

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Magíster en Salud Ambiental

“ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE METALES  
CONTAMINANTES SOBRE EL CRECIMIENTO DE  
*ESCHERICHIA COLI*: EFECTO DEL CROMO,  
PLOMO Y CADMIO EN SOLUCIÓN.”

Bioq. Ricardo Azario

Director de Tesis: Dra. María del Carmen García  
Co-Directora: Dra. Emilce Mendez  
Lugar y realización: Departamento de Materias Básicas  
Facultad Regional Concepción del Uruguay  
Universidad Tecnológica Nacional

2014

## Índice

Abreviaturas y símbolos	3
Índice de figuras	5
INTRODUCCION	7
Contaminantes en el ambiente	8
Metales pesados	14
El plomo: características y comportamiento en el ambiente	17
El cadmio: características y comportamiento en el ambiente	26
El cromo: características y comportamiento en el ambiente	35
Cromo: Efecto en microorganismos	50
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
RESULTADOS	67
DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	77
RESUMEN	85
BIBLIOGRAFÍA	89
AGRADECIMIENTOS	120

**Abreviaturas y símbolos**

ADN: ácido desoxirribonucleico

acil-CoA: acil-coenzima A

ALAD:  $\delta$ -aminolevulánico deshidrogenasa

CAT: catalasa

Ca: símbolo químico de calcio

$\text{Ca}^{2+}$ : catión calcio

Cd: símbolo químico de cadmio

$\text{Cd}^{2+}$ : catión cadmio

$\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$ : ión tetraciano cadmiato (II)

$\text{CdCO}_3$ : carbonato de cadmio

$\text{Cd}(\text{NH}_3)_6^{4+}$ : ión hexaamino de cadmio (II)

$\text{Cd}(\text{OH})_2$ : hidróxido de cadmio

CdS: sulfuro de cadmio

Cr(III): cromo trivalente

Cr(V): cromo pentavalente

Cr(VI): cromo hexavalente

Cr: símbolo químico de cromo

Cu: símbolo químico de cobre

CysK: cisteina sintetasa A

CysN: sulfato adenil tranferasa

EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

Eh: potencial redox

Fe: símbolo químico de hierro

$\text{Fe}^{2+}$ : catión ferroso

$\text{Fe}^{3+}$ : catión férrico

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

Hg: símbolo químico de mercurio

IRT 1: transportador férrico

Kd: constante de disociación

Km: constante de Michaelis Menten

LCT 1: transportador específico de calcio

MDA: malondialdehído

mL: mililitros

MnO<sub>2</sub>: dióxido de manganeso

MTs: metalotioneinas

mV: milivoltios

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

nM: nanomolar

nm: nanómetros

NO: óxido nítrico

Pb: símbolo químico de plomo

PCs: fitoquelatinas

RNS: especies reactivas del nitrógeno

ROS: especie reactivas del oxígeno

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: anión sulfato

SodB: superóxido dismutasa (cadena B ferrica)

SOD: superóxido dismutasa

V<sub>máx.</sub>: velocidad máxima

u.m.a: unidad de masa atómica

ZIP: familia de transportadores de metales

Zn: símbolo químico de zinc

Zn<sup>2+</sup>: catión zinc

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> El movimiento de sustancias tóxicas entre los principales subsistemas del ambiente	11
<b>Figura 2:</b> Via general de bioconcentración	12
<b>Figura 3:</b> Producción y consumo de algunos metales tóxicos desde 1850	15
<b>Figura 4:</b> Especiación del plomo en función de los valores de pH	19
<b>Figura 5:</b> Especiación del cadmio en función del Eh- pH	29
<b>Figura 6:</b> Esquema general de los efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular	35
<b>Figura 7:</b> Diagrama de las especies predominantes del cromo (VI)	37
<b>Figura 8:</b> Especiación del cromo en función del Eh- pH	38
<b>Figura 9:</b> Diagrama del potencial de reducción del cromo en sistemas acuosos	39
<b>Figura 10:</b> Ciclo del cromo en el ambiente	40
<b>Figura 11:</b> Reducción y fijación del cromo	41
<b>Figura 12:</b> Captación y daño del ADN por cromo hexavalente	48
<b>Figura 13:</b> Reductores biológicos de Cr(VI) y sus reacciones	49
<b>Figura 14:</b> Diagrama esquemático que muestra las posibles vías de reducción anaeróbicas de Cr(VI) por tres grupos de bacterias	56
<b>Figura 15:</b> Modelo que muestra la reducción de Fe(III) mediado por ácidos húmicos	57
<b>Figura 16:</b> Modelo de Quinona	57
<b>Figura 17:</b> Efecto de cromo trivalente sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	68
<b>Figura 18:</b> Efecto de cromo hexavalente sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	69
<b>Figura 19:</b> Efecto de plomo sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	70
<b>Figura 20:</b> Efecto de cadmio sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	70

<b>Figura 21:</b> Estimulación del crecimiento bacteriano inducido por bajas concentraciones de cromo	71
<b>Figura 22:</b> Inhibición del crecimiento bacteriano inducido por concentraciones altas de cromo	72
<b>Figura 23:</b> Velocidad de crecimiento específico de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 expuestas a cromo (VI) durante 72 horas	73
<b>Figura 24:</b> Efecto del cromo sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 adaptadas a diferentes concentraciones de cromo (VI) durante 72 horas	74
<b>Figura 25:</b> Capacidad de reducción de cromo (VI) en <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 adaptadas a cromo (VI) durante 72 horas	74
<b>Figura 26:</b> Análisis temporal del efecto de cromo en <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 adaptadas a cromo (VI) durante 72 horas	75
<b>Figura 27:</b> Efecto del cromo sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> adaptadas a 25 pp, de cromo durante 120 horas	76

# INTRODUCCION

## **Contaminantes en el ambiente**

Existen numerosos tipos de sustancias contaminantes procedentes de fuentes antropogénicas o de fuentes naturales que pueden producir alteraciones en los ecosistemas. Ejemplos de tales sustancias tóxicas naturales son el sulfuro de hidrógeno a partir de fuentes geotérmicas o los metales, como el plomo, a partir de lixiviados de minerales (Manahan, 2007).

Dentro de los compuestos inorgánicos se centraliza en los metales pesados por no ser biodegradables a diferencia de los compuestos orgánicos. La mayoría de ellos forman compuestos poco solubles como hidróxidos, carbonatos o sulfuros y por lo tanto, tienden a acumularse en los sedimentos. Por otro lado, varias especies inorgánicas no metálicas pueden actuar como sustancias tóxicas que afectan a los ecosistemas. Los derrames de sales de iones cianuro de las actividades mineras han esterilizado temporalmente pequeños arroyos. El ión nitrato en el agua de pozo contaminada puede ser reducido a ión nitrito en los estómagos de los rumiantes y los niños. El nitrito convierte el hierro (II) de la hemoglobina a hierro (III), produciendo así metahemoglobina, que no transporta oxígeno en la sangre. Los niveles excesivos de dióxido de carbono en el agua o en el aire pueden ser perjudiciales e incluso fatales. Tóxicos orgánicos persistentes son, posiblemente, los contaminantes de mayor preocupación en lo que respecta a la ecotoxicología, debido a su capacidad para bioacumularse en los tejidos grasos y llegar a ser cada vez más bioconcentrados a través de las cadenas alimentarias. El más común de tales compuestos persistentes es el 1, 1, 1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) que fue ampliamente utilizado como un insecticida a mediados de los años 1900 (Haskell, 1998).

Otra clase de agentes tóxicos orgánicos consiste en compuestos relativamente biodegradables, muchos de los cuales se han utilizado como insecticidas y herbicidas. Una clase común de tales compuestos son los insecticidas organofosforados, los carbamatos, las piretrinas y sus análogos sintéticos, los piretroides. Estas sustancias pueden tener algunos efectos ecotoxicológicos debido a su toxicidad, pero son motivo de preocupación relativamente menor porque se biodegradan antes de lograr bioacumularse.

Los tóxicos gaseosos que se producen como contaminantes del aire pueden tener algún efecto ecotoxicológico significativo. Cabe destacar, entre estos



contaminantes el óxido nítrico y óxido nitroso asociados a la niebla fotoquímica. Un componente de contaminación especialmente dañina es la capa de ozono, que puede ser muy perjudicial para las plantas, reduciendo en gran medida la productividad fotosintética de los ecosistemas.

Las vías principales de ingreso de las sustancias tóxicas a los ecosistemas son a través del agua, los alimentos, el suelo y el aire. Con el fin de caracterizar el comportamiento ecotoxicológico de sustancias tóxicas, es necesario comprender el movimiento de dichas sustancias entre y dentro del agua, aire, suelo, y compartimentos vivos del ambiente. Asimismo considerar cómo tales sustancias tóxicas se metabolizan, degradan, concentran, y se almacenan dentro de estos compartimentos. La quimiodinamia de productos químicos del ambiente debe considerar los factores bióticos y los factores abióticos, tales como la temperatura, el viento, el flujo de agua y la luz solar (Manahan, 2007).

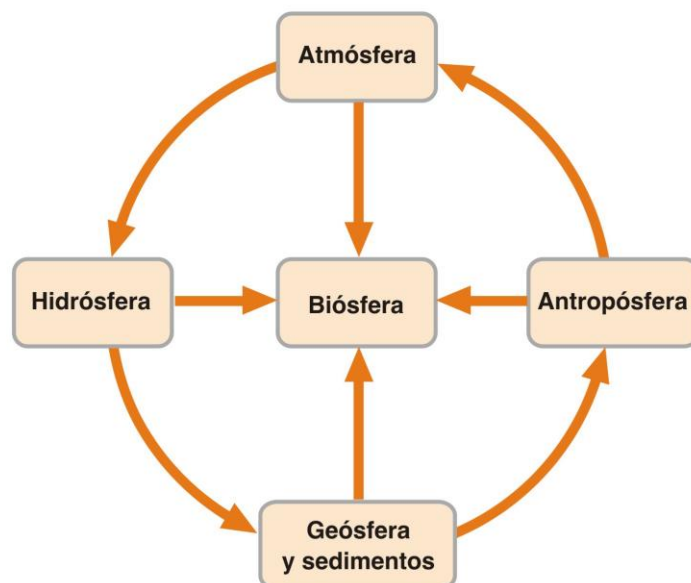
En su mayor parte, el agua que afecta a los ecosistemas es agua superficial de arroyos, lagos, lagunas y otros cuerpos de agua. El agua retenida en los sedimentos de los cuerpos de aguas puede ser un importante reservorio de sustancias tóxicas. El agua en los acuíferos subterráneos podría liberarlos hacia las fuentes superficiales, donde pueden entrar en contacto con los organismos (Baird, 2005).

Las actividades antropogénicas son una fuente importante de contaminación del agua. Las aguas residuales sin tratar proporcionan elevadas concentraciones de sustancias orgánicas que consumen oxígeno al biodegradarse. Las aguas residuales tratadas, por lo general biológicamente, pueden contener materia orgánica residual, sales y otros materiales. El lodo formado a partir del tratamiento biológico de aguas residuales a menudo se propaga en la tierra y los contaminantes pueden ingresar al agua. Los efluentes industriales liberados de modo incorrecto a los cuerpos receptores de aguas naturales pueden ser fuente de contaminantes orgánicos y metales pesados. Además, los tóxicos pueden entrar en los organismos por medio de la alimentación. En algunos casos, los residuos de pesticidas u otros compuestos orgánicos tóxicos aplicados a los cultivos de alimentos pueden ser ingeridos por los animales e incluso por los seres humanos. En la naturaleza, las sustancias tóxicas pueden ingresar en la cadena alimentaria. Este fenómeno fue el responsable de los niveles tóxicos de DDT y otras sustancias tóxicas

poco biodegradables que alcanzaron una elevada concentración en las aves de presa que pertenecen al eslabón superior de la cadena alimentaria, casi causando la extinción de algunos tipos de aves rapaces. La exposición a sustancias tóxicas provenientes de fuentes terrestres es muy común debido a la asociación íntima entre los animales y plantas que viven sobre la tierra. Las prácticas agrícolas modernas requieren la aplicación de grandes cantidades de herbicidas y otros pesticidas a las plantas y el suelo, residuos de estas sustancias pueden entrar fácilmente a los organismos vivos (Haskell, 1998).

El suelo es el depositario de una gran variedad de contaminantes provenientes de la eliminación inadecuada de los desechos industriales y xenobióticos a partir de sitios de desechos peligrosos. Los animales y las plantas, en consecuencia, están expuestos a sustancias tóxicas presentes en la atmósfera. Existen numerosas fuentes de xenobióticos en las emisiones directas de industrias y motores que pueden contaminar la atmósfera con materiales orgánicos tóxicos, sustancias ácidas y metales pesados. Algunos contaminantes atmosféricos nocivos son contaminantes secundarios formados por procesos químicos de la atmósfera. Los ácidos fuertes responsables de la lluvia ácida son formados por oxidación atmosférica de gases inorgánicos, especialmente dióxido de azufre (formación de ácido sulfúrico) y óxidos de nitrógeno (formación de ácido nítrico). Bajo condiciones apropiadas de aire estancado, baja humedad e intensa luz solar, los hidrocarburos reactivos y los óxidos de nitrógeno emitidos por los tubos de escape de automóviles forman una variedad de aldehídos orgánicos nocivos y oxidantes, así como ozono, los cuales son tóxicos para las plantas y los animales (Manahan, 2007).

Un aspecto importante de las sustancias tóxicas relacionadas con la ecotoxicología son sus ciclos biogeoquímicos en los cuales existe una transferencia entre los diferentes subsistemas del ambiente, la atmósfera, la hidrosfera, la geosfera, la biosfera, y antroposfera (*es la parte del medio ambiente modificado por el hombre como consecuencia de las actividades y los hábitats humanos*) (Figura 1).



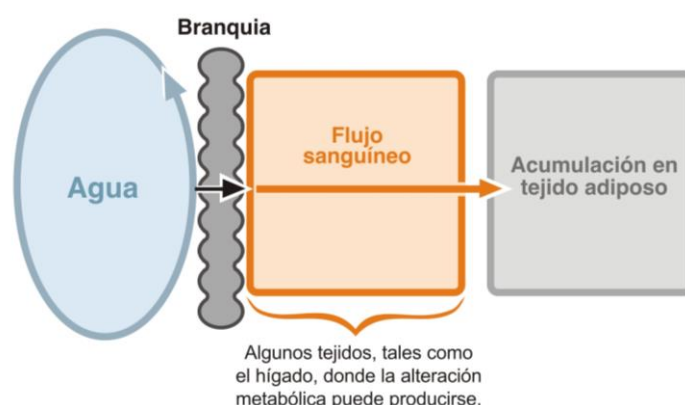
**Figura 1** | El movimiento de sustancias tóxicas entre los principales subsistemas del ambiente.

En general, las sustancias tóxicas ingresan a la atmósfera por evaporación, los sólidos en la geosfera por adsorción, y en la hidrosfera por disolución. Los movimientos de sustancias entre la atmósfera y otros subsistemas son muy influenciado por la presión de vapor de la sustancia (aquellas con mayores presiones de vapor tiene una mayor tendencia a permanecer en la atmósfera) y la temperatura. Debido a la baja viscosidad y la circulación constante del aire las sustancias tóxicas tienden a ser mucho más móvil en la atmósfera que en el resto del ambiente. Un aspecto interesante es la tendencia de ciertos compuestos orgánicos volátiles a evaporarse en la atmósfera de regiones más cálidas y luego condensarse en las zonas montañosas frías, que a menudo reciben una dosis alta de tóxicos orgánicos, a pesar de encontrarse alejadas de las fuentes industriales de contaminación. La baja solubilidad en agua se asocia con la tendencia de las sustancias a acumularse en los sedimentos y el suelo, mientras que sustancias altamente solubles pueden ser transportados fácilmente por el agua. Las sustancias que presentan alta solubilidad en lípidos y baja solubilidad en agua tienden a acumularse en tejidos grasos de los animales en la biosfera (Manahan, 2007).

