), aunque no se probó si dicha actividad es la responsable de la reducción de Cr(VI) *in vivo*. Recientemente, se ha detectado actividad de cromato reductasa en extractos libres de células de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* (Coreño Alonso, 2009), la cual es resistente a cromato y posee alta eficiencia para reducir el Cr(VI) a Cr(III) en el medio extracelular (Acevedo Aguilar *et al.*, 2006, 2008); se desconoce el papel de esta actividad en la reducción *in vivo* del Cr(VI). En varios géneros de bacterias se ha documentado la actividad de

cromato reductasa, proponiéndose que la misma puede constituir un mecanismo de resistencia a Cr(VI) por participar en su destoxificación (Cervantes y Campos García, 2007); dichas enzimas poseen propiedades bioquímicas conocidas (nitrato reductasa, flavin reductasa, ferrireductasa y algunas flavoproteínas) y algunas son capaces de reducir al Cr(VI) *in vitro*.

2) Biotransformación indirecta (reducción no enzimática)

En el interior de las células microbianas los reductores no enzimáticos más potentes pueden ser el glutatión y la cisteína; se ha propuesto que en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* el glutatión puede proteger de la toxicidad del Cr(VI) por su capacidad de amortiguar al ión hidroxilo producido en su presencia (Pesti et al., 2002).

La reducción extracelular de Cr(VI) por células fúngicas podría deberse a la producción y excreción de moléculas reductoras, las cuales se desconocen hasta ahora. En el caso de bacterias, se ha descrito que producen y excretan sustancias reductoras, como el ión ferroso Fe(II) y H₂S, acoplando la oxidación de moléculas orgánicas y de hidrógeno a la reducción de ión férrico Fe(III) y sulfato, respectivamente (Kamaludeen et al., 2003). También, recientemente, se demostró que las bacterias *Shewanella oneidensis* y *Shewanella* sp. secretan flavinas como parte de un sistema extracelular de transferencia de electrones (Marsili et al., 2008). Es factible que la reducción extracelular de Cr(VI) observada en hongos filamentosos (Acevedo et al., 2008) y levaduras (Ksheminska et al., 2006; Villegas et al., 2008) se deba a la producción y excreción de moléculas similares a las descritas en bacterias o bien, que produzcan moléculas reductoras de Cr(VI) específicas. En el caso de la cepa industrial de *S. cerevisiae* (Ksheminska et

al., 2006), se encontró que el Cr(III) formado por reducción de Cr(VI) en el medio extracelular se encuentra acompañado con, al menos, dos compuestos distintos producidos por la levadura, de naturaleza desconocida; en su momento, deberá determinarse si dichos compuestos corresponden a moléculas reductoras de Cr(VI).

3) Incorporación y bioacumulación

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que el Cr(VI) puede incorporarse a las células por un transportador aniónico no específico, un sistema de permeasas que transporta diferentes aniones como sulfatos y fosfatos (Borst-Pauwels, 1981); dicho sistema es codificado por los genes SUL1 y SUL2 (Cherest et al., 1997). Se ha descrito que en la levadura *S. cerevisiae* la expresión de dichos genes es modulada positivamente por el regulador transcripcional MSN1; la falta de esta proteína conduce a un nivel de expresión bajo en los genes de los transportadores SUL1 y SUL2, causa que se acumule menos cromo en las células y produce el fenotipo de tolerancia a Cr(VI) (Chang, 2003). La incorporación de sulfato es un punto importante de regulación del metabolismo del sulfato en otros hongos; dicha incorporación esta sujeta a represión metabólica por azufre, la cual afecta la expresión de los genes codificantes de las permeasas de sulfato en *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997; Tao y Marzluf, 1998), *Aspergillus nidulans* (Natorf et al., 1993, 1998) y *Penicillium chrysogenum* (Van de Kamp et al., 2000).

Evidencia adicional sobre el uso del sistema de transporte de sulfato para la incorporación del cromato, se obtuvo por la observación de que algunos mutantes resistentes a cromato de hongos filamentosos y levaduras mostraron una dramática disminución en el transporte de sulfato (Cervantes et al., 2001).

Recientemente, se ha mostrado que en el genoma de algunos hongos filamentosos, pero no en el de levaduras, existen homólogos de la proteína bacteriana ChrA (Cervantes y Campos-García, 2007), la cual pertenece a la superfamilia de transportadores CHR, probablemente implicadas en el transporte de sulfato y cromato (Nies *et al.*, 1998). En las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Cupriavidus metallidurans* la proteína ChrA constituye un determinante de resistencia a Cr(VI), por funcionar como una bomba expulsora del ión (Cervantes y Campos-García, 2007; Ramírez Díaz *et al.*, 2008). En hongos, la

función de estas proteínas CHR homólogas no ha sido analizada.

Una vez que inicia la incorporación del cromo, este puede ser acumulado por las células fúngicas durante el crecimiento. La acumulación del metal es influida por diversos factores, como el pH del medio, la concentración inicial del metal, la especie química de éste y la temperatura. La Tabla 1 muestra reportes de remoción de cromo del medio por acumulación del metal en la biomasa de distintos géneros y especies de hongos; es claro que entre los organismos que remueven el cromo a altas concentraciones iniciales de este en el medio figuran las especies de *Aspergillus*.