Un aspecto crucial en el intercambio de sustancias tóxicas entre los subsistemas del ambiente es la transferencia de tóxicos a los organismos de la biosfera. Las vías de exposición a xenobióticos pueden dividirse en tres categorías generales: vía oral a través de alimentos o agua, la vía inhalatoria y la vía por contacto de piel y mucosas. Los tóxicos persistentes, lipofílicos, pobremente metabolizados tienden a persistir y aumentar su concentración en los niveles tróficos superiores, esto puede llevar a la biomagnificación de xenobióticos en los organismos superiores de la cadena alimentaria. (Manahan, 2007).

Una consideración importante en la absorción de sustancias tóxicas por los organismos es la biodisponibilidad de diversas sustancias, que es básicamente la tendencia de una sustancia a entrar en el sistema de un organismo tras la exposición. La biodisponibilidad de plomo ha sido estudiado en gran medida y varía significativamente con la forma química del plomo. El mercurio inorgánico, soluble en agua, es muy tóxico cuando se ingiere; el vapor de mercurio metálico es fácilmente absorbido por los pulmones. La dosis letal del dimetilmercurio se absorbe por la piel debido a su elevada liposolubilidad.

La tendencia de una sustancia química para dejar una solución acuosa y entrar en una cadena alimentaria es importante en la determinación de sus efectos ambientales y se expresa a través del concepto de bioconcentración. La bioconcentración (Figura 2) puede ser vista como un caso especial de la bioacumulación en la que una sustancia disuelta es selectivamente captada de una solución de agua y se concentra en el tejido alcanzando niveles tisulares mayores a la fuente de exposición.



**Figura 2** | Vía general de bioconcentración

La bioconcentración se aplica específicamente a la concentración de xenobióticos en el agua y en los organismos que viven en el agua, especialmente los peces. Como se ilustra en la Figura 2, el modelo de bioconcentración se basa en un proceso por el cual los contaminantes del agua atraviesan el epitelio branquial de los peces y son transportados por la sangre hacia el tejido graso, que sirve como un almacenamiento de sustancias hidrofóbicas. El transporte a través de la sangre se ve afectado por varios factores, incluyendo el flujo sanguíneo y la unión a proteínas plasmáticas. Antes de alcanzar el tejido adiposo, algunos de los compuestos pueden ser biotransformados a nivel hepático. La bioconcentración de una sustancia es más favorable si es absorbida y eliminada a través de los procesos de transporte pasivo; si se metaboliza lentamente o no se metaboliza y si posee una solubilidad en lípidos relativamente alta.

Un aspecto crucial de la ecotoxicología es la medición de los efectos de sustancias tóxicas en los organismos de los ecosistemas y de los ecosistemas en su conjunto. Esto se ha hecho tradicionalmente mediante la determinación de los niveles de sustancias tóxicas en los organismos y relacionar estos niveles a los efectos perjudiciales sobre los organismos. Debido a factores tales como las alteraciones bioquímicas de sustancias tóxicas, las correlaciones entre los niveles de sustancias tóxicas y los efectos tóxicos observados son a menudo imposibles de alcanzar. Un mejor enfoque es el uso de biomarcadores que consiste en observaciones y mediciones de las alteraciones en los componentes biológicos, estructuras, procesos o comportamientos atribuibles a la exposición de las sustancias xenobióticas. Los biomarcadores pueden utilizar a menudo animales y otros organismos para inferir los riesgos químicos para los seres humanos. Los biomarcadores se pueden dividir en tres categorías principales: la exposición, los efectos o la susceptibilidad (Manahan, 2007).

Un biomarcador de exposición a una sustancia xenobiótica es un cambio medible a nivel bioquímico, fisiológico o morfológico o un efecto directamente atribuible a dicho xenobiótico en un organismo. Los xenobióticos o sus metabolitos se pueden medir directamente en los tejidos obtenidos por biopsia de organismos vivos o de necropsia de los organismos muertos. La orina, sangre, aire exhalado, las heces y la leche materna también pueden servir

como muestras y son ventajosas dado que las mediciones se pueden hacer a intervalos durante un período de tiempo.

### **Metales pesados**

Los metales pesados son elementos químicos con un peso específico al menos cinco veces el del agua. Algunos elementos metálicos tóxicos conocidos que cumplen con dichas características son: el arsénico (5,7 veces), el cromo (6,7), el hierro (7,9), el cadmio (8,65), el plomo (11,34), y el mercurio (13,54) (Järup, 2003).

Los metales pesados son normalmente clasificados en las siguientes categorías: *metales tóxicos* (mercurio, cromo, plomo, zinc, cobre, níquel, cadmio, arsénico, cobalto, estaño), *metales preciosos* (paladio, platino, plata, oro, rutenio) y *radioactivos* (uranio, torio, radio, americio) (Bishop, 2002).

Las fuentes naturales de las cuales provienen los metales pesados son el desgaste de cerros y la actividad volcánica. Las actividades antropogénicas que constituyen fuentes generadoras de metales pesados son: las refinерías, las aguas residuales, los procesos nucleares y la producción de fertilizantes, plaguicidas, baterías y aleaciones de metales. La minería es una de las actividades que más contribuye a la contaminación por metales pesados en el ambiente debido a las sustancias tóxicas que se generan durante el proceso de extracción y separación de los minerales (Järup, 2003).

Una fuente de exposición la constituye la atmósfera, la cual se encuentra contaminada por diversos metales en forma de polvos, humos o aerosoles suspendidos en el aire y que son respirados por las personas. Estas partículas de metales tienen con frecuencia origen industrial, procedentes de combustiones fósiles y por su presencia en los combustibles líquidos.

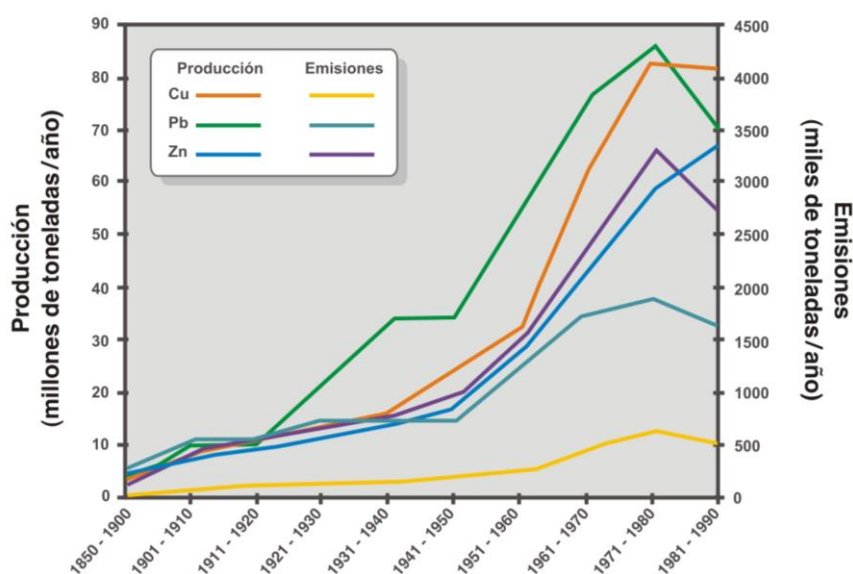
Existen elementos metálicos en el agua, procedentes de las actividades industriales de la minería y de las aguas residuales no tratadas, los cuales contaminan las aguas subterráneas, los ríos, los arroyos, los lagos y las lagunas (Licsko y col., 1999).

En los alimentos se pueden encontrar elementos metálicos cuya presencia es imprescindible, conocidos como metales esenciales, pero resultan tóxicos cuando su concentración excede determinados límites o son metales peligrosos para la salud humana.

Algunos metales son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo en concentraciones traza como por ejemplo: hierro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, selenio, cromo, y níquel. Dentro de los metales considerados pesados, el cobre es un elemento esencial en la actividad de enzimas y proteínas así como en los procesos relacionados con la reproducción. El cromo es un metal que funciona como cofactor relacionado con la respuesta de la insulina en el metabolismo de los carbohidratos. El zinc es un elemento importante en varios procesos metabólicos como en la síntesis proteica, en la regulación del equilibrio ácido-base, en el desarrollo de los sistemas nervioso y óseo embrionario. Asimismo, el níquel es un metal esencial en el hombre porque contribuye al funcionamiento óptimo del páncreas.

Sin embargo, existen metales pesados que no son esenciales para el funcionamiento del organismo y pueden causar graves daños a la salud como en el caso del plomo, el arsénico, el cadmio y el mercurio (Järup, 2003). Por lo tanto, lo que caracteriza la toxicidad de los metales es la concentración en la cual se encuentra y el tipo de especie química que puede formarse en un determinado medio.

La producción de metales pesados ha crecido a través del tiempo en forma exponencial. Por ejemplo, entre 1850 y 1990, la producción de cobre, plomo y zinc aumentó casi diez veces, como puede apreciarse en la Figura 3 (Nriagu, 1996).



**Figura 3** | Producción y consumo de algunos metales tóxicos desde 1850 (Nriagu, 1996)

Los metales pesados han sido utilizados en diferentes áreas por cientos de años. Por ejemplo, el plomo se ha empleado en las instalaciones de tuberías, en materiales de construcción, y también para el control de insectos en manzanos. Los romanos añadían plomo al vino para mejorar su gusto, y el mercurio fue utilizado como bálsamo para aliviar el dolor en los dientes de los niños (Eaton y Robertson, 1994; Silver y Rothman, 1995). Claude Monet usó pigmentos de cadmio a mediados del siglo XIX, pero la escasa disponibilidad de este metal limitó su uso con fines artísticos hasta comienzos del siglo XX.

La exposición a los metales pesados puede ocasionar trastornos en el desarrollo, alteraciones en los sistemas respiratorio, cardiovascular, reproductor y en la respuesta inmunológica, entre otros. A pesar de la evidencia de los efectos deletéreos en la salud, la exposición a los metales pesados continúa, pudiendo aumentar en ausencia de acciones y políticas concretas.



## **PLOMO: CARACTERÍSTICAS Y COMPORTAMIENTO**

El plomo (Pb) pertenece al grupo IV-A de la tabla periódica y tiene un peso atómico de 207,19, un punto de fusión 327,5 °C y un punto de ebullición 1740,0 °C. Su estructura en estado metálico es cristalina cúbica con una densidad de 11,34 g/cm<sup>3</sup>. Tiene dos estados de oxidación, II y IV (formas estables). La especie química que se suele encontrarse en el ambiente es Pb<sup>2+</sup>. Entre los compuestos de Pb hay compuestos solubles (nitratos), compuestos poco solubles en agua (cloruro y bromuro), y compuestos casi insolubles (carbonato e hidróxido) (Manahan, 2002).

### **Plomo en el ambiente**

El plomo se obtiene de las minas de galena y se separa calentando el mineral a bajas temperaturas. El plomo se ha usado desde la antigüedad y, a lo largo de los siglos, se han evidenciado sus efectos tóxicos. El acetato de plomo (II) (también conocido como azúcar de plomo) fue utilizado por el Imperio Romano como edulcorante para el vino, y algunos consideran que fue la causa de demencia que afectó a varios emperadores romanos.

El plomo es un elemento traza (< 0,1 %) de rocas y suelos. El contenido de Pb en rocas varía dependiendo de la naturaleza de la misma y aumenta en proporción al contenido en silicio. La similitud entre los radios iónicos de Pb<sup>+2</sup> (1,32Å) y K<sup>+</sup> (1,33Å), frecuente en los silicatos, justifica que se produzca un reemplazo del potasio por plomo en las redes de silicatos, lo que produce un incremento de plomo en las rocas ígneas, de ultrabásicas a ácidas.

Además, el plomo en su forma divalente, puede reemplazar en la estructura mineral al estroncio, bario e incluso al calcio y sodio (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). Esto hace que minerales como el feldespato potásico y rocas como las pizarras, sean grandes acumuladores de plomo. Respecto a los minerales, existen más de 200 tipos de minerales que contienen Pb, aunque no son muy comunes. Los más conocidos, por su interés comercial, son galena (PbS), cerusita (PbCO<sub>3</sub>) y anglesita (PbSO<sub>4</sub>).

El plomo es un contaminante altamente extendido por estar estrechamente ligado a actividades humanas de carácter industrial, energético y de transporte (Shparyk y Parpan, 2004; Yongming y col., 2006; Micó y col., 2007). Llega al suelo procedente de fuentes diversas como la minería, fundiciones,

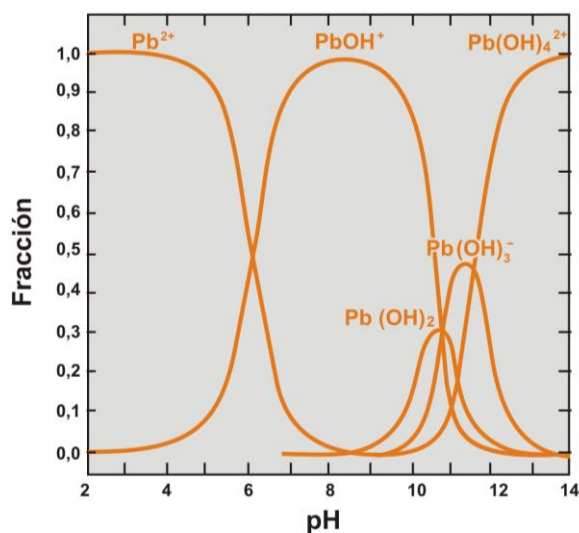
aplicaciones de lodos y tráfico (Andrade et al., 1985; Olendrynski y col., 1995). Su principal vía de transporte es la atmosférica por lo que le convierte en un contaminante altamente extendido (Olendrynski y col., 1995; Steinnes y col., 2005). También ha sido utilizado en cultivos arbóreos como insecticida (arsenato de plomo,  $\text{PbHAsO}_4$ ), aunque estos productos actualmente han sido sustituidos por pesticidas orgánicos. La industria del automóvil, hasta la década del 90, y el sector de la construcción han sido dos de las fuentes contaminantes más importantes llegando a emplear cerca del 60% del Pb consumido. En la industria del automóvil el Pb se utilizaba tanto para la construcción de piezas, como para aditivo de las naftas. La cantidad añadida a las gasolinas variaba entre 0,4 g/L y 0,6 g/L, a partir del uso de catalizadores se comenzó a imponer el uso de naftas sin plomo, viéndose reflejada esta sustitución en la reducción de las emisiones de Pb (Yanai y col., 2004; Pacyna y col., 2007). Industrialmente los óxidos de plomo y el tetraetilo de plomo,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{Pb}$ , son los compuestos de Pb más importantes. En el sector de la construcción, el Pb se utiliza como componente de muchos elementos como tuberías, cerámicas, pinturas, etc. (Melamed y col., 2003). El uso de lodos como fertilizantes en las tierras de cultivo es otra de las fuentes de contaminación por Pb, ya que estos suelen contener grandes cantidades de metales pesados (Baveye y col. 1999; Pérís Mendoza, 2006).

El plomo emitido al ambiente tiene en el suelo uno de los principales receptores de este contaminante, pero además se considera uno de los reservorios más importante por su alta capacidad para retener este metal. La retención de Pb por el suelo supone un freno inmediato a la contaminación de la vegetación y del agua subterránea. Sin embargo, esta capacidad es limitada y un aporte de contaminante no controlado podría superar dicha capacidad y convertir en tóxico al medio edáfico y, por tanto, pasar de ser un reservorio a ser fuente de contaminación de otros compartimentos del sistema como los seres vivos, o las aguas subterráneas (Bourg y Loch, 1995; Schulín y col. 1995; Davies y col. 2003). También una modificación de las características físico-químicas del medio, por ejemplo lluvia ácida, podría movilizar al metal sorbido en ese suelo (Lacatusu y col., 1999).

El plomo puede formar distintas fases minerales como óxidos, hidróxidos, fosfatos, carbonatos, silicatos y sulfuros. Este tipo de reacciones viene dado

por las condiciones físico-químicas presentes en el suelo como pH, potencial redox (Eh), temperatura, presión, concentraciones de iones en solución, etc. Un pH alto del suelo precipitaría el Pb como hidróxido, fosfato, o carbonato, o favorecería la formación de complejos organometálicos. Mouni y col. (2009) observan una estrecha relación entre la solubilidad del Pb en suelos contaminados, el pH y la concentración del metal.

La forma en que se encuentre el Pb en la solución también puede variar según varíe el pH (Figura 4). Conforme aumenta el pH el  $\text{Pb}^{2+}$  comienza a hidrolizarse formando distintos hidroxio-compuestos. Así, el  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  presenta concentraciones importantes a pH por encima de 9, mientras que  $\text{PbOH}^+$  predomina en el rango de pH entre 6 y 10.



**Figura 4** | Especiación del plomo en función de los valores de pH.

### Plomo en plantas y animales

El Pb no es un elemento esencial para el metabolismo de las plantas, una concentración en ellas superior a 5 ppm indicaría una contaminación de las mismas, habiéndose detectado efectos a concentraciones superiores a 30 mg/kg en la parte aérea de las plantas (Barceló y Poschenrieder, 1992). La contaminación de Pb en la biota está influida por las características edáficas, ya que altos valores de pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), contenidos en materia orgánica o arcillas disminuyen el metal disponible para la vegetación (Salomons y Stigliani, 1995; Hermle y col., 2006).

Varios estudios han demostrado que la mayor parte del plomo absorbido permanece en las raíces, lo que hace que la raíz sea la primer barrera para el desplazamiento de Pb a las partes de la planta sobre el suelo (Blaylock y Huang, 2000). Una vez dentro de las raíces, la mayor parte del plomo se une a sitios iónicos intercambiables en las paredes celulares y precipitación extracelular como fosfato y carbonato (Sharma y Dubey, 2005). El Pb no unido se mueve a través de los canales de calcio (Ca), acumulándose cerca de la endodermis (Huang y Cunningham, 1996; Antosiewicz, 2005). Resultados experimentales previos sugieren que en baja concentración, la banda de Caspari de la endodermis es una barrera parcial para el movimiento de Pb en el tejido cilíndrico central (Seregin y col., 2004). Varga y col. (1997) encontraron que en las raíces de trigo, el Pb se fija a la pared celular pero puede ser eliminado formando un complejo con ácido cítrico. Sin embargo, Marmioli y col. (2005) informaron que en el nogal europeo (*Juglans regia*) el Pb se conserva en la estructura lignocelulósica de las raíces. Según lo descrito por Cobbett (2000), el Pb, al igual que otros elementos tóxicos, está complejoado con polipéptidos ricos en cisteína de bajo peso molecular ampliamente conocido como fitoquelatinas. Sin embargo, en *Sesbania drummondii* el Pb es transportado a los tallos y hojas en estructuras similares a las de acetato de Pb, nitrato de Pb, y sulfuro de Pb (Sharma y col., 2004a,b). Además, López y col. (2007, 2009) han reportado la formación de complejos de Pb diferentes en tallos y hojas de alfalfa. En resumen, los distintos compuestos que forma el plomo en las plantas son: acetato de plomo, fitoquelatinas de plomo, nitrato de plomo, sulfuro de plomo y citrato de plomo (Cobbett (2000), Sharma y col. (2004a,b), Lopez y col. (2009)

La acidificación de los sistemas acuáticos es un factor importante en la toxicidad del Pb. En huevos y larvas de la carpa común (*Cyprinus carpio*) expuestos a plomo a pH 7,5 no se observaron diferencias significativas en la mortalidad en comparación con el control. A pH 5,6 no hubo mortalidad significativa en los huevos expuestos a Pb, pero las larvas mostraron una mortalidad significativa en todos los niveles de tratamiento. Además, un cambio importante en el comportamiento de la natación se observó en las larvas expuestas; la mayoría se ven acostadas en la parte inferior de la cámara de prueba, a diferencia de los controles que nadan libremente. La exposición al

plomo también influyó en los latidos del corazón y los movimientos de la cola, el aumento del ritmo cardíaco y los movimientos de la cola se redujeron con el aumento de las concentraciones de Pb. Estudios posteriores demostraron que la absorción de Pb y acumulación aumenta con la disminución de los valores del pH (Bianchi y Levis, 1984).

La influencia de Pb en peces de agua dulce también es variable, dependiendo de las especies expuestas. Por ejemplo, los peces de colores son relativamente resistentes al Pb, que puede ser debido a su profusa secreción branquial. Como se mencionó anteriormente, la ingestión de perdigones de plomo presente en los lagos causa la muerte de un gran número de aves en EE.UU. como consecuencia de la inanición.

### **El plomo en la red trófica**

De acuerdo con Ma (1996) la principal vía de exposición de plomo en los seres humanos y mamíferos es a través de la cadena alimentaria. Este autor señaló que en la vida silvestre, una concentración de Pb en hígado mayor a 10 µg/g de peso seco o una concentración de Pb en riñón superior a 25 µg/g de peso seco puede ser considerada como criterio de intoxicación aguda por plomo. Laskowski y Hopkins (1996) reportaron que el caracol de jardín (*Helix aspersa*) puede acumular hasta un 43% de Pb de los alimentos, principalmente en el tejido blando, que puede ser de gran preocupación para la cadena alimentaria. En un estudio realizado en Tarragona, España, Capdevila y col. (2003) reportaron un contenido de plomo promedio de 0,073 µg/g en los vegetales comestibles. Los autores estimaron que las legumbres y hortalizas (principalmente cebollas y perejil) contribuyen a la ingesta diaria total de plomo en 14,6 µg. Se han realizado también estudios detallados en animales. Anders y col. (1982) utilizaron palomas *Carneaux* adultas blancas que recibieron Pb inorgánico (6,25 mg de Pb/kg de peso seco por día, por intubación gástrica) durante un máximo de 64 semanas y encontraron que estas aves tenían una anemia hipocrómica normocítica marcada y rápida, así como una elevación de la porfirina eritrocitaria. Por otro lado, en halcones de cola roja tratados con acetato de plomo (0,82 mg/ kg por día durante 3 o 11 semanas) desarrollaron una alteración en la ruta biosintética del grupo hem después de la primera semana de tratamiento. Además, la actividad de la δ-aminolevulánico sintetasa

eritrocitaria se redujo significativamente, y alcanzó los valores de actividad previos al tratamiento después de 5 semanas de la finalización de la exposición (Redig y col., 1991). Ku y col. (1978) observaron en ratas alimentadas con 300 ppm de Pb (como acetato de plomo y Pb unido a fosfolípidos) que la acumulación del tóxico en los tejidos y en los huesos era similar. En los seres humanos Quintanilla-Vega y col. (1995) reportaron la presencia de una proteína citosólica que es responsable de la unión de Pb al cerebro con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 1 nM. Otros investigadores han informado que en los seres humanos, dos polipéptidos, timosina y acil-CoA, son responsables de la unión de Pb a los riñones (Smith y col., 1998). Estos investigadores reportaron que estas proteínas de unión de Pb tienen una  $K_d$  aproximadamente de 14 nM, y representan más del 35% del Pb en el tejido de la corteza renal. Además, Vyskocil y col. (2009) informaron que en los seres humanos existe una correlación entre la exposición al plomo y la pérdida en la audición.

Los efectos tóxicos del plomo son actualmente bien conocidos y la máxima concentración aceptada, para el agua de bebida está fijada en todos los países del mundo a niveles muy bajos. La guía de la Organización Mundial de la Salud fija la concentración máxima de plomo para el agua de consumo en un valor de 10  $\mu\text{g/L}$  a partir de diciembre de 2013. De hecho cuando el agua sale de la planta de tratamiento está libre de contenido de plomo, la contaminación ocurre cuando el agua fluye a través de tuberías que contienen plomo en su estructura (Subset, 2003).

Los compuestos orgánicos de plomo pueden bioacumularse en plantas y animales. El plomo se bioacumula en los organismos, en particular, en la biota que se alimenta principalmente de partículas, pero la biomagnificación de plomo inorgánico en la cadena alimentaria acuática no es aparente, pues los niveles de plomo, así como los factores de bioacumulación, disminuyen en el nivel trófico. Esto se explica en parte por el hecho de que en los vertebrados, el plomo se almacena principalmente en el hueso, que reduce el riesgo de transmisión a otros organismos en la cadena alimentaria (Tukker y col., 2001). La distribución de plomo en los animales está estrechamente relacionada con el metabolismo del calcio. En los mariscos, las concentraciones de plomo son mayores en la cáscara rica en calcio que en el tejido blando.

## **Plomo en el ser humano**

Los efectos del plomo en el hombre son conocidos desde la antigüedad, pues su maleabilidad y ductilidad le hacía ser uno de los metales más empleado. La intoxicación por plomo se recoge en textos egipcios (4000 a.C.), y la primera descripción de Hipócrates del cólico saturnino data del año 460 a.C. (Gil Hernández, 2005). El plomo puede causar diferentes efectos dependiendo de la dosis y la ruta de exposición. Es un metal neurotóxico, que puede generar otros efectos como aumento de la presión sanguínea, daños renales, anemias o alteraciones en el crecimiento (Oliver, 1997).

El plomo es un metal tóxico para los seres humanos y animales y es persistente en el ambiente – en agua, suelo, material particulado. Los individuos jóvenes son más susceptibles a la exposición plúmbica, en particular el contacto con pinturas y suelos que contienen plomo representan una seria amenaza para la salud de los niños en todo el mundo (Kumar y Clark, 2009) debido a que la absorción gastrointestinal del metal es mayor en esta población (40-50%) respecto a los adultos (3-10%). La exposición al plomo en niños está relacionada con una disminución de su coeficiente intelectual. El sistema nervioso central (SNC) es el sistema más sensible a la exposición al plomo, quizás no haya para el plomo un umbral mínimo que indique el inicio de efectos neurológicos adversos en los niños. Se han detectado daños neurológicos a niveles de exposición que antes se consideraba que no causarían daño ( $<10 \mu\text{g/dL}$ ) (Canfield, 2003; CDC, 2013).

Los efectos de la exposición aguda al plomo incluyen náuseas, vómitos, encefalopatía con cefaleas, convulsiones, ataxia, letargo, mientras que la exposición crónica causa anemia, dolor abdominal, nefropatía, alteración en las articulaciones de pies y muñecas, encefalopatía (Soghoian y Sinert, 2008).

La distribución del plomo en el organismo es de tipo tri o tetra compartimental según si se considera al hueso como uno o dos compartimientos (uno lábil y otro estable), en equilibrio entre ellos, con distintas vidas medias biológicas (sangre 30-50 días, tejidos blandos 30-60 días, hueso lábil 3-5 años y hueso estable 10-20 años) (López y col., 2005).

El plomo en el suero sanguíneo se une a proteínas o forma complejos con compuestos de bajo peso molecular que contienen grupos sulfhidrilos (por ejemplo, cisteína, homocisteína). Otros ligandos potenciales de Pb en el suero

son el citrato, la cisteamina, la ergotioneína, el glutatión, la histidina y el oxalato (ATSDR, 2007).

La toxicidad del plomo se diagnostica a través de la plumbemia. Los niveles plasmáticos superiores a 10 µg/dL (equivalente a 0,48 µmol/L) se consideran tóxicos y pueden causar trastornos neurológicos, alteraciones cognitivas, hipertensión y otros trastornos (Patrick, 2006a).

### **Plomo y estrés oxidativo**

Al igual que otros metales tóxicos persistentes como el arsénico, cadmio y el mercurio, el plomo daña los componentes celulares a través de un aumento del estrés oxidativo. El efecto patogénico del plomo es multifactorial debido a que afecta directamente la actividad de enzimas, inhibe competitivamente la absorción de minerales trazas importantes y desactiva los *pooles* de grupos sulfhidrilos antioxidantes (Patrick, 2006b).

El daño inducido por plomo a través de radicales libres involucra dos mecanismos independientes pero relacionados entre sí (Ercal y col., 2001). El primer mecanismo implica la formación directa de especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo el oxígeno singlete, peróxidos de hidrógeno e hidroperóxidos, y el segundo mecanismo se produce a través del agotamiento del *pool* antioxidante celular. Ambos mecanismos llevan a un aumento de ROS (Gürer y Ercal, 2000). El glutatión representa más del 90% de la reserva de grupos sulfhidrilos no tisular, y el principal efecto del plomo es en el metabolismo del glutatión (Hunaiti y Soud, 2000). Además, el glutatión es un importante sustrato que actúa en el metabolismo de fármacos y toxinas específicas a través de reacciones de conjugación hepáticas. La exposición a plomo disminuye significativamente los niveles de glutatión en el organismo, y en consecuencia, puede aumentar la toxicidad de otros metales como el arsénico y el mercurio.

El plomo inhibe a dos enzimas específicas, la glutatión reductasa y la  $\delta$ -aminolevulánico deshidrogenasa (ALAD) (Hoffman y col., 2000). Un estudio epidemiológico en la India ha demostrado que niños expuestos a plomo con una plumbemia mayor a 10 µg/dL presentaban niveles significativamente suprimidos de ALAD respecto a niños con una concentración de plomo sérica menor a 7 µg/dL (Ahamed y col., 2005). En trabajadores expuestos al plomo se



observó una correlación directa entre los niveles de plomo en sangre, y la actividad de la ALAD y el nivel de malondialdehído (MDA) eritrocitario. La inhibición de ALAD por niveles elevados de plomo causa un aumento en los niveles del sustrato, MDA, que lleva a la estimulación directa en la formación de ROS.

La glutatión reductasa es una enzima responsable del reciclaje de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), y el plomo al inhibir este ciclo lleva a una depleción del mismo. Se han observado niveles sanguíneos elevados o suprimidos de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Sugawara y col., 1991).

Estudios en modelos animales y poblaciones humanas han demostrado una relación causal entre la exposición al plomo y la hipertensión arterial (Abadín y col., 2007). Dado que varios factores como la ingesta dietética de calcio, exposición a diversas toxinas ambientales, la dieta grasa y la ingesta de alcohol, es difícil separar de forma inequívoca al plomo como un factor de riesgo. Sin embargo, la hipertensión arterial está vinculada con el estrés oxidativo, y además, se ha demostrado que la exposición a bajos niveles de plomo aumenta la producción de ROS. En este sentido, se ha identificado estrés oxidativo inducido por ROS en los pulmones, los espermatozoides, testículos, hígado y cerebro (Hsuand Guo, 2002). En estudios con animales, la formación de ROS causada por la exposición al plomo se ha relacionado con una disminución del recuento de espermatozoides.

Además de ROS, se ha demostrado que las especies reactivas del nitrógeno (RNS) también desempeñan un importante papel en la incidencia de la hipertensión arterial después de la exposición al plomo en los seres humanos (Valko y col., 2007). El óxido nítrico (NO) es conocido como un factor de relajación derivado del endotelio. Las ROS formadas como consecuencia de la exposición al plomo pueden oxidar el NO en el endotelio vascular, y favorecer la formación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) celular que puede dañar el ADN y los lípidos.

La disminución de NO por exposición al plomo en modelos animales causa hipertensión arterial. La disponibilidad de NO puede ser reestablecida mediante el uso de antioxidantes. En ratas hipertensas que presentan un bloqueo de la producción de glutatión, la administración de vitamina E (5000 UI

/kg) y vitamina C (3 mmol/L de agua potable) elimina completamente la hipertensión, restableciendo los niveles de glutatión (Vaziri y col. 2000). En otro modelo animal de hipertensión inducida por el plomo, la administración de la dimetiltiourea, droga que mimetiza la acción de la SOD, suprimió la hipertensión a través de la eliminación de radical superóxido (Vaziri y col., 2001). La administración de metionina con el fin de incrementar los grupos tioles, actúa impidiendo la peroxidación lipídica renal y hepática al reaccionar con las ROS formando metionina sulfóxido (Jomova y col., 2010). La N-acetilcisteína también ha demostrado ser eficaz en la eliminación de las ROS causadas por efecto del plomo.

### **CADMIO: CARACTERÍSTICAS Y COMPORTAMIENTO**

El cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 por el químico alemán Friedrich Stromeyer mientras estudiaba muestras de calamina ( $ZnCO_3$ ) de las incrustaciones de los hornos de zinc.