Tabla 1. Remoción de cromo por bioacumulación/biosorción del metal con biomasa de hongos.

Metal	Microorganismo	Concentración inicial de metal (mg/L)	pH	Remoción (%)	Tiempo (h)	Referencia
Cr(VI)	<i>Aspergillus foetidus</i>	5	7.0	97	92	Prasenjit <i>et al.</i> , 2002
Cr(III)	<i>Aspergillus oryzae</i>	240	5.0	97	36	Nasseri <i>et al.</i> , 2002
Cr(VI)	<i>Rhizopus nigricans</i>	100	2.0	80	4	Bai y Abraham, 2001
Cr(VI)	<i>Aspergillus</i> sp.	100	5.0	92	18	Congeevaram <i>et al.</i> , 2007
Cr(VI)	<i>Aspergillus niger</i>	500	6.0	75	168	Srivastava y Thakur, 2006
Cr(III)	<i>Aspergillus Níger</i> MTCC2594	2150	5.5	71	36	Mala <i>et al.</i> , 2006
Cr(VI)	<i>Aspergillus niger</i> MTCC2594	72	5.5	78	36	Mala <i>et al.</i> , 2006

Sin embargo, se ha descrito que tanto levaduras como hongos filamentosos son capaces de acumular concentraciones elevadas de cromo en la biomasa; como ejemplo, cabe mencionar que la levadura *Pichia guillermondii* (Ksheminska *et al.*, 2005) y los hongos filamentosos *Aspergillus* sp. (Srivastava y Thakur, 2006b) y *Rhizopus* sp. (Zafar *et al.*, 2007) acumulan alrededor de 13.0, 8.2 y 4.5 mg de cromo por g de biomasa, respectivamente.

Es importante mencionar que en los reportes mencionados se usaron diferentes condiciones, que incluyen los medios de cultivo, la concentración de cromo y la relación metal/biomasa, que dificultan las comparaciones.

Tabla 2. Reportes de bioacumulación/biosorción de cromo en hongos filamentosos y levaduras en los últimos 5 años.

Organismo	Bioacumulación/ Biosorción de Cr(III)	Bioacumulación/ Biosorción de Cr(VI)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> ¹ MTCC 2594	Si	Si	Mala et al., 2006
<i>Aspergillus sp.</i> ¹	N.i.	Si	Congeevaram et al., 2007
<i>Rhizopus sp.</i> ¹	N.i.	Si	Zafar et al., 2007
<i>Aspergillus sp.</i> ¹	N.i.	Si	
<i>Aspergillus sp.</i> ¹	Si	Si	Srivastava y Thakur, 2006a
<i>Hirsutella sp.</i> ¹	N.i.		
<i>Aspergillus sp.</i> ¹	Si	Si	Srivastava y Thakur, 2006b
<i>Aspergillus sp.</i> ¹ N2; <i>Penicillium sp.</i> ¹ N3	N.i.	Si	Fukuda et al., 2008
<i>Aspergillus versicolor</i> ¹	N.i.	Si	
<i>Candida intermedia</i> ²	Si	Si	Das et al., 2008
<i>Pichia guilliermondii</i> ² ATCC 201911	Si	Si	Pas et al., 2004
Fusión de <i>Candida</i> ² <i>tropicalis</i> y <i>Candida</i> <i>lipolytica</i> ²	Si	Si	Kaszycki et al., 2004
	N.i.	Si	Yin et al., 2008

¹ Hongo filamentoso; ² Levadura. N.i. No investigado.

4) Biosorción de Cr(III) y Cr(VI)

Se ha descrito la captura de cromo en la superficie de hongos filamentosos y de levaduras, como resultado de su unión con componentes de la pared celular; en esta estructura existen principalmente polisacáridos, como glucanas, quitina y quitosana, los cuales pueden estar asociados con proteínas, y otros componentes menores como lípidos y melaninas (Gadd, 1993; Pillichshammer et al., 1995; Cervantes et al., 2001). Esta unión del cromo a la superficie de los hongos ocurre de un modo independiente de energía, de manera similar a lo descrito con otros metales y se le ha denominado biosorción (Volesky y Holan, 1995; Pillichshammer et al., 1995; Cervantes et al., 2001). El micelio de los hongos zigomicetos *Mucor mucedo* y *Rhizomucor miehei* tratado químicamente

muestra alta eficiencia para unir Cr; también, las biomásas de *Rhizomucor arrhizu*, *Candida tropicales*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus carbonarius* NRC401121 son excelentes biosorbentes (Cervantes et al., 2001). Entre varios aislados de hongos filamentosos, la cepa de MP/92/3/4 de *Mucor hiemalis* mostró una eficiencia mayor para biosorber Cr(III) a su biomasa, comparado con la unión de Cr(VI) (Pillichshammer et al., 1995).

En años recientes se han incrementado las investigaciones sobre el empleo de biomasa fúngica para remover cromo. La Tabla 2 muestra reportes descritos en los últimos 5 años, en los que se incluyen los resultados de estudios hechos en cultivos con hongos filamentosos o levaduras, predominando los realizados con los primeros. Dado que en dichos estudios se empleó biomasa viva, los

datos obtenidos pueden deberse a los procesos de bioacumulación y/o de biosorción de cromo. En el reporte de Das *et al.*, (2008), mencionado en la Tabla 2, mediante el empleo de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, se describe que en *Aspergillus versicolor* ocurre la unión de Cr(VI) a la pared celular del micelio y que los componentes de ésta causan su reducción a Cr(III), el cual une electrostáticamente al Cr(VI) conduciendo a la formación de acúmulos del metal en capas sobre la pared celular.

Es probable que la interacción de los hongos con el cromo involucre dos o más de los mecanismos mostrados en la Figura 1. Ejemplo de esto lo constituyen las recientes observaciones de Das *et al.*, (2008), en las que se concluyó que en *A. versicolor* ocurre reducción de Cr(VI) a Cr(III) y también unión de ambos iones a la superficie celular. Otra indicación proviene de la observación de que la eficiencia de reducción de Cr(VI)

a Cr(III) en la cepa Ed8 de *Aspergillus* sp., la cual ocurre en el medio extracelular (Acevedo Aguilar *et al.*, 2006), se estimula dramáticamente por la presencia en el medio de ácidos orgánicos, como citrato, salicilato o tartrato (Fig. 3; Coreño Alonso *et al.*, 2009). Dichos compuestos son productos del metabolismo microbiano abundantes en el suelo, que actúan como efectivos acomplejantes del Cr(III) unido a arcillas y otros componentes (Dubbin, 2004). Por ello, su efecto estimulador sobre la reducción de Cr(VI) por la cepa Ed8, identificada como un aislado de *Aspergillus tubingensis* (Coreño Alonso *et al.*, 2009), puede explicarse en base a que actúan favoreciendo la reacción de reducción de Cr(VI), acomplejando al producto de esta. Es factible que la estimulación de la reducción microbiana de Cr(VI) por ácidos carboxílicos tenga un papel importante en la atenuación natural de dicho ión (Coreño Alonso *et al.*, 2009).

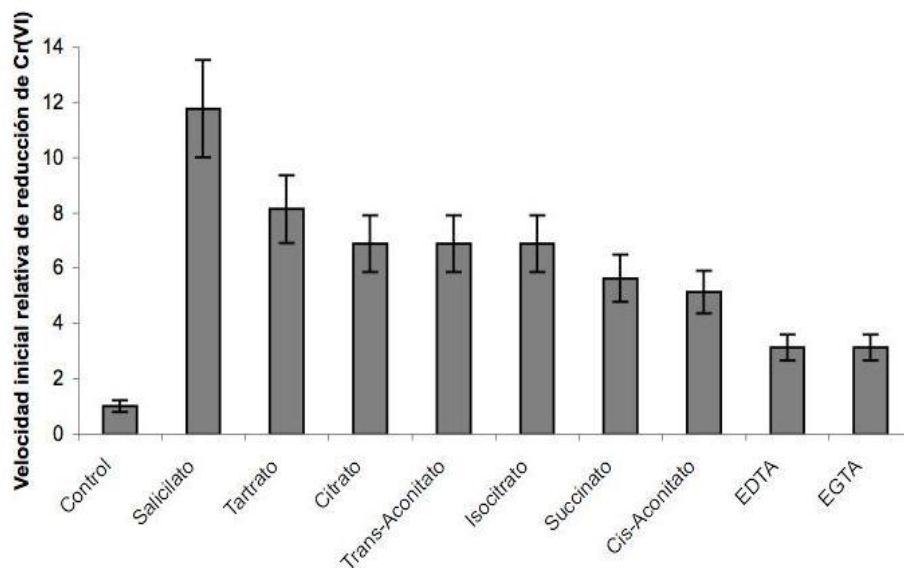


Figura 3. Efecto de ácidos carboxílicos en la eficiencia de reducción extracelular del Cr(VI) en la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis*. Adaptado de Coreño Alonso *et al.* (2009).

5. Tolerancia a Cr(VI)

La tolerancia a cromato ha sido descrita en cepas fúngicas de laboratorio mediante inducción con agentes mutagénicos, así como en aislados nativos de sitios contaminados; en varios casos, tanto de levaduras como de hongos filamentosos, se demostró que la tolerancia al Cr(VI) se debe a la alteración del transporte de sulfato, que conduce a una menor incorporación de cromato (Cervantes *et al.*, 2001). Como ya se mencionó, los genes SUL, implicados en el transporte sulfato, están sujetos a regulación transcripcional, tanto en levaduras (Chang, 2003) como en hongos filamentosos (Marzluf, 1997; Tao y Marzluf, 1998; Natorf *et al.*, 1993, 1998; Van de Kamp *et al.*, 2000). En otros casos se producen fenotipos de hipersensibilidad a Cr(VI), como resultado de la alteración de la ATPasa vacuolar o de estructuras vacuolares (Gharieb y Gadd, 1998), o bien por la alteración de proteínas que protegen del efecto oxidativo del Cr(VI), como la alkil hidropéroxido reductasa (Nguyen-Nhu y Knoops, 2002) o la Cu,Zn-superoxido dismutasa y la péptido metionina sulfóxido reductasa (Sumner *et al.*, 2005).