El Cd pertenece al grupo II-B de la tabla periódica, su peso atómico es de 112,40 uma. Las propiedades físicas principales de este metal son: densidad en agua  $8,642 \text{ g/cm}^3$ , punto de fusión  $321 \text{ }^\circ\text{C}$  y de ebullición  $768 \text{ }^\circ\text{C}$ , una presión de vapor de  $14,8 \text{ Pa}$  a  $324 \text{ }^\circ\text{C}$  (Alessio y col., 1983). Es un metal dúctil, de color blanco plateado, insoluble en agua y resistente a la corrosión.

Puede presentarse con números de oxidación de 0, +1, +2, formando casi todos sus compuestos en el estado de oxidación +2. En la naturaleza no se encuentra como elemento puro sino que puede encontrarse asociado a compuestos de zinc, como la esfalerita ( $ZnS$ ) o en minerales propios como la Greenockita ( $CdS$ ) o la otavita ( $CdCO_3$ ). Además, forma hidróxidos e iones complejos, con el amoníaco,  $Cd(NH_3)_6^{4+}$ , o con el cianuro,  $Cd(CN)_4^{2-}$ .

El cadmio es un metal sin función biológica y puede ser tóxico a niveles relativamente bajos (Kabata-Pendias y Pendias, 1992).

La mayoría del cadmio primario del mundo se produce en China, Japón y la República de Corea, seguidos por Europa Central y Eurasia, América del Norte y Europa Occidental.

## **Cadmio en el ambiente**

Los niveles naturales de Cd son extremadamente bajos. Los informes indican que las concentraciones de Cd en el suelo no contaminado varían de 0,01 a 5 mg/kg de suelo (Kabata-Pendias, 2004). Sin embargo, la contaminación ambiental por Cd se ha incrementado intensamente en las últimas décadas como resultado de su creciente consumo en la industria (Jensen, 1997; Pichtel y col., 2000; Shparyk y Parpan, 2004; Tariq y col., 2006) y su emisión a la atmósfera (Olendrynski y col., 1995). Esta contaminación es una consecuencia inevitable de la minería (Smolders y col., 1999), la industria del metal y de los desechos de las mismas. Se utiliza Cd en la industria galvanotécnica como catalizador, en la fabricación de electrodos negativos de baterías de níquel-cadmio, en fotografía, pinturas y vidrio, en recubrimiento de cobre, hierro y acero por sus propiedades anticorrosivas, en soldaduras de cañerías, en los fertilizantes de fosfatos e incluso se encuentra en el tabaco de los cigarrillos. A diferencia del Pb, Cu y Hg, utilizados durante siglos, el Cd sólo se ha utilizado ampliamente a partir del siglo pasado, más de la mitad de todo el metal utilizado en la industria se ha producido en los últimos 30 años y ha llegado a generar la contaminación de suelos con concentraciones de Cd superiores a 370 mg/kg (Zwonitzer y col., 2003; Cappuyns y col., 2007). La contaminación por Cd además se ha producido, aún antes de ser utilizado comercialmente, debido a su presencia como impureza en una amplia gama de materiales como en los fertilizantes fosfáticos, cuyo uso continuado ha provocado un incremento significativo en contenidos de Cd de los suelos agrícolas. Igualmente, la utilización de lodos de depuradoras urbanas como fertilizantes ha originado un incremento de Cd en suelos de cultivo (Canet y col., 1998).

Este metal es responsable de modificar la composición de las poblaciones microbianas en el suelo y, por ello, de reducir la descomposición de la materia orgánica (Nursita y col, 2009). Se puede acumular en plantas (Barceló y Poschenrieder, 1992; Mench, 1998; Adams y col., 2004; Hermle y col., 2006) y en la fauna edáfica (González y col., 1994) o en animales superiores a través de pastos (Kirkham, 2006) o aguas contaminadas (Madany y col., 1996).

El cadmio es emitido a la atmósfera por fuentes antropogénicas como cadmio elemental y / u óxido de cadmio, algunas fuentes lo emiten como sulfuro o cloruro y en la combustión atmosférica se libera como cadmio elemental

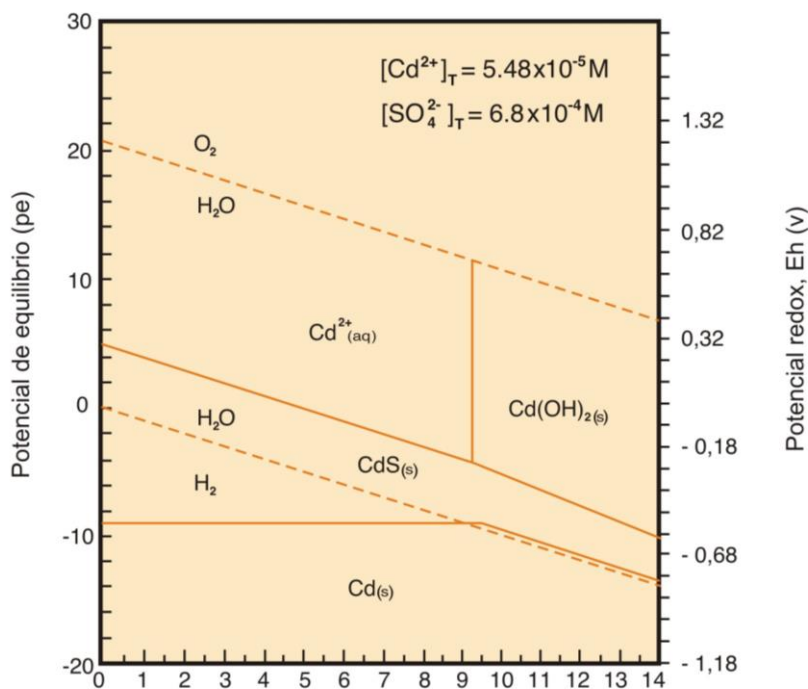
gaseoso. El cadmio y sus compuestos pueden volatilizarse a temperaturas elevadas condensándose rápidamente en el material particulado del aire, y se sabe que esta vía es un medio de transporte del cadmio a la cadena alimentaria de zonas urbanas y rurales muy alejadas.

Como consecuencia de los procesos de bioacumulación esta dinámica ambiental conlleva a la exposición crónica de los organismos, con consecuencias tanto a nivel individual como poblacional (Eissa y col., 2003; Benavides y col., 2005).

La biodisponibilidad del cadmio, y por tanto su toxicidad en suelo, varía según el tipo de suelo, las especies de Cd presentes, el tiempo de contacto suelo-contaminante, la fuente emisora de Cd, la presencia de otros metales, los organismos presentes en el medio y otros factores ambientales (Vig y col., 2003; Bur y col., 2010). El Cd es un metal móvil en los suelos, aunque son las características edáficas las que pueden determinar, fundamentalmente, su mayor o menor movilidad y biodisponibilidad. Es relativamente móvil en suelos con pH entre 4,5 y 5,5 mientras que en suelos alcalinos es menos móvil (Hermle y col., 2006). Se ha observado un mayor contenido de Cd en biota cuando los suelos tienen menor pH y bajo contenido en materia orgánica y en arcilla (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992; Salomons, 1995). En la biodisponibilidad, también influye la presencia de otros metales, como el Cu, Ni, Co, Zn o Pb, porque compiten más eficazmente que el Cd por las sitios de sorción (Christensen, 1987a,b; Gao y col., 1997). Cuanto mayor tiempo de contacto hay entre el metal y el suelo puede también aumentar su fijación y modificarse el perfil de desorción del Cd (Smolders y col., 1999; Lu y col., 2005; Mustafa y col., 2006).

La solubilidad de los compuestos de Cd (a 25°C) disminuye según se trate de cloruro (1400 g/L), de sulfato (750 g/L), de óxido (5 mg/L), de sulfuro (1,3 mg/L) o de carbonatos e hidróxidos (prácticamente insolubles). Como formas solubles en la solución del suelo pueden aparecer el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{CdOH}^+$  a pH alto; y el  $\text{CdSO}_4$  y el  $\text{CdCl}^+$  a pH bajo. Las formas de baja solubilidad son  $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_2$  y  $\text{CdCO}_3$  que aumentan su solubilidad al disminuir el pH.

El Cd se presenta en la naturaleza principalmente como  $\text{Cd}^{2+}_{(\text{aq})}$  y se muestra el diagrama Eh/pH (Figura 5).



**Figura 5** | Especiación del cadmio en función del Eh-pH.

### Cadmio en plantas y animales

La entrada de cadmio y otros cationes a las células de la raíz de las plantas está determinada por el gradiente de potencial electroquímico de la membrana plasmática (Huang y col., 1992; Wang y col., 1994). Las proteínas responsables de la entrada de cadmio a la célula son el transportador específico de calcio LCT1 (Clemens y col. 1998), y la proteína IRT1, perteneciente a la familia de transportadores de metales (ZIP) (Guerinot, 2000). Existen factores externos como la presencia de ciertos metales (Fe, Mn, Zn) que modifican la captación de cadmio por la raíz. Por ejemplo en *Hordeum vulgare* (cebada) la presencia de Fe redujo la captación de Cd (Sharma y col., 2004a, b). Por otro lado, se ha observado que en *Lactuca sativa*, el medio enriquecido con Mn promueve la captación de Cd, que es acumulado en las paredes celulares y potencialmente trasladado a los consumidores (Ramos y col., 2002). En *Arabidopsis halleri* la transferencia de Cd desde el medio de cultivo hacia el xilema de la raíz es parcialmente compartida con el transporte con Zn y/o Fe (Ueno y col., 2008). En el trigo el Cd se almacena en las vacuolas celulares de la raíz por fitoquelatinas que se supone influyen en el

movimiento radial simplástico del Cd (Stolt y col., 2003; Cobbett, 2000). En el arroz, la concentración de Cd en los granos se rige tanto por su captación y transporte a partir de las raíces hacia los brotes, así como, por el transporte de Cd desde los brotes hacia los granos. En un estudio realizado en China por el grupo de Liu y col. (2007), encontraron que aproximadamente el 0,73% del total de Cd captado en seis cultivos de arroz fue transferido hacia los granos. Esto representa un promedio de 1,02 mg/kg que es 100 veces mayor que la concentración permitida por la Unión Europea para la concentración de Cd en los grano de arroz (Olsson y col., 2005).

Una vez dentro de la célula el cadmio puede coordinarse con ligandos de S como glutatión (GSH) o fitoquelatinas (PCs) y ácidos orgánicos como el citrato (Clemens 2006; Domínguez-Solís y col. 2004). Otras posibles moléculas responsables de la quelación del cadmio son pequeñas proteínas ricas en cisteína denominadas metalotioneínas (MTs). De esta forma, los complejos Cd-ligando pueden ser transportados al interior de la vacuola o a otras células (Shah y Nongkynrh, 2007). En la planta, el cadmio se acumula preferentemente en la raíz secuestrado en la vacuola de las células, y solo una pequeña parte es transportada a la parte aérea de la planta concentrándose en orden decreciente en tallos, hojas, frutos y semillas (Chan y Hale 2004).

En los mamíferos, el Cd se transporta como un complejo Cd-proteínas, especialmente Cd-metalotioneínas, y se almacena en el hígado, riñón y mucosa intestinal (Cooke y Johnson, 1996) con un tiempo de retención de 10 años (Pokorny y Ribaric Lasnik, 2000). La concentración de Cd en el alimento, la duración de la exposición y la forma química de Cd en la alimentación pueden determinar el contenido de Cd tisular, principalmente en el hígado y los riñones (Kan y Meijer, 2007). Aunque hay abundante información sobre la toxicidad del cadmio y su movimiento en la cadena alimentaria, se requiere más información para aclarar las vías metabólicas seguidas por los compuestos de Cd en los eslabones superiores de la cadena alimentaria.

### **Cadmio en la red trófica**

En el ambiente, los metales pesados como el Cd son movilizados en la cadena alimentaria afectando tanto a productores como a consumidores (Veltman y col., 2008). Uno de los índices propuestos para evaluar la importancia de los

parámetros ambientales en la biodisponibilidad del metal es el *factor de bioacumulación*, que se define como la concentración de un producto químico en el organismo dividido por la concentración en el suelo (Veltman y col., 2008). En plantas expuestas a concentraciones de Cd entre 0 y 100 µg/g, los factores de bioacumulación del metal en el consumidor primario *Helix aspersa* (caracol) y en el consumidor secundario *Chrysocarabus splendens* (larvas de escarabajo) fueron de 1,87 a 3,9 y menor a 1µg/g, respectivamente (Scheifler y col., 2002). Además, la exposición a Cd en los caracoles produjo una mortalidad del 31% en las larvas del escarabajo, lo que demuestra la toxicidad potencial del Cd en la cadena alimentaria. Scheifler y col. (2006) también han reportado que los caracoles captan la mayor parte del Cd a partir del suelo, y no de las plantas. En estudios recientes se ha demostrado que la transferencia de Cd desde las plantas hacia los caracoles es dependiente de la concentración (Gimbert y col., 2008), hecho que demuestra el peligro potencial de las plantas hiperacumuladoras de Cd. Otro aspecto a considerar es el efecto del Cd en el metabolismo de los depredadores de plantas. En *Neochetina eichhorniae*, el Cd redujo en un 70 - 80% el contenido proteico y en un 8 - 20 % el contenido lipídico en los ovarios de insectos, alimentados con hojas de plantas tratadas durante una semana con 100 mg Cd/kg (Jamil y Hussain, 1993). Sin embargo, Veltman y col. (2008) sugieren que la asimilación de Cd a partir de los alimentos es baja.

Los alimentos son una vía importante de exposición a varios metales, sobre todo en regiones donde sus poblaciones consumen alimentos contaminados. De acuerdo a Chary y col. (2008), las poblaciones que limitan su dieta a productos cultivados a nivel local están particularmente en riesgo por la contaminación del suelo porque el Cd en su dieta no se diluye con alimentos procedentes de otras áreas no contaminadas. Según Millis y col. (2004), el consumo de vegetales es la principal fuente de Cd para los seres humanos. Estos investigadores señalaron que la heterogeneidad de los resultados de suelo en la variación de la concentración del elemento en las plantas, podría dar lugar a una evaluación de riesgo incorrecta para la salud. Otro factor que debe ser considerado es la constitución genética de los cultivos.

En varios lugares del mundo (por ejemplo, México, Pakistán y China), las tierras de cultivo se riegan con aguas residuales. Entre las plantas de cultivo, el

arroz tiene un lugar especial debido a su capacidad de acumulación de Cd en los granos a partir del suelo, excluyendo al Fe, al Zn y al Ca (Chaney y col., 2004). Esto plantea una amenaza real para los agricultores que consumen arroz pulido que es deficiente en estos metales (Chaney y col., 2004). En el año 2008 Khan y col. sugirieron que la ingesta diaria de Cd a partir de plantas cultivadas en zonas de riego con aguas residuales parece ser muy baja basada en los índices de riesgo para la salud, no representando una amenaza para el ser humano. Sin embargo, Kobayashi y col. (2002) encontraron que en la cuenca del río Jinzu (Japón), el aumento de la ingesta total de Cd por los seres humanos parece estar relacionada con los efectos adversos de este elemento en el pronóstico de vida. Estos científicos encontraron que la tasa de mortalidad en las personas cuya ingesta es mayor a 2,0 mg de Cd, a partir de arroz cultivado en áreas contaminadas por Cd, fue mayor en comparación a las personas que ingieren menos de 2,0 mg de Cd.

### **Cadmio y el ser humano**

El cadmio es un metal no esencial para el hombre y produce efectos tóxicos agudos y crónicos a dosis muy bajas.

El Cd es un metal perjudicial para los seres humanos, y su absorción constituye un riesgo ya que provoca afecciones renales, alteraciones en el tejido óseo (por sustitución de calcio en los huesos) y en el sistema reproductor. La vía de exposición, no laboral, en humanos es la ingesta de alimentos o aguas contaminadas. En los años 70 se detectó en Japón la primera intoxicación masiva. El Cd entró en la cadena alimentaria por contaminación de las plantaciones de arroz provocando una enfermedad denominada Itai-itai caracterizada por provocar problemas renales severos y deformaciones óseas muy dolorosas (Oliver, 1997). La contaminación se produjo al desecarse los suelos arroceros transformándose el CdS (insoluble) a Cd<sup>2+</sup> (más fácilmente asimilable) debido a un cambio en las condiciones redox del suelo (Hernando y López, 2007).