6. Aplicaciones biotecnológicas

Los procedimientos convencionales para la remoción del cromato de sitios contaminados son de tipo fisicoquímico e incluyen la reducción química seguida de la precipitación, intercambio iónico o adsorción sobre carbón activado, alúmina, kaolinita o ceniza. Sin embargo, la mayoría de esos métodos requieren de alta energía o de cantidades grandes de reactivos (Shrivastava *et al.*, 1986). Los procesos microbianos de biosorción y de

transformación química de cromo son promisorios y de importancia práctica en el contexto de la biotecnología ambiental, ya que pueden servir de base para el desarrollo de procedimientos limpios y económicos para el tratamiento de aguas naturales, de efluentes industriales o para la biorremediación de suelos contaminados. A continuación se describen estudios realizados en hongos sobre dichos procesos.

7. Biosorción de Cromo

En 1995 se hizo un esfuerzo para resumir el tipo y eficacia de los biosorbentes, así como los procesos de tratamiento por biosorción (Volesky y Holan, 1995); de entonces a la fecha los estudios han continuado de manera intensiva, considerándose en muchos casos el empleo de biomasa fúngica, cultivada en lote, en biorreactores o inmovilizada en diferentes matrices, para remover por biosorción el cromo presente en medio de cultivo o en efluentes industriales. Respecto de los hongos, los organismos utilizados incluyen *Rhizopus nigricans* (Bai y Abraham, 2005), *Penicillium chrysogenum* (Deng *et al.*, 2006), *Trichoderma viride* (Bishnoi *et al.*, 2007), *Aspergillus* sp. e *Hirsutella* sp. (Srivastava y Thakur, 2006 a,b), *Rhizopus cohnii* (Li *et al.*, 2008) y otros. En algunos casos, los estudios se realizan utilizando biorreactores; en la Tabla 3 se muestra que la biomasa de *Aspergillus* sp. incubada en un biorreactor puede utilizarse para la remoción por biosorción del Cr presente en los efluentes de una tenería o en medio de cultivo (Srivastava y Thakur, 2006a); debido a que en los efluentes existen otros compuestos que son tóxicos, la eficiencia de remoción de Cr es menor a la observada en medio de cultivo.

Tabla 3. Remoción de Cr por biomasa de la cepa FK1 de *Aspergillus* sp. incubada en bioreactor.

Tiempo de incubación (días)	Porcentaje de disminución de cromo presente en:	
	Medio de cultivo*	Efluente industrial**
1	65	30
3	70	48
5	85	60

* El cromo inicial fue de 500 ppm de Cr(VI). ** El cromo inicial presente en el efluente fue 557 ppm, determinado como Cr total. Adaptado de Srivastava y Thakur (2006a).

En otros estudios se ha considerado el empleo de biomasa fúngica generada como producto secundario de fermentaciones a nivel industrial para la producción de alimentos, bebidas o productos farmacéuticos; ejemplo de esto lo constituye *P. chrysogenum*, utilizado para la producción de penicilina. En este caso se ha considerado realizar modificaciones a la superficie de la biomasa micelial, mediante la adición de cargas positivas por la inserción en la misma del polímero polietilenimina. Debido a la alta densidad de grupos amino en las moléculas del polímero, la biomasa modificada mostró potencial zeta positivo así como alta capacidad de adsorber Cr (VI) (Deng *et al.*, 2006). Otro enfoque novedoso ha consistido en la preparación de microesferas magnéticas biofuncionales para la adsorción y recuperación de Cr (VI); la subsecuente aplicación de la tecnología de separación magnética hace el proceso más conveniente. En este procedimiento se utilizó biomasa pulverizada del hongo *Rhizopus cohni* en la preparación de las microesferas; en este caso la biosorción ocurrió en forma de Cr(VI) por efecto de la biomasa fúngica (Li *et al.*, 2008).

8. Transformación química del cromo

Dado que la movilidad y la toxicidad del Cr dependen de su estado de oxidación, las reacciones redox que involucran al Cr son importantes en la determinación de su destino en el ambiente y el riesgo de este para la salud humana. Se puede anticipar que la reducción del Cr(VI) en ambientes contaminados resulta de una interacción compleja de procesos bióticos y abióticos. El Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) en el suelo por reacciones redox con especies inorgánicas acuosas, transferencia de electrones en superficies minerales, reacción con sustancias orgánicas no húmicas, tales como carbohidratos y proteínas, o reducción por sustancias húmicas del suelo (Palmer y Wittbrodt, 1991). Como ya se mencionó, la actividad microbiana también puede contribuir a la reducción de Cr(VI) a través de la liberación del ión ferroso, sulfuros o intermediarios orgánicos reactivos. Algunos ligantes solubles orgánicos pueden influenciar el destino del Cr ubicado bajo las superficies a través de complejos con la forma reducida Fe(II) u oxidada Fe(III) del Fe, así como por el acomplejamiento del Cr(III) en formas solubles (Buerge y Hug, 1998).

Como ya se mencionó, la eficiencia de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* se estimula por ácidos orgánicos como el citrato, salicilato o tartrato (Coreño-Alonso *et al.*, 2009; Fig. 3), que provienen del metabolismo microbiano y que son abundantes en el suelo.

En base a esta observación y a la capacidad de la biomasa de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* de realizar de manera sostenida la disminución de los niveles de Cr(VI), se implementó un procedimiento continuo de biotratamiento de efluentes industriales en base a ciclos de recarga de efluentes utilizando medio con agentes acomplejantes (Coreño-Alonso *et al.*, 2009; Fig 4 A, B). Tomando en cuenta la concentración inicial de Cr(VI) en los efluentes, de alrededor de

50 $\mu\text{g/ml}$, y 3 ciclos de recarga de 50 $\mu\text{g/ml}$ cada uno, en medio con citrato se redujeron alrededor de 180 $\mu\text{g/ml}$ después de 96 h (Fig. 4A). Se obtuvo una mejora adicional en la eficiencia del sistema utilizando medio suplementado con una mezcla de salicilato y tartrato, ya que después de 3 ciclos de

recarga se obtuvo la reducción de cerca de 140 $\mu\text{g/ml}$ de Cr(VI) después de 24 h (Fig. 4B). Estos resultados indican la utilidad biotecnológica de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* para el diseño de procesos de biotratamiento de efluentes industriales contaminados con Cr(VI).

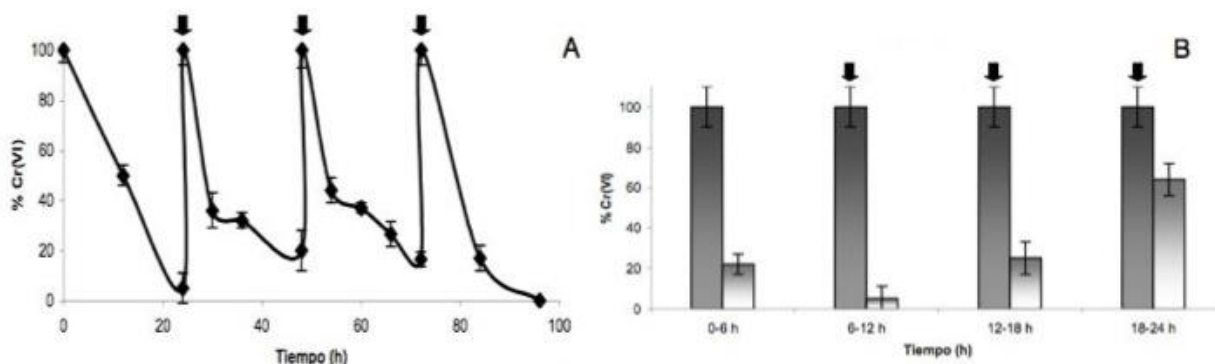


Figura 4. Proceso continuo de remoción de Cr(VI) de efluentes industriales (residuos de una cromadora) por reducción con biomasa de la cepa Ed8 incubada en medio con el acomplejante citrato (A), o una mezcla de salicilato y tartrato (B). Las flechas indican recargas de efluente con la concentración de Cr(VI) utilizada al inicio de las incubaciones (50 mg/L). Tomado de Coreño Alonso *et al.* (2009).

Los reportes sobre aplicaciones de microorganismos para estudios de biorremediación de suelos contaminados con cromato son escasos. Uno de dichos estudios incluyó el empleo de bacterias no identificadas, nativas del sitio contaminado, las cuales se utilizaron en bioreactores para tratar suelo contaminado con Cr(VI). Se encontró que la reducción máxima de Cr(VI) ocurrió con el empleo de 15 mg de biomasa bacteriana por g de suelo (peso húmedo), con 50 mg de melazas por g de suelo como fuente de carbono; el bioreactor operado en esas condiciones redujo completamente 5.6 mg Cr(VI) por g de suelo en 20 días (Jeyasingh y Philip, 2004). En otro estudio se utilizaron bacterias reductoras de Cr(VI) no identificadas, nativas de un sitio contaminado, en combinación con el hongo *Ganoderma lucidum*, éste último utilizado para remover por biosorción el Cr (III) formado. Los resultados obtenidos indicaron que la reducción de 50 mg/L de Cr(VI) por

las bacterias fue máxima, de alrededor de un 80%, con 10 g/L de peptona como fuente de electrones y un tiempo de retención hidráulica de 8 h. El Cr (III) producido fue removido utilizando una columna con el hongo *Ganoderma lucidum* como absorbente y exceso de donador de electrones del efluente del bioreactor; en esas condiciones, la capacidad específica de adsorción de Cr (III) de *G. Lucidum* en la columna fue de 576 mg por g (Krishna y Philip, 2005). En otros estudios se ha probado la adición de fuentes de carbono a suelo contaminado analizado en columna; en uno de esos estudios se observó que la adición de triptona de soya a suelo adicionado de 1000 mg/L de Cr(VI) incrementa la reducción del ión, debido a la acción de microorganismos presentes en el suelo, aunque tal acción no es observada en suelo con mayores concentraciones (10,000 mg/L) de Cr(VI) (Tokunaga *et al.*, 2003). En otro trabajo se observó que la adición de nitrato y de

melasas acelera la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por una comunidad microbiana nativa estudiada en microcosmos en lote o en columnas de flujo no saturado, bajo condiciones similares a las de la zona vadosa. En el caso de los microcosmos en lote, la presencia de los mencionados nutrientes causó 87% de reducción de los 67 mg/L de Cr(VI) presentes al inicio del experimento; los mismos nutrientes, agregados a una columna de flujo no saturado de 15 cm adicionada de 65 mg/L de Cr(VI), causaron la reducción e inmovilización de 10% del cromo, en un periodo de 45 días (Oliver *et al.*, 2003).