Los efectos agudos del cadmio debido a vapores de óxidos en el humo de cigarrillo producen cuadros de neumonitis, mientras que la exposición crónica causa cáncer de pulmón, daño renal y osteomalacia (Soghoian y Sinert ,2008). Otros efectos observados son la inhibición de la progesterona y el estradiol



(Zhang y col. ,2008); alteraciones en el útero, los ovarios y el oviducto (Massanyi y col., 2007); variación en la síntesis de progesterona por los ovarios (Zhang y Jia, 2007); disrupción endocrina (Henson y Chedrese, 2004), actuando como estrógeno en el cáncer de mama (Brama y col., 2007) y aumentando el riesgo de mortalidad cardiovascular (Järup, 2003).

La comida es la principal fuente de cadmio para la población no fumadora (Cuypers y col., 2010). Las estimaciones de la ingesta cadmio en la dieta en todo el mundo varía entre 10 a 40  $\mu\text{g}$  / día para zonas no contaminadas, mientras que para regiones contaminadas estos valores se incrementan en un factor de 10.

La exposición al cadmio en el hombre ha sido asociada con cáncer de pulmón y de riñón (Järup y Akesson, 2009). En animales de experimentación, el cadmio induce carcinoma de pulmón luego de la inhalación, y cáncer de próstata después de la ingestión o inyección del metal (Waalkes, 2003). Las propiedades fisicoquímicas del cadmio constituyen la base para la explicación de los efectos biológicos. En este sentido, los iones  $\text{Cd}^{2+}$  sustituyen a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en los sistemas biológicos debido a que ambos iones presentan la misma carga y un radio iónico similar. Comparado con los iones  $\text{Zn}^{2+}$ , el radio iónico del  $\text{Cd}^{2+}$  es mayor pero puede sustituir al  $\text{Zn}^{2+}$  en numerosas enzimas y factores de transcripción alterando de esta manera su función.

El cadmio es un elemento que representa graves riesgos ambientales debido a que puede ser absorbido por el tracto digestivo, penetra a través placenta durante el embarazo, y daña las membranas y el ADN (Kabata-Pendias, 2004).

### **Cadmio y estrés oxidativo**

Las vías de entrada del cadmio al organismo son los pulmones, los intestinos y la piel. En el cuerpo, el cadmio se une a metalotioneínas (Hamer, 1986), y es distribuido a los diversos tejidos y órganos (Ohta y Cherian, 1991). No existe un mecanismo de excreción de cadmio en los seres humanos, y por lo tanto, se acumula en los tejidos. La vida media del cadmio en la corteza del riñón es de 20-35 años. En los seres humanos, la mayor cantidad de cadmio se deposita en los riñones, el hígado, el páncreas y los pulmones.

El mecanismo por el cual el cadmio inicia la formación de ROS puede deberse a que este metal provoca un descenso intracelular del contenido de glutatión y

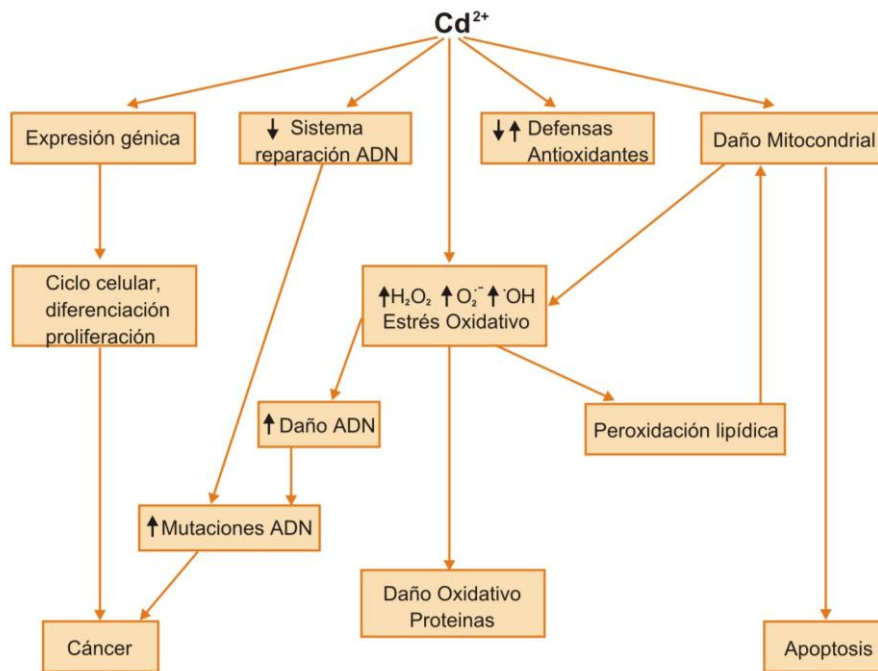
reduce la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, peroxidasa y catalasa, permitiendo la acumulación de ROS y un incremento del estrés oxidativo intracelular (Waisberg y col., 2003).

El cadmio no es un metal redox-activo, y no puede por sí mismo desencadenar reacciones tipo Fenton, por lo que no se une al ADN (Walkees y col., 1984), en consecuencia no es un agente genotóxico (Dally y Hartwig, 1997). Este metal induce estrés oxidativo a través de mecanismos indirectos, como el descenso de antioxidantes celulares y la liberación de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria (Waisberg y col., 2003).

Un mecanismo interesante que explica la función indirecta del cadmio en la generación de radicales libres se basa en que el cadmio puede desplazar al hierro y al cobre en diversas proteínas citoplasmáticas y de membrana (por ejemplo, ferritina, apoferritina) y, en consecuencia, incrementar la cantidad libre de iones cobre y hierro que participan en el estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton (Price y Joshi, 1983). Los resultados obtenidos por Watjen y Beyersmann (2004) sostienen este mecanismo propuesto.

Como se mencionó anteriormente, el cadmio es un potente carcinógeno humano que causa preferentemente cáncer de próstata, de pulmón, de páncreas y de riñón. El hábito de fumar incrementa en forma sinérgica el efecto cancerígeno del cadmio (Flora y col., 2008; Flora y Pachauri, 2010). La carcinogenicidad inducida por cadmio involucraría una alteración en la adhesión celular a través de la unión a una glicoproteína transmembrana que une  $\text{Ca}^{2+}$ , la E-cadherina. De esta manera, genera un cambio conformacional en la glicoproteína interrumpiendo la adhesión célula-célula (Pearson y Prozialeck, 2001), hecho que podría jugar un papel importante en la inducción y promoción de tumores por el cadmio.

En la figura 6 se esquematizan los principales efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular.



**Figura 6** | Esquema general de los efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular.

## CROMO. CARACTERÍSTICAS Y COMPORTAMIENTO

El cromo (Cr) es un metal de transición de número atómico 24 que pertenece al grupo VI-B de la tabla periódica. Louis Nicolás Vauquelin descubrió cromo en 1797, cuando produjo óxido de cromo (VI) mezclando el mineral crocoíta (cromato de plomo) con el ácido clorhídrico. En 1798, aisló cromo metálico por calentamiento del óxido en un horno de carbón vegetal. El nombre de este elemento químico deriva de la palabra griega chroma (χρωμα), debido a las tonalidades brillantes de los compuestos. Desde entonces, el cromo ha sido empleado en distintas industrias que explotan estos colores y otras características tales como su resistencia, dureza, resistencia a la corrosión, y la capacidad de oxidación de ciertas especies de cromo (Darrin, 1956).

### Cromo en el ambiente

El cromo se encuentra en el aire, el agua, el suelo y la biota. La concentración promedio de cromo en la corteza terrestre es de 125 mg/kg. Las concentraciones en agua dulce generalmente oscilan desde 0,1 hasta 6,0 µg/L

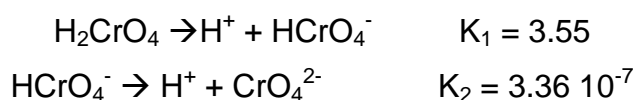
con un promedio de 1,0 µg/L, mientras que los valores promedio para el agua de mar son de 0,3 µg/L con un intervalo de 0,2 a 50 µg/L (Bowen, 1979). Las concentraciones de cromo en agua dulce dependen de los niveles de cromo del suelo en los alrededores de la cuenca. Además, el agua de drenaje de zonas agrícolas que atraviesa suelos con cantidades elevadas de cromo puede tener niveles del metal en concentraciones muy altas (hasta 800 µg/L), como se observa en varios lugares dentro del valle San Joaquín, California (Gaines, 1988).

El cromo no se encuentra como metal libre en la naturaleza. Su fuente mineral más importante, por abundancia y valor económico, es la cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ). Las mayores reservas mundiales de cromita se encuentran en Turquía, Estados Unidos, Sudáfrica, Albania, Finlandia, Irán, Madagascar, Rusia, Rhodesia meridional, Cuba, Brasil, Japón, India, Paquistán, y Filipinas (Morning y col, 1980). La crocoita, ( $\text{PbCrO}_4$ ), es también un mineral de cromo de menor importancia y se explota comercialmente en Rusia, Brasil, Estados Unidos y Tasmania. Además, el cromo se encuentra formando la bentorita ( $\text{Ca}_6(\text{Cr,Al})_2(\text{SO}_4)_3$ ) y tarapacaita ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ), entre otros (Babula y col. 2008).

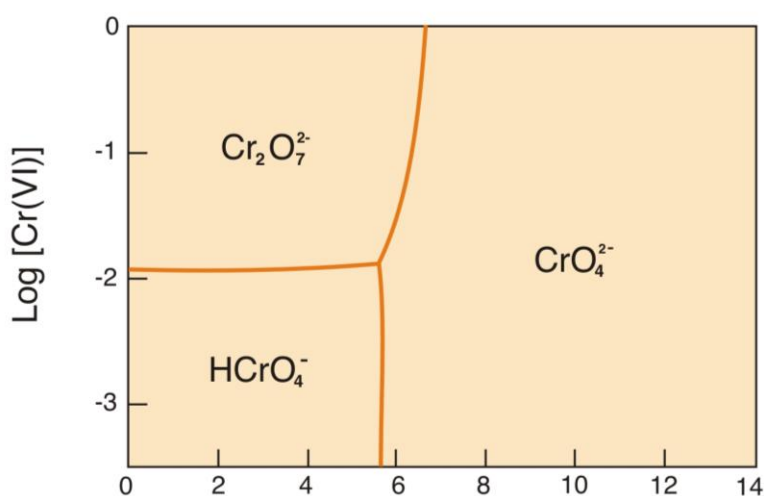
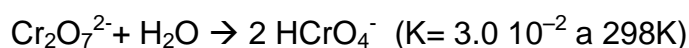
Los principales usuarios de cromo son los sectores químicos, y la industria de ladrillo refractario (Langard, 1980). Otras industrias que emplean cromo incluyen la fabricación de pigmentos, acabado de metales, inhibición de la corrosión, síntesis orgánica, curtido de pieles, y conservación de la madera (Hartford, 1979, Darrin, 1956, Yassi y col., 1988). El uso industrial extensivo conduce a la generación de residuos de cromo en gran escala que se descargan en el ambiente. Además de estos residuos, fugas debido a una manipulación incorrecta y recipientes defectuosos de almacenamiento también contribuyen a la acumulación de cromo en el ambiente.

El cromo hexavalente es la especie más tóxica, ya que tiene un alto potencial de oxidación, alta solubilidad y movilidad a través de las membranas en organismos biológicos del ambiente (Marques y col., 1998). El cromo trivalente en agua es relativamente insoluble y tiende a formar precipitados de hidróxido con el hierro a los valores de pH frecuentes del suelo. Sin embargo, a concentraciones altas de oxígeno u óxidos de manganeso, el  $\text{Cr}^{3+}$  puede ser oxidado a  $\text{Cr}^{+6}$  (Bluskov y col., 2005).

El cromo puede existir en estados de oxidación que van desde 0 a +6. Los diversos cambios químicos y biológicos que sufre el cromo en el ambiente dependerán de las condiciones que rigen su especiación. La solubilidad y la adsorción por los suelos y los sedimentos dependerán de la forma de las especies de cromo. Dentro de los intervalos de los potenciales redox y el pH que se encuentran comúnmente en los suelos, el cromo existe predominantemente como oxianiones de Cr (III) y Cr (VI). El Cr (VI) es un fuerte oxidante y sólo existe en especies oxigenadas que son muy solubles y dependiente del pH de acuerdo con los siguientes equilibrios (Nieboer y col. 1988):



El ácido crómico ( $\text{H}_2\text{CrO}_4$ ) es un agente oxidante fuerte y es la especie dominante a pH menores a 6 (Cotton y col. 1980). El bicromato,  $\text{HCrO}_4^-$ , existe entre los valores de pH de 1 y 6, mientras que el cromato,  $\text{CrO}_4^{2-}$ , predomina a pH iguales o mayores a 6. Los iones dicromato,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , se forman por dimerización del  $\text{HCrO}_4^-$  para concentraciones superiores a  $10^{-2}$  M de Cr (VI) (Beas y col. 1986, Losi y col., 1994)



**Figura 7** | Diagrama de las especies predominantes de cromo (VI) dependientes del pH y de la concentración de cromo

La existencia de iones dicromato es poco probable en los sistemas biológicos porque las concentraciones típicas de cromo en la naturaleza son considerablemente inferiores a  $10^{-2}$  M, especialmente a pH fisiológico.

El cromo trivalente es la forma más estable. Debido a su menor afinidad por los iones de óxido e hidróxido, el Cr (III) es conocido por formar complejos con numerosos ligandos orgánicos e inorgánicos (Martell y col., 1977, Smith y col., 1976). Debido a la inercia química, las especies complejas de Cr (III) tienden a ser más estables en solución y pueden ser aisladas. Las principales especies acuosas de Cr (III) son  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ , y el  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$  (Bartlett y col., 1991, Bartlett y col., 1976, Eary y col., 1987). La especie  $\text{Cr}^{3+}$  predomina a pH menores a 3 (Francoise y col., 1991), para valores de pH superiores a 3.5 forma diferentes hidróxidos ( $\text{CrOH}^{2+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  y  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ), excepto el  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$  que se presenta a pH mayores a 11,5 (Rai y col., 1987). A pH ligeramente ácidos a alcalinos, las especies iónicas de Cr (III) precipitan como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  amorfo (Rai y col., 1987) o como una solución sólida si el  $\text{Fe}^{3+}$  está presente ( $\text{Fe, Cr}(\text{OH})_3$ ) (Francoise y col., 1991).

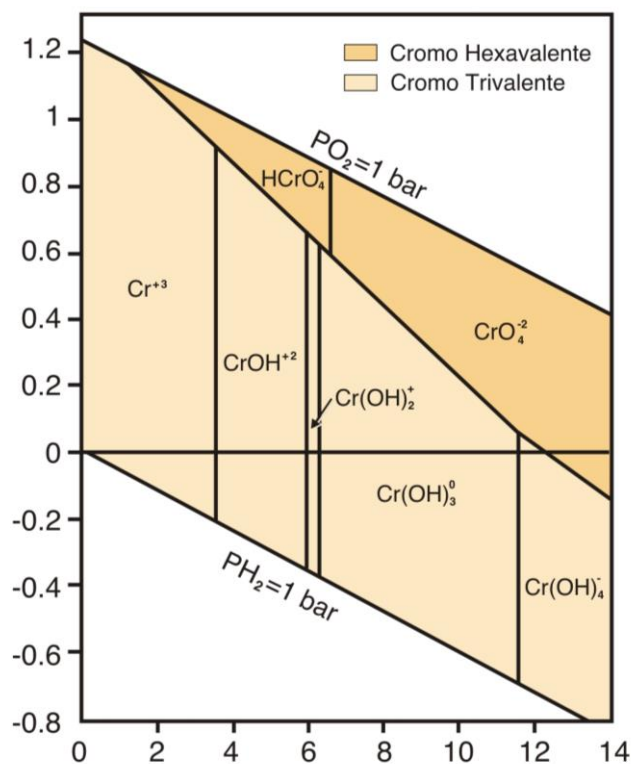
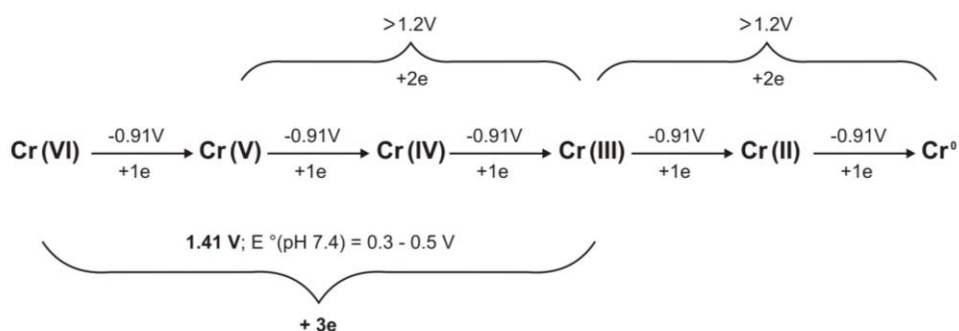


Figura 8 | Especiación del cromo en función del Eh-pH

El Cr (III) también puede ser quelado por moléculas orgánicas que son adsorbidas a la superficie de los minerales (James y Bartlett, 1983 a,b). Por el contrario, el Cr (VI), el  $\text{CrO}_4^{2-}$ , el  $\text{HCrO}_4^-$  y el  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  son muy móviles en los sedimentos superficiales, ya que no se absorben fuertemente a los suelos.

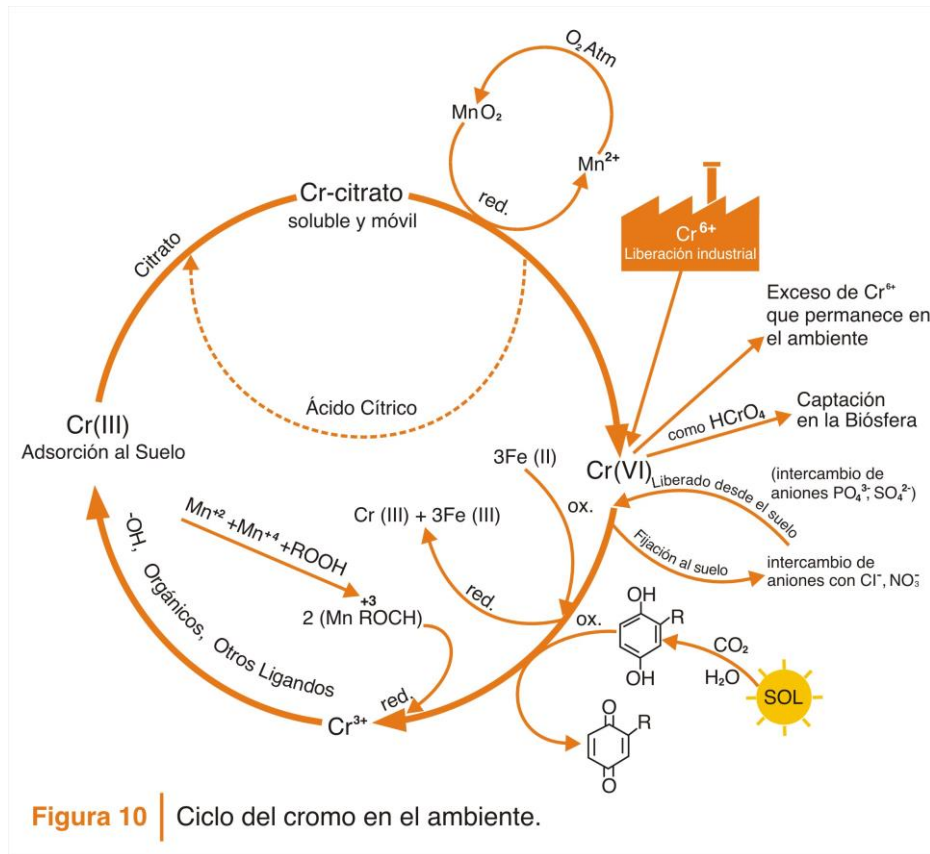
Tanto la oxidación y la reducción de Cr (VI) puede producirse en ambientes geológicos y acuáticos. La oxidación y reducción del cromo en el suelo depende de la estructura y de las condiciones redox del mismo (Kozuh y col., 2000). La especiación de cromo en las aguas subterráneas se ve afectada por el potencial redox y las condiciones de pH. Los valores positivos del potencial de reducción favorece la forma trivalente del metal. El valor del potencial para Cr (VI) y Cr (V) es dependiente del pH debido a que los protones están involucrados en la reacción (Figura 9).



**Figura 9** | Diagrama del potencial de reducción del cromo en sistemas acuosos

La química del cromo en un acuífero es muy compleja. La comprensión del ciclo de cromo (Figura 10) es importante para determinar qué tecnología se debe utilizar para el tratamiento de las aguas subterráneas.

La humedad de la tierra y de los sedimentos en equilibrio con el oxígeno atmosférico proporcionan las condiciones necesarias para que la reducción y la oxidación ocurran simultáneamente. La reducción de Cr (VI) a Cr (III) en la tierra sólo se producirá como resultado de una reducción en presencia de materia orgánica, hierro soluble ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o compuestos de sulfuro reducidos. En estos procesos la presencia de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) permite que las especies de Cr (VI) permanezcan móviles y puedan ser reducidas a Cr (III).



En algunos compuestos, como los complejos ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácido cítrico), el Cr (III) es lo suficientemente móvil para migrar a la superficie y volver a oxidarse a Cr (VI) en presencia de  $MnO_2$ . El dióxido de manganeso se forma naturalmente en la parte superior del lodo al reaccionar el óxido de manganeso ( $MnO$ ) con el oxígeno atmosférico.

En la Figura 11 se representa la reducción del Cr (VI) a Cr (III) y la posterior fijación e inmovilización, objetivo para la descontaminación de las aguas subterráneas contaminadas con cromo.

En el aire no contaminado el cromo se encuentra normalmente en concentraciones entre  $0,01-0,02 \mu g/m^3$  de aire, niveles que no causan daños a la salud. Sin embargo, la contaminación industrial puede elevar la concentración de cromo en el aire que superan los  $0,4 \mu g/m^3$  (*Commission of the European Communities*, 1979).

Las emisiones producidas al quemar carbón y petróleo, y la producción de acero pueden aumentar los niveles de cromo (III) atmosférico. La soldadura de acero inoxidable, la manufactura de productos químicos y el uso de productos que contienen cromo (VI) pueden aumentar los niveles de cromo (VI) en el aire.



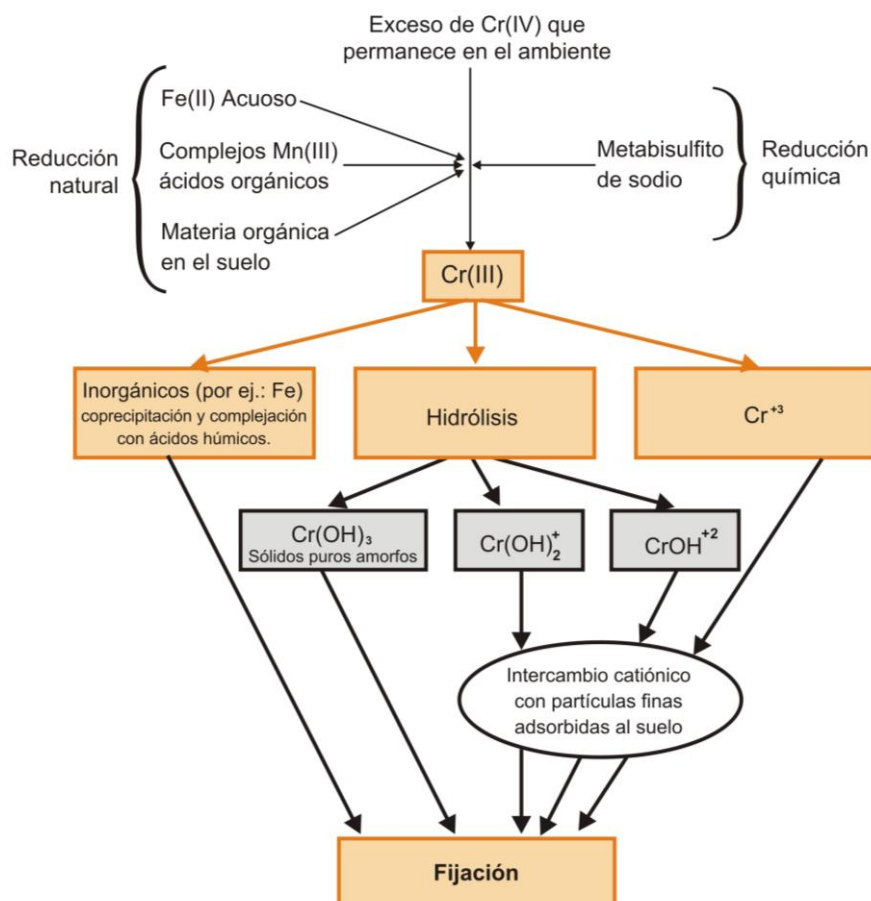


Figura 11 | Reducción y fijación del cromo

### Cromo en plantas y animales

Pratt (1966) indicó que bajas concentraciones de cromo estimulan el crecimiento de las plantas. Sin embargo, unos años más tarde se demostró de manera concluyente que el cromo no es un componente esencial en la nutrición de las plantas (Huffman y col., 1973). En este sentido, se observó que en presencia de Cr (VI) la germinación de semillas se reduce en más del 80% respecto a la germinación de semillas en ausencia del tóxico (Salunkhe y col. 1998). Las concentraciones de Cr (VI) de 5 a 60 mg /kg de suelo retardan el crecimiento de plantas debido a un daño radicular (Anon, 1974).

La entrada de cromo a las plantas ocurre por reducción y/o por complejación con ácidos orgánicos presentes en las raíces que lleva a un aumento de la solubilidad y de la movilidad de cromo a través del xilema (Blukov y col., 2005). Tanto el Cr (VI) como el Cr (III) ingresan al sistema radicular por la vía del simplasto pero el Cr (VI) es reducido y almacenado en la corteza (Shanker y

col., 2005). Aunque el Cr es pobremente transportado hacia las partes aéreas, su movilización y acumulación en el interior de los tejidos depende de la forma química (James y Barlett, 1983 a,b). El Cr (VI) daña las membranas radiculares por su elevado poder oxidante, y reduce la captación de elementos esenciales como el hierro, potasio, magnesio, manganeso, fósforo y calcio (Gardea-Torresdey y col., 2005 b). Debido a su radio iónico similar, el Cr (III) reemplaza a los iones férricos en el grupo hem de las proteínas disminuyendo su actividad (Pandey y Sharma, 2003).

Zayed y Terry (2003) demostraron que la entrada de Cr trivalente a las plantas ocurre por un mecanismo de difusión pasiva mientras que el Cr hexavalente lo hace por un mecanismo de transporte activo inhibido por iones sulfato y calcio, y retenido en vacuolas de la pared celular. A pH neutro, los compuesto de Cr (VI) presentan una geometría tetraédrica y atraviesan las membranas a través de los canales de iones tetraédricos mientras que el Cr (III) es octaédrico y transportado a través de las membranas por difusión (Cohen y col., 2006). Montes-Holguin y col. (2006) informaron que en plantas de la especie *Convolvulus arvensis* tratadas con dicromato de potasio o con nitrato de cromo presentan porcentajes diferentes de compuestos de cromo en las hojas como por ejemplo acetato de cromo, fosfato de cromo y nitrato de cromo. Estos autores sugieren que el mayor porcentaje de nitrato de cromo hallado podría deberse a la mayor solubilidad de este compuesto, y que además, las plantas tienen una elevada capacidad de acumulación de cromo que contribuye a la bioconcentración potencial de cromo a través de la cadena alimenticia en forma de cromo (III).

La absorción y translocación de cromo puede ser modificada por el suelo, el pH, el contenido de materia orgánica y la presencia de agentes quelantes, entre otros (Han y col., 2004). Las especies acuáticas pueden ser afectadas por el cromo presente en los sedimentos y en el agua. La geoquímica y las condiciones reductoras del medio determinan la solubilidad, la movilidad y la biodisponibilidad de cromo y su bioconcentración en estos organismos (Martello y col., 2007). Una disminución del contenido de hemoglobina en *Limnodrilus hoffmeisteri (oligochaete)* fue observado cuando los niveles de cromo en el sedimento del río Niagara (Aguascalientes, México) eran mayores a 10 µg/g peso seco (Flores-Tena y Martinez-Tabche, 2001).

En un estudio con organismos acuáticos que incluyen plantas, gusanos, cangrejos y peces, Marchese y col. (2008) calcularon el factor de bioconcentración del Cr (relación de la concentración de una sustancia química presente en un organismo acuático respecto a la presente en el ambiente). Los factores de bioconcentración, después de 28 días de exposición a sedimentos contaminados con cromo, que se encontraron en las plantas fueron:  $(718,66 \pm 272,91)$  en *Ceratophyllum demersum*,  $(172,55 \pm 80,8)$  en *Limnodrillus udekemianus*,  $(67,72 \pm 35,4)$  para el cangrejo *Zilchiopsis collastinensis*, y  $(23,11 \pm 12,82)$  en los peces *Cnesterodon decemmaculatus*. Los datos sugieren que existen diferencias en respuesta a la tolerancia y a la desintoxicación. El almacenamiento del cromo tiene lugar en las vacuolas de las plantas (Shanker y col., 2005), en el tracto digestivo de los oligoquetos (Berthet et al., 2003), y en el exoesqueleto en los crustáceos (Marchese y col., 2008). Además, Coeurdassier y col. (2005) encontraron que los efluentes industriales del este de Francia que contienen aproximadamente 25 ppm de Cr disminuyen la fecundidad significativamente en *Lymnaea palustris* (caracol de agua dulce). Los cangrejos y los pescados son las especies marinas de consumo frecuente por los seres humanos y considerados como potenciales transportadores del cromo a través de la red alimentaria (Marchese y col., 2008).

El Cr (VI) afecta el crecimiento, la fotosíntesis, la morfología y las actividades enzimáticas en las algas. Las concentraciones de Cr (VI) que han demostrado ser tóxico para las algas varían desde 20 ppb a 10.000 ppb (Anon, 1974; Rosko y col., 1977; Schroll, 1978).

### **Cromo en la red trófica**

El Cr (III) es un mineral esencial de la dieta en dosis bajas, que se encuentra en la mayoría de los alimentos frescos incluyendo panes, carnes, verduras y agua de consumo (Vincent, 2010). Se requiere para potenciar la insulina y para el metabolismo normal de la glucosa. Las solubilidades de los compuestos de Cr (VI) varían desde las que son fácilmente solubles a las que son prácticamente insolubles en agua. Todos los compuestos de Cr (VI), independientemente de su grado de solubilidad en agua, son considerados carcinógenos ocupacionales.

La ingesta de Cr por los seres humanos puede ser debida a la contaminación a partir del procesamiento de alimentos y bebidas envasadas. Los ácidos contenidos en las frutas (málico y cítrico) pueden remover el Cr de los envases de acero inoxidable empleadas en la refrigeración, durante el proceso de empaque de frutas de conserva (Krysik y col., 2008).

### **Cromo y el ser humano**

El cromo está designado por Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los EE.UU. como un contaminante prioritario debido a su capacidad de causar mutaciones genéticas y cáncer. Basándose en la química, la toxicología, y la evidencia epidemiológica, las especies químicas del cromo (III y VI) se regulan en forma diferencial en el ambiente. El cromo trivalente es la forma nutricionalmente útil, mientras que la forma hexavalente es tóxica y mutagénica. Además, el Cr (VI) es un potente irritante del epitelio y carcinógeno humano confirmado (Langand, 1983). Por el contrario, el Cr (III) es un elemento esencial en la fisiología de los animales y juega un papel destacado en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Anderson, 1989; Mertz, 1993).