9. Nuevos enfoques y direcciones de los estudios

En pocos estudios en relación con las respuestas a cromo se han usado modelos microbianos de laboratorio, como la levadura sensible a Cr(VI) *S. cerevisiae*, que ha sido ampliamente utilizada para la elucidación de distintos procesos biológicos fundamentales, gracias a la facilidad de su manipulación por procedimientos de genética molecular. En uno de dichos estudios, utilizando cepas mutantes afectadas en funciones de reparación de daño a ADN, de lípidos o de proteínas (Sumner *et al.*, 2005) se estableció que en *S. cerevisiae* la oxidación de proteínas es el principal mecanismo de toxicidad de Cr(VI). Por otra parte, la caracterización de aislados de levaduras y de hongos filamentosos nativos de sitios contaminados con Cr(VI), que usualmente son tolerantes al ión, puede revelar procesos metabólicos y/o mecanismos no presentes en modelos de laboratorio, que podrían ser relevantes para las propiedades de tolerancia y capacidad de destoxificación del ión. Ya sea en modelos de laboratorio o en cepas fúngicas de origen ambiental, el análisis del transcriptoma, del proteoma y del metaboloma constituyen

herramientas poderosas para conocer los cambios y respuestas a nivel genómico en la expresión de genes, producción de proteínas y funcionamiento de rutas metabólicas, como consecuencia de la exposición a metales. Adicionalmente, estudios complementarios de fisiología molecular pueden permitir establecer el papel de los genes/proteínas identificados como de expresión/producción diferencial en las propiedades de resistencia a Cr(VI) y/o en la capacidad de transformarlo a formas reducidas. En estudios recientes se ha analizado a nivel genómico la respuesta a Cr(VI) y a otros metales en el modelo de laboratorio *S. cerevisiae* (Jin *et al.*, 2008); se obtuvo información que revela los cambios transcripcionales asociados con la exposición a los metales (transcriptoma), así como sobre la relación entre la expresión de alrededor de 4,700 genes no esenciales y la sensibilidad a aquellos (deletoma). El análisis de estos dos tipos de información reveló que varias rutas de transducción de señales conservadas parecen estar involucradas en la respuesta a la exposición a metales. Estos estudios indican que la respuesta al estrés causado por el cromo y otros metales es compleja, posiblemente resultante de la acción de varios sistemas de regulación transcripcional y asociada con los efectos primarios y secundarios de la interacción de los metales con los componentes celulares.

En el futuro, será necesaria la integración de los resultados de la combinación de estudios de transcriptoma, proteómicos y de metabolómica, a fin de lograr obtener una panorámica de las respuestas celulares a nivel del organismo completo. Derivado de lo anterior, podrá hacerse una selección y manipulación adecuada de genes de interés para mejorar características particulares de los microorganismos con fines biotecnológicos. Otros aspectos de importancia para una comprensión más profunda de las

interacciones de las células fúngicas con el cromo, es la utilización de tecnologías de alta resolución tales como la microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB), espectroscopía de dispersión de rayos X y de aquellas que permitan la detección de las especies estables del cromo, ya sea en las células o en el medio extracelular, como la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Aspectos adicionales de mejora futura comprenden la modificación y optimización de las condiciones de interacción microorganismo-metal, que conduzcan a una mayor eficiencia en la reducción del Cr(VI), o nuevas modificaciones químicas de la biomasa que incrementen la eficiencia en la biosorción del metal. Aunado a lo anterior, se requerirán de nuevos estudios en biorreactores, tanto en cultivos sumergidos como en fase sólida, a fin de alcanzar mejoras en la ingeniería de los procesos de tratamiento de efluentes y de su escalamiento. De igual forma, será de importancia incrementar los estudios sobre la implementación de procedimientos de biorremediación de suelos contaminados con cromo, empleando cepas fúngicas seleccionadas, solas o combinadas en consorcios con bacterias, considerando también el

empleo de condiciones ambientales y nutricionales adecuadas, que redunden en procesos efectivos y económicos.

10. Conclusiones

Los mecanismos fúngicos de interacción con el cromo promisorios en el contexto de la Biotecnología Ambiental son la biosorción, la bioacumulación y la biotransformación; de éstos, el menos entendido a nivel bioquímico es la biotransformación.

Existen escasos estudios en relación con las respuestas a cromo en los hongos, por lo que se espera que la aplicación de los enfoques de proteómica, genómica y metabolómica contribuya al entendimiento de los cambios asociados con respuestas a la toxicidad del ión y/o de importancia para la destoxificación del mismo. A futuro, esta información puede servir para el desarrollo de nuevas variedades fúngicas con capacidades mejoradas.

Se requiere contar con un mayor número de estudios en bioreactores que conduzcan a mejoras en la ingeniería de los procesos para el biotratamiento de efluentes industriales y de procedimientos para la biorremediación de sitios contaminados.

Reconocimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos CB-2005-01-51635 de CONACyT y UG-IBE-07-04 de la Universidad de Guanajuato, México.

A. Coreño Alonso y F.J. Acevedo Aguilar recibieron una beca de posgrado del CONACyT y del CONCYTEG, México.

Referencias

Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., León-Rodríguez, I.L., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M., Gutiérrez-Corona, J.F. 2006. Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial

wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. *Can J Microbiol* 52(9):809-815.

Acevedo Aguilar, F.J., Wrobel, K., Lofthus, K., Caruso, J.A., Coreño Alonso, A., Gutiérrez Corona, J.F., Wrobel, K. 2008. Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi. *Anal Bioanal Chem* 392(1-2):269-276.

Anderson, R. A., 1989. Essentiality of chromium in humans. *Sci Total Environ* 86(1-2):75-81.

Bai, S.R., Abraham, T.E. 2005. Continuous adsorption and recovery of Cr(VI) in different types of reactors. *Biotechnol Prog* 21(6):1692-1699.

- Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochim Biophys Acta* 650(2-3):88-127.
- Bishnoi, N.R., Kumar, R., Bishnoi, K. 2007. Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Calcium alginate beads. *Indian J Exp Biol* 45(7):657-64.
- Buerge, I.J., Hug, S.J. 1998. Influence of organic ligands on chromium(VI) reduction by iron(II). *Environ Sci Technol* 32(14):2092- 2099.
- Burford, E.P., Fomina, M., Gadd, G.M. 2003. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Miner Mag* 67(6):1127-1155.
- Calder, L. M. 1988. Chromium contamination of groundwater. In: Nriagu, J.O., Niwboer, E. (Eds) Chromium in the Nature and Human Environments. John Wiley & Sons, New York. pp. 215-229.
- Cervantes, C., Campos García, J., Devars, S., Gutiérrez Corona, F., Loza Tavera, H., Torres Guzmán, J.C., Moreno Sánchez, R. 2001. Interactions of chromium with micro-organisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25(3):335-347.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J. 2007. Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Nies D.H., Silver, S. (Eds.) Molecular Microbiology of Heavy Metals Springer-Verlag, Berlin, pp 407-420.
- Chang, K.S., Won, J.I., Lee, M.R., Lee, Ch. E. Kim, K.H., Park, K.Y., Kim, S-K., Lee, J.S., Hwang, S. 2003. The putative transcriptional activator MSN1 promotes chromium accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells* 16(3):291-296.
- Cherest, H., Davidian, J.C., Thomas, D., Benes, V., Ansoerge, W., Surdin-Kerjan, Y. 1997. Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145(3):627-635.
- Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K. 2007. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard Mater* 146(1-2):270-277.
- Coreño Alonso, A. 2009. Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromato. Tesis de doctorado (Biología), Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto. 78 p.
- Coreño-Alonso, A., Acevedo-Aguilar, F.J., Reyna-López, G.E., Tomasini, A., Fernandez, F.J., Wrobel, K., Wrobel, K., Gutiérrez-Corona, J.F. 2009. Cr(VI) reduction by an *Aspergillus tubingensis* strain: role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Chemosphere* 76(1):43-47.
- Das, S.K., Mukherjee, M., Guha, A.K. 2008. Interaction of chromium with resistant strain *Aspergillus versicolor*: Investigation with Atomic Force Microscopy and other physical studies. *Langmuir* 24(16):8643-865.
- Deng, S., Ting, Y.P. 2005. Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high-capacity biosorbent for Cr(VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms. *Environ Sci Technol* 39(21):8490-8496.
- Dubbin, W.E. 2004. Influence of organic ligands on Cr desorption from hydroxy-Cr intercalated montmorillonite. *Chemosphere* 54(8):1071-1077.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6):529-539.
- Fukuda, T., Ishino, Y., Ogawa, A., Tsutsumi, K., Morita, H. 2008. Cr(VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. *J Gen Appl Microbiol* 54(5): 295-303.
- Gadd, G. M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124(1):25-60.
- Gharieb, M.M., Gadd, G.M. 1998. Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. *BioMetals* 11(2):101-106.
- Guillén-Jiménez, F. de M., Morales-Barrera, L., Morales-Jiménez, J., Hernández-Rodríguez, C.H., Cristiani-Urbina, E. 2008. Modulation of

- tolerance to Cr(VI) and Cr(VI) reduction by sulfate ion in a *Candida* yeast strain isolated from tannery wastewater. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(11):1277-1287.
- Jeyasingh, J., Philip, L. 2005. Bioremediation of chromium contaminated soil: optimization of operating parameters under laboratory conditions. *J Hazard Mater* 118(1-3): 113-120.
- Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., Freedman, J.H. 2008. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.* 4(4):e1000053.
- Kamaludeen, S.P.B., Megharaj, M., Juhasz, A.L., Sethunathan, N., Naidu, R. 2003. Chromium-Microorganism Interactions in Soils: Remediation Implications. *Rev Environ Contam Toxicol* 178:93-164.
- Katz, S.A., Salem, H. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J Appl Toxicol* 13(3):217-224.
- Ksheminska, H.P., Jaglarz, A., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D. Kaszycki, P., kolozek, H. 2005. Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr (III) and Cr (VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. *Microbiol Res* 158(1):59-67.
- Ksheminska, H.P., Honchar, T.M., Gayda, G.Z., Gonchar, M.V. 2006. Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures. *Cent Eur J Biol* 1(1):137-149.
- Krishna, K.R., Philip, L. 2005. Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *J Hazard Mater* 121(1-3):109-117.
- Li, H., Li, Z., Liu, T., Xiao, X., Peng, Z., Deng, L. 2008. A novel technology for biosorption and recovery hexavalent chromium in wastewater by bio-functional magnetic beads. *Bioresour Technol* 99(14):6271-6279.
- Liu, K., Shi, X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222(1-2):41-47.
- Losi, M. E., Amrhein, C., Frankenberger, W. T. J. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol* 136:91-131.
- Mala, S.M.J, Unni, N.B., Puvanakrishnan, R. 2006. Bioaccumulation and biosorption of chromium by *Aspergillus niger* MTCC 2594. *J Gen Appl Microbiol* 52(3):179-186.
- Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(10):3968-3973.
- Marzluf, G. A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol* 51:73-96.
- McGrath, S.P., Smith, S. 1990. Chromium and nickel. In: Alloway, B.J. (Ed.) Heavy Metals in Soils. Wiley, New York, pp. 125-150.
- Nasseri, S., Mazaheri, A.M., Noori, S.M., Rostami, K.H., Shariat, M., Nadafi, K. 2002. Chromium removal from tanning effluent using biomass of *Aspergillus oryzae*. *Pak J Biol Sci* 5:1056-1059.
- Natorf, R., Balijska, M., Paszewski, A. 1993. At least four regulatory genes control sulphur metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 238(1-2):185-192.
- Natorf, R., Piotrowska, M., Paszewski, A. 1998. The *Aspergillus nidulans* sulphur regulatory gene *sconB* encodes a protein with WD40 repeats and an F-box. *Mol Gen Genet* 257(3):255-263.
- Nguyen-Nhu, N. T., Knoops, B. 2002. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol Lett* 135(3):219-228.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N., Saier, M.H. 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J Bacteriol* 180(21):5799-5802
- Oliver, D.S., Brockman, F.J., Bowman, R.S., Thomas L., Kieft, T.L. 2003. Microbial reduction of hexavalent chromium under vadose zone conditions. *J Environ Qual* 32(1):317-324.