La inhalación de Cr (VI) puede causar asma, bronquitis y neumonitis. Además, el contacto con la piel puede producir alergias, dermatitis y necrosis (Kotas y Stasicka, 2000). La inhalación de Cr (VI) se reduce dentro de las células a Cr (III). Beyersmann y Hartwig (2008) informaron que  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  particulado puede ser fagocitado y solubilizado dentro de lisosomas liberando iones de Cr (III). Después, el Cr (III) se une a las moléculas de ADN o es complejado con ligandos hidrófobos tales como 1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina, o ácido picolínico que se transportan a través de las membranas plasmáticas produciendo mutaciones genéticas.

El cromo (VI) a dosis altas representa un riesgo importante para la salud (Keegan y col., 2008). El Cr (VI) entra en el cuerpo por las tres vías de exposición: inhalación, ingestión o absorción a través de la piel. Para la exposición ocupacional, las principales vías de absorción son la vía respiratoria y la piel (De Flora y col., 1995). La inhalación de niveles altos de cromo (VI) puede causar irritación de la cavidad nasal, disnea y tos. El contacto dérmico

con compuestos de cromo (VI) puede causar úlceras, además de reacciones alérgicas como enrojecimiento e inflamación de la piel.

Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), la carcinogenicidad del Cr (VI) en el pulmón y en la cavidad nasal ha sido confirmada. Además, se han observado otros efectos perjudiciales para la salud como síntomas gastrointestinales, hipotensión, fallo hepático y renal. Se ha reportado un aumento en la tasa de tumores de estómago en los seres humanos y animales expuestos al cromo (VI) en agua potable. En estudios experimentales con animales expuestos a cromo (VI), se ha observado alteraciones en el sistema reproductor masculino. La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos (OSHA) ha establecido como un límite de exposición ocupacional a Cr (VI) menor a  $5\mu\text{g}$  de Cr (VI) por metro cúbico de aire. Estudios recientes en cultivos celulares revelaron un potencial mucho mayor del Cr (VI) para causar daño cromosómico y mutaciones (Reynolds y col., 2007) que lo que descrito previamente.

El metal en estado fundamental es poco frecuente y no se produce de forma natural, por lo tanto, no constituye un riesgo sanitario grave. La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos ha establecido que la ingesta diaria segura de cromo en adultos es de 50 a 200  $\mu\text{g}$  por día.

El cromo (III) es un mineral esencial que tiene un papel beneficioso en la regulación de la insulina, en el síndrome metabólico y en enfermedades cardiovasculares. El cromo potencia la insulina, y por lo tanto, juega un papel en el metabolismo normal de la glucosa. La disminución de los niveles de cromo en los tejidos humanos se correlaciona con un aumento de la incidencia de diabetes tipo II. La deficiencia de cromo se ha asociado con una curva de tolerancia a la glucosa alterada, hiperglucemia en ayunas, glucosuria, aumento del tejido adiposo, dislipidemias y alteración de la fertilidad (De Flora y col., 1995). Hay una creciente evidencia de que el cromo puede facilitar las vías de señalización de la insulina, y por lo tanto, la suplementación con cromo puede mejorar la sensibilidad a la insulina sistémica (Hummel y col., 2007). El metabolismo de cromo se encuentra alterado en personas con trastornos cardiovasculares. El picolinato es un subproducto del aminoácido triptófano, y el picolinato de cromo (200  $\mu\text{g}$  por día) ha demostrado reducir la resistencia a la insulina y contribuir a la disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular

y diabetes tipo II (Bagchi y col., 2002). Con el fin de explorar si la ingesta de cromo en forma de suplementos dietéticos sería eficaz en la prevención de enfermedades cardiovasculares, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos (Alissa y col., 2009).

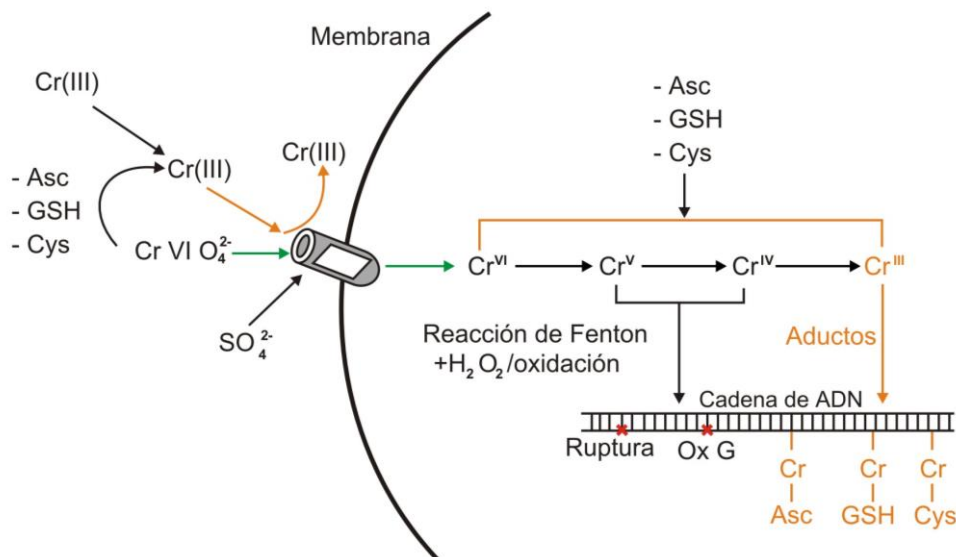
### **Cromo y el estrés oxidativo**

Los metales desempeñan papeles importantes en una amplia variedad de procesos biológicos en los sistemas vivos. La homeostasis de iones metálicos, es mantenida a través de mecanismos estrechamente regulados de captación, almacenamiento y secreción, fundamentales para la vida y se mantienen dentro de límites estrechos (Bertini y Cavallaro, 2008). La alteración de la homeostasis de iones metálicos ha sido involucrada en un gran número de enfermedades como Parkinson y Alzheimer (Halliwell y Gutteridge, 2007; Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005; Matés, 2000; Matés y col., 1999). Los metales modulan la expresión génica al interferir las vías de transducción de señales que juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo celular (Valko y col., 2006). La desregulación del crecimiento celular y la diferenciación es una característica típica del fenotipo de cáncer. La acción de los metales es interferir en la desregulación de la proliferación celular mediante la activación de diversos factores de transcripción (NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT), el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Evan y Vousden, 2001).

La generación de radicales libres en los sistemas vivos está estrechamente vinculado con la participación de metales redox activos tales como hierro, cobre, cromo y cobalto (Rahman, 2007; Matés y col., 2002, 2008). Los metales redox activos pueden someterse a reacciones cíclicas que participan en la transferencia de electrones entre los metales y sustratos y por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis redox (Lindeque y col., 2010). La ruptura de la homeostasis de un metal puede ser mediada por formación de radicales libres que participan en las modificaciones del ADN, la peroxidación lipídica, alteraciones de calcio y la homeostasis de sulfhídricos (Gutteridge, 1995; Valko y col., 2007).

La vía principal de toxicidad y carcinogenicidad es el agotamiento de glutatión y enlaces a grupos sulfhidrilos de proteínas entre otros mecanismos de acción (Speisky y col., 2009; Sinicropi y col., 2010; Peralta-Videa y col., 2009).

La carcinogenicidad de Cr (VI) es sitio específico, fundamentalmente en el pulmón y requiere de exposiciones masivas (Singh y col., 1998). El cromo trivalente no es un sustrato del sistema de transporte de aniones celular, y por lo tanto, es incapaz de atravesar la membrana celular (Costa, 1997; Salnikow y Zhitkovich, 2008). Sin embargo, se ha propuesto que pequeñas cantidades de Cr (III) entran en la célula a través del proceso de pinocitosis. El Cr (VI) cancerígeno presenta una geometría espacial tetraédrica, y por lo tanto, su estructura es similar a la de los sustratos biológicos fosfatos y sulfatos. Por esta razón, puede ser absorbido fácilmente a través de canales para la transferencia de aniones isoeléctricos e isoestructurales hacia el interior de las células. Luego de su administración oral de Cr (VI), la detoxificación inicial del metal ocurre por reducción en saliva y en jugo gástrico, y secuestro por las bacterias intestinales (De Flora, 2000). Una vez absorbido a nivel intestinal, el cromo (VI) es reducido efectivamente en la sangre y en el hígado. Estas vías de reducción del Cr (VI) contribuyen a disminuir los efectos genotóxicos y carcinogénicos, excepto en aquellos individuos expuestos a altas dosis durante períodos prolongados (De Flora y col., 1990). La reducción de Cr (VI) a nivel pulmonar a través del glutatión (Izzotti y col., 1998) contribuye a disminuir el riesgo de cáncer de pulmón. Por el contrario, aumenta el riesgo cuando la dosis de Cr (VI) causa un agotamiento de los mecanismos reductores de defensa. El proceso de reducción intracelular de Cr (VI) por quelantes reduce el *pool* de este ión metálico potencialmente carcinógeno (Figura 12). La difusión aumentada del Cr (VI) plasmático hacia los eritrocitos representa un mecanismo de disminución de los niveles de Cr (VI) en sangre. En los eritrocitos, el Cr (VI) es reducido a estados de oxidación más bajos y forma complejos con proteínas (Kerger y col., 1997; Petrilli y De Flora, 1978). Los complejos de cromo formados con los diferentes ligandos limitan su reingreso a la circulación sanguínea (Zhitkovich, 2005; De Flora y col., 1995). Se ha estimado, que la velocidad de captación de Cr (VI) eritrocitaria está regulada por la capacidad de reducción de Cr (VI) a Cr (III).



**Figura 12** | Captación y daño del ADN por cromo hexavalente.

El proceso de reducción del Cr (VI) a Cr (III) por quelación no es absolutamente seguro, ya que durante este proceso se generan varios radicales libres que dará como resultado ya sea la activación o la desintoxicación, dependiendo del sitio de reducción intracelular y de su proximidad al ADN.

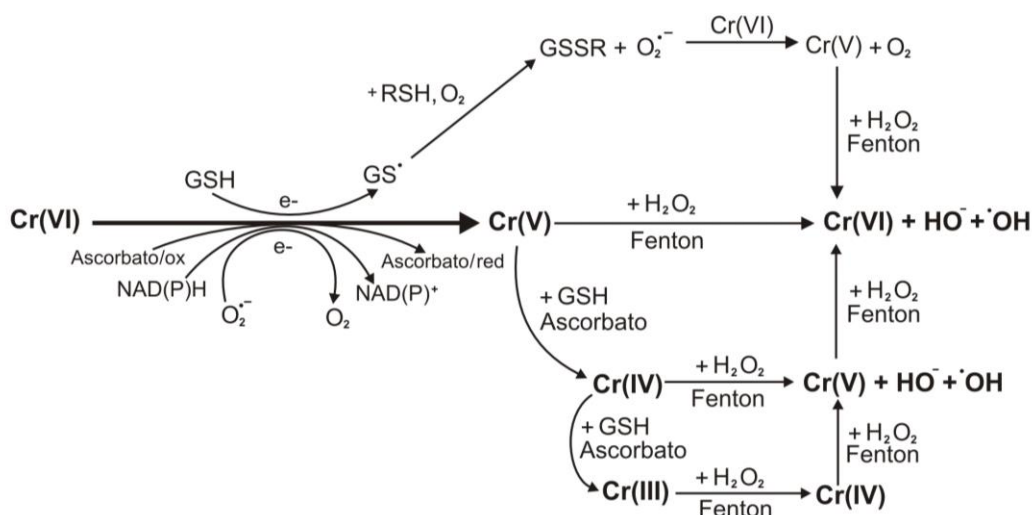
Los resultados han demostrado que el ascorbato es un eficiente reductor biológico del Cr (VI) in vivo y juega un doble papel en la toxicidad de Cr (VI), es un protector antioxidante exterior y un prooxidante en el interior celular. En este sentido, se ha observado que las reacciones que utilizan ascorbato en la reducción de cromo (VI) intracelular generan altos niveles de aductos ADN-cromo que son inductores de mutaciones causando un daño en el ADN (Figura 12) (Quievryn y col., 2002; O'Brien y col., 2002).

La reducción de Cr (VI) puede ocurrir también por reacciones no enzimáticas con cisteína y glutatión. Sin embargo, en los tejidos diana de la toxicidad de cromato, tales como pulmón, el ascorbato es el reductor primario del Cr (VI).

En las mitocondrias, el reductor primario de Cr (VI) parece ser el NAD(P)H, que conduce a la formación de Cr (III) que presenta mayor estabilidad y afinidad por el ADN (De Flora y Wetterhahn, 1989). Los estados de oxidación intermedios de cromo, Cr (IV) y Cr (V), pueden participar en los efectos de genotoxicidad y carcinogenicidad del Cr (VI), ya sea directamente o a través de otros componentes celulares (por ejemplo, la reacción de Fenton) generando especies reactivas del oxígeno (Figura 13). Varios tipos de daño en el ADN



ocurren en las células expuestas al cromo hexavalente, incluyendo cortes en una sola cadena, enlaces cruzados ADN-ADN, ADN-proteínas, aductos ADN-cromo, cambios oxidativos de los nucleótidos, y aberraciones cromosómicas (De Flora y Wetterhahn, 1989; Singh y col., 1998).



**Figura 13** | Reductores biológicos de Cr (VI) y sus reacciones.

Se ha demostrado que el Cr (III) puede ser reducido a Cr (II) por reductores biológicos como por ejemplo por L-cisteína y NAD(P)H, que a su vez reacciona con el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton para producir radicales hidroxilo (Shi y col., 1993a, b). Las especies de Cr (III) al reaccionar con el peróxido de hidrógeno o peróxidos lipídicos también pueden producir especies reactivas del oxígeno.

En el curso de la reducción de Cr (VI) se generan varias especies reactivas del oxígeno, incluyendo el radical hidroxilo, el anión superóxido y el oxígeno singlete. Los radicales hidroxilo son capaces de reaccionar con las bases del ADN, por ejemplo generando una serie de aductos con guanina cuyo seguimiento se realiza empleando la 8-hidroxiguanosina (8-OH-dG) como marcador de daño oxidativo.

## **CROMO: EFECTO SOBRE MICROORGANISMOS**

El cromo hexavalente es tóxico y mutagénico para la mayoría de las bacterias. Los efectos reportados en bacterias son la elongación celular, agrandamiento de las células, e inhibición de la división celular lo que finalmente conduce a la inhibición del crecimiento celular (Coleman y col., 1983, Theodotou y col., 1976). Los cambios en la morfología de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, también fueron observados por Bondarenko y Ctarodoobova (1981). En este sentido se demostró una disminución del número y tamaño de las células en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* (Bondarenko y Ctarodoobova, 1981). Las concentraciones de Cr (VI) de 10 a 12 ppm inhiben el crecimiento de bacterias del suelo en la mayoría de medios de cultivo líquido y, en general, las bacterias gram negativas son más sensibles que las gram positivas (Ross y col., 1981). El incremento del contenido de Cr (VI) en el suelo es tóxico para las bacterias saprófitas y las nitrificantes. La disminución de la biomasa microbiana en el suelo se observó en presencia de alto contenido de Cr (VI) en el suelo cuando se determinó por el método de trifosfato de adenosina (ATP) (Ajmal y col., 1984; Zibilske y Wagner, 1982). Otras bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter aerogenes* fueron incapaces de crecer en presencia de 1 mM de Cr (VI) (Arnold y col., 1988). Existen evidencias de los efectos metabólicos del Cr (VI) sobre las bacterias como por ejemplo los cambios observados en los sistemas de transporte de electrones (Quershi y col., 1984).

Se ha demostrado que el Cr (VI) es mutagénico en especies de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella Typhimurium* (Nishioka y col., 1975; Petrilli y col., 1977; Venitt y Levy, 1974). Los efectos mutagénicos de cromo son efectivos sólo cuando el cromo atraviesa la membrana celular. El Cr (VI) puede fácilmente difundir a través de las membranas celulares, a diferencia de Cr (III), que sólo puede hacerlo bajo condiciones extremas tales como incubaciones prolongadas y altas concentraciones. Estudios en cultivos celulares han demostrado que la captación celular de cromato es al menos 10 veces mayor que la de Cr (III) a partir de soluciones equimolares, (Cupo y Wetterhahn, 1984; Levis y col., 1978). Sin embargo, una vez dentro de la célula, la mayoría de Cr (VI) se reduce a Cr (III) por varios agentes reductores tales como ácido

ascórbico, sulfito de sodio, el glutatión, NADPH y NADH (Petrilli y De Flora, 1978). Basado en varios estudios, se concluyó que el cromo trivalente provoca la ruptura de la hebra de ADN (Bianchi y Levis, 1984; Bianchi y col., 1984; De Flora y col., 1984; Levis y col., 1978; Tsapakos y Wetterhahn, 1983; Tsuda y Kato, 1977). El Cr (VI) provoca efectos genotóxicos en las células bacterianas, como por ejemplo sustituciones de pares de bases (Petrilli y col., 1977). De Flora y col. (1984) informó un efecto más general de desequilibrio en el *pool* de nucleótidos. Estos estudios sugieren que a pesar de que el Cr (III) es la especie química responsable de los eventos moleculares que conducen a la mutagenicidad, es el Cr (VI) el que representa el mayor riesgo para la vida humana debido a su capacidad de entrar fácilmente en la célula.

### **Estrategias de remediación de Cr (VI)**

Las estrategias de remediación se emplean con el fin de minimizar el riesgo de exposición de los seres vivos a los sitios contaminados con cromo. Entre dichas estrategias se pueden mencionar la excavación y remoción de suelo contaminado, la opción de “no acción”, el bombeo de acuíferos y posterior tratamiento, y la solidificación del suelo y la estabilización. El conocimiento de los procesos físicos y químicos que afectan el estado de migración y la química del cromo es necesario para la implementación de una estrategia de remediación óptima. La opción de la “no acción” se adopta si el riesgo de exposición y el impacto potencial para el ambiente es marginal. El conocimiento del tipo de reductores presentes en el suelo es importante para la aplicación de esta opción. La excavación ya no es un método muy deseable, ya que simplemente se mueve el suelo contaminado desde un lugar a otro. El bombeo y tratamiento es uno de los métodos más comúnmente utilizados para la remediación del acuífero. Los dos principales objetivos son eliminar los contaminantes del subsuelo para el tratamiento, y para mantener el control de gradiente que evita que los contaminantes migren más allá de los límites vigentes. Entre las principales preocupaciones de emplear este método es la concentración residual que generalmente es mayor que el nivel máximo de contaminante (CLM) establecido por la EPA. El proceso de solidificación del suelo incluye la transformación de Cr (VI) en una especie química insoluble, que es impermeable al agua subterránea. Las técnicas tradicionales para

remediar el agua contaminada con cromato implican también la reducción del Cr (VI) a Cr (III) por medios químicos (por lo general con  $\text{Fe}^{2+}$ ), o medios electroquímicos a pH 5, seguido por precipitación y filtración o sedimentación (Eary y Rai, 1988). El aumento de la cantidad de lodo resultante por este método es uno de los inconvenientes. Este método se emplea a menudo en combinación con los métodos de bombeo y tratamiento.

Estos procesos requieren cantidades importantes de reactivos, un consumo de energía elevado, y largos períodos de tiempo para alcanzar el nivel de regulación establecido en los sitios contaminados. Además, el costo de estas estrategias de remediación química es muy alto.

El descubrimiento de los microorganismos que pueden reducir los metales ha llevado a la aplicación de los mismos como una nueva herramienta en la biorremediación, teniendo en cuenta los costos y ser potencialmente más eficaces que los métodos tradicionales. Uno de los principales factores que deciden la aplicación de las estrategias de biorremediación es la biodisponibilidad del dador de electrones preferido por los microorganismos indígenas que están implicados en la reducción de metales. Para la biorremediación de Cr (VI), la estimulación de las poblaciones microbianas existentes con dadores de electrones biodisponibles puede dar lugar a un aumento en la reducción de metales, y en consecuencia, a la remediación del sitio contaminado. Aunque la reducción de Cr (VI) a Cr (III) no elimina el cromo de los suelos, limita la movilidad y la toxicidad del mismo en los suelos contaminados.

Finalmente, debe reconocerse que existen muchos factores que afectan la reducción microbiana de Cr (VI) en los suelos. Es evidente que existe una necesidad de comprender los diversos grupos de bacterias que reducen el cromo hexavalente y los distintos mecanismos de reducción microbiana del Cr (VI) en los suelos.

### **Resistencia de las bacterias al cromo**

El carácter persistente de algunos metales en el ambiente ha llevado a modificaciones importantes de la comunidad microbiana y sus actividades. Se ha demostrado que los metales pesados inhiben el crecimiento microbiano y la actividad de enzimas mediante el bloqueo de los grupos funcionales, causando

cambios conformacionales en las moléculas biológicas (Gadd y Griffiths, 1978; Li y Tan, 1994; Wood, 1984). En ambientes contaminados con metales, las respuestas de las comunidades microbianas dependerá de las concentraciones de los agentes tóxicos a la que son expuestos, y a otros factores tales como la naturaleza de los nutrientes, la forma química del agente tóxico, la temperatura, oxígeno y pH. Los mecanismos de resistencia propuestos para la resistencia a metales pesados en bacterias incluyen la exclusión por impermeabilidad de la membrana, la expulsión por transporte activo, la retención intracelular por unión a proteínas intracelulares, la retención extracelular y la desintoxicación por modificación química de la forma tóxica a no tóxica del metal.

Los microorganismos pueden adoptar varias estrategias para reducir la sensibilidad del metal a células dianas: (i) mutaciones que reducen la sensibilidad al metal, (ii) aumento de la producción de los componentes de la célula dañada, (iii) aumento de la eficiencia de la reparación de los componentes de la célula dañada, (iv) utilización de mecanismo de resistencia codificada por plásmidos. Estos mecanismos se pueden presentar solos o combinados. La persistencia de metales en el ambiente selecciona las cepas resistentes que poseen la resistencia o la capacidad de reducción. Los organismos aislados a partir de sedimentos contaminados con Cr (VI) son más tolerantes comparados con los que se encuentran en suelos no contaminados (Losi y Frankenberger, 1994). El plásmido asociado a la resistencia bacteriana se ha informado en *Streptococcus lactis* (Efstathiou y McKay, 1977), *Pseudomonas* sp (Summers y Jacoby, 1978), y *Alcaligenes eutrophus* (Cervantes y Silver, 1992; Nies y Silver, 1989; Peitzsch y col., 1998). Estudios con *Pseudomonas fluorescens* LB300 mostró la pérdida de resistencia al Cr (VI) en ausencia del plásmido, siendo este proceso reversible por incorporación del ADN plasmídico purificado en esta cepa (Bopp y col., 1983).

El aumento de la producción de polisacárido se ha descrito en *Pseudomonas* sp. (Aislable y Loutit, 1986). Otros estudios con *Pseudomonas ambigua* y su mutante S-1 sensible a Cr (VI) llevaron a la conclusión de que el espesor de las membranas de la célula madre disminuye la permeabilidad al Cr (VI) de las células y el aumento de la resistencia bacteriana (Horitsu y col., 1987; Horitsu y col., 1983). Las cepas de *Enterobacter cloacae* HO1 y cepas de levadura

exhiben una resistencia al Cr (VI) por disminución de la captación del tóxico (Baldi y col., 1990; Ohtake y col., 1990; Wang y col., 1989).

### **Vías de reducción del cromo (VI)**

Los microorganismos obtienen su energía para el metabolismo, al participar en varias reacciones de oxidación-reducción. La transferencia de electrones es la directriz que rige todos los procesos microbianos en ambientes donde la fotosíntesis no se produce. Dependiendo del entorno, los microorganismos se adaptan y desarrollan la capacidad de mediar procesos de oxido-reducción para conservar la energía. Por ejemplo, algunas bacterias Cr (VI) resistentes son capaces de crecer mediante la reducción de Cr (VI) a Cr (III). La reducción Cr (VI) es considerado como un proceso de reducción fortuito empleado por algunas bacterias como mecanismo de defensa para la desintoxicación del ambiente en el que tienen que sobrevivir. La mayoría de las bacterias reductoras de cromo descritas son gram negativas (Baldi y col., 1990; Francis y col., 2000).

En la actualidad, la reducción microbiana de Cr (VI) puede explicarse por dos modelos predominantes: i) la reducción enzimática directa y (ii) la reducción indirecta. La distinción entre ambos modelos enzimáticos y no enzimáticos de reducción de Cr (VI) es difícil. La reducción enzimática directa se refiere a la reducción por el sistema de reductasa del metal. El mecanismo indirecto se refiere a la reducción del Cr (VI) por las condiciones proporcionadas por la fuente bacteriana tales como el potencial redox, o los metabolitos bacterianos.

### **Reducción directa enzimática de Cr (VI)**

A pesar que las bacterias reductoras de cromo han sido estudiadas desde hace muchos años, poco se sabe acerca de la bioquímica y el mecanismo de reducción del Cr (VI). Todavía no está claro si el Cr (VI) es captado por la célula y reducido en el citoplasma o el periplasma, o los electrones se transfieren hacia el exterior de las células, o ambos. Se ha demostrado que el contacto directo entre las células y el óxido del metal es necesario para el proceso de conservación de la energía (Arnold y col., 1988). La reducción enzimática de Cr (VI) ha sido observada en algunas bacterias reductoras de cromo (Bae y col., 2000; Clark, 1994; Ganguli y Tripathi, 2001; Kaufmann y

Lovley, 2000; Oh y Choi, 1997; Suzuki y col., 1992; Yamoto y col., 1993). Las bacterias reductoras de cromo son capaces de reducir el Cr (VI) por los sistemas enzimáticos solubles o el sistema asociado a membrana. La actividad reductasa de cromato asociada a membrana se observó en *Enterobacter cloacae* HO1 en forma de precipitados insolubles de cromato reducido en la superficie celular (Wang y col., 1989). La actividad enzimática constitutiva asociada a la membrana que media la transferencia de electrones desde el NADH al cromato fue dilucidada por Bopp y col. (1988).

Los estudios realizados por Shen y Wang (1993) en *Escherichia coli* sugirieron la presencia de la reductasa de cromato soluble. La reducción de Cr (VI) en otras bacterias gram negativas, *Pseudomonas* sp CRB5, está mediada por una enzima soluble contenida en el citoplasma (McClean y Beveridge, 2001). Además de bacterias gram negativas, reductasas de cromato solubles se han observado en cepas de bacterias gram-positivas.

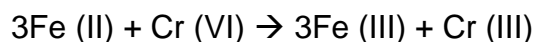
### **Reducción indirecta mediada por bacterias de Cr (VI)**

Potencial redox – pH: Durante el crecimiento de cultivos bacterianos se producen cambios en el pH y en las condiciones redox, debido a diversas reacciones bioquímicas y a los metabolitos formados. Estos cambios pueden afectar indirectamente la reducción del Cr (VI) en el medio. Un potencial redox bajo y una disminución del pH favorecen la reducción del Cr (VI) (Daulton y col., 2001).

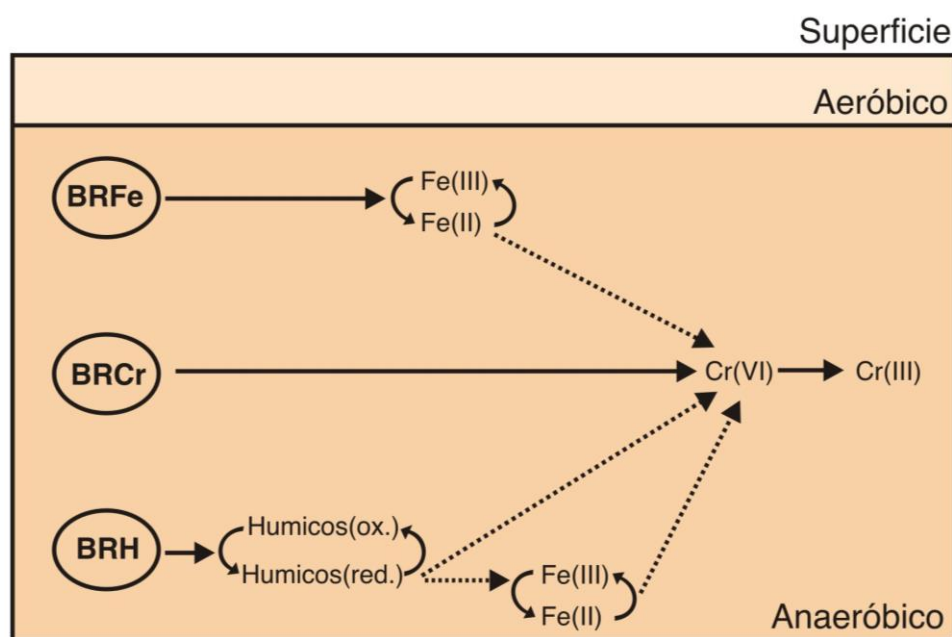
La reducción de Cr (VI) se produce en una amplia gama de potenciales redox. El rango óptimo de potencial redox no ha sido bien establecido hasta ahora. La reducción de Cr (VI) se ha informado en condiciones redox tan alta como +250 mV como a potencial redox de -500 mV (Garbisu y col., 1998).

La reducción del Cr (VI) mediada por Fe (III): El Fe (III) es el aceptor de electrones más abundante para la respiración anaeróbica en sedimentos debido a su capacidad para actuar como aceptor final de electrones para muchos organismos. La reducción microbiana de Fe (III) afecta significativamente la biogeoquímica de Cr (VI) dado que el hierro reducido en los sedimentos es uno de los dadores de electrones más significativos para la

reducción del Cr (VI). Se requieren tres equivalentes de Fe (II) para la reducción de un equivalente de Cr (VI).



Por lo tanto, la vía de reducción de Fe (III) en las bacterias puede indirectamente participar en la reducción del Cr (VI) como fue observada por Wielinga y col. (2001).



**Figura 14** | Diagrama esquemático que muestra las posibles vías de reducción anaeróbica de Cr (VI) por tres grupos de bacterias: bacterias reductoras del Fe (III) (BRFe), bacterias reductoras de Cr (VI) (BRCr) y bacterias reductoras de sustancias húmicas (BRH). Las líneas continuas representan la reducción biótica de Cr (VI) y la reducción abiótica está representada por las líneas discontinuas.

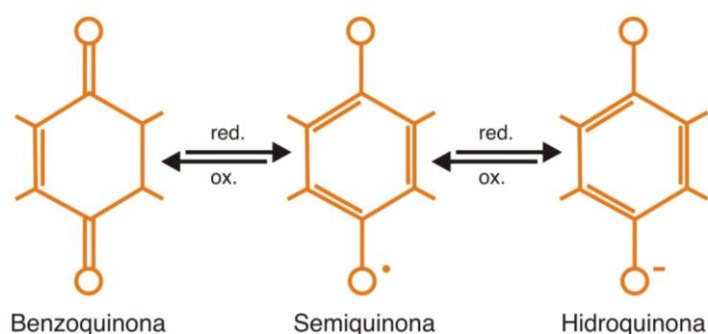
La reducción de Cr (VI) mediada por quinonas: las sustancias húmicas son omnipresentes en el ambiente. Son compuestos orgánicos heterogéneos de alto peso molecular, resistentes a la degradación microbiana. Sin embargo, se ha demostrado que las sustancias húmicas pueden actuar como aceptores de electrones y contribuir al crecimiento bacteriano en condiciones anaeróbicas (Lovley y col., 1996). Las sustancias húmicas funcionan como aceptores de electrones primarios para la reducción bacteriana de hierro, y median la transferencia de electrones hacia los óxidos de Fe (III), estimulando así la



reducción de óxidos de Fe (III) insolubles (Figura 15) (Lovley y col., 1996). Las quinonas son las principalesceptoras de electrones respecto al resto de los ácidos húmicos cuando se reducen a hidroquinonas mediante la aceptación de dos electrones, como se muestra en la Figura 16.



**Figura 15** | Modelo que muestra la reducción de Fe (III) mediada por ácidos húmicos.



**Figura 16** | Modelo de Quinona.

Las bacterias reductoras húmicas se han aislado a partir de una variedad de ambientes