- Palmer, C.H., Wittbrodt, P.R. 1991. Processes affecting the remediation of chromium-contaminated sites. *Environ Health Perspect* 92:25-40
- Paš, M., Milacic, R., Drašlar, K., Pollak, N., Raspor, P. 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell. *BioMetals* 17(1):25-33.
- Pazouki, M., Keyanpour-Rad, M., Shafie, S.H., Shahhoseini, S.H. 2007. Efficiency of *Penicillium chrysogenum* PTCC 5037 in reducing low concentration of chromium hexavalent in a chromium electroplating plant wastewater. *Bioresour Technol* 98(11):2116-2122.
- Pesti, M., Gazdag, Z., Emri, T., Farkas, N., Koósz, Zs., Belágyi, J., Pócsi, I. 2002. Chromate sensitivity in fission yeast is caused by increased glutathione reductase activity and peroxide overproduction. *J Basic Microbiol* 42(6):406-419.
- Pillichshammer, M., Pümpel, T., Pöder, R., Eller, K., Klima, J., Schinner, F. 1995. Biosorption of chromium to fungi. *BioMetals* 8(2):117-121.
- Prasenjit, B., Sumathi, S. 2005. Uptake of chromium by *Aspergillus foetidus*. *J Mater Cy Waste Manag* 7(2): 88-92.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21(3):321-332.
- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R., Gutiérrez-Corona, F. 2004. Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85(1):63-68.
- Srivastava, H., Mathur, R., Mehrotra, I. 1986. Removal of chromium from industrial effluent by absorption on sawdust. *Environ Technol* 7(1):55-63.
- Srivastava, S., Thakur, I.S. 2006a. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Bioresour Technol* 97(10):1167-1173.
- Srivastava, S., Thakur, I.S. 2006b. Biosorption potency of *Aspergillus niger* for removal of chromium (VI). *Curr Microbiol* 53(3):232-237.
- Sumner, E.R., Shanmuganathan, A., Sideri, T.C., Willetts, S.A., Houghton, E.J., Avery, S. 2005. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiol* 151(Pt 6): 1939-1948.
- Tao, Y., G. A. Marzluf. 1998. Synthesis and differential turnover of the CYS3 regulatory protein of *Neurospora crassa* are subject to sulfur control. *J Bacteriol* 180(3):478-482.
- Tokunaga, T.K., Wan, J., Firestone, M.K., Hazen, T.C., Olson, K.R., Donald, J. Herman, D.J. Sutton, S.R., Lanzirrotti, A. 2003. Bioremediation and Biodegradation. In situ reduction of chromium(VI) in heavily contaminated soils through organic carbon amendment. *J Environ Qual* 32(5):1641-1649.
- Van de Kamp, M., Schuurs, T.A., Vos, A., Van der Lende, T.R., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. 2000. Sulfur regulation of the sulfate transporter genes *sutA* and *sutB* in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4536-4538.
- Villegas, L.B., Fernández, P.M., Amoroso, M. J., de Figueroa, L. I.C. 2008. Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina. *BioMetals* 21(5):591-600.
- Volesky, B., Holan, Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol Prog* 11(3):235-250.
- Wong, P.T., Trevors, J.T. 1988. Chromium toxicity to algae and bacteria. In: Nriagu, J.O., Nieboer, E. Eds. Chromium in the Natural and Human Environments. Wiley, New York, pp 305-315.
- Yin, H., He, B., Peng, H., Ye, J., Yang, F., Zhang, N. 2008. Removal of Cr(VI) and Ni(II) from aqueous solution by fused yeast: study of cations release and biosorption mechanisms. *J Hazard Mater* 158(2-3):568-576.
- Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol* 98(13):2557-2561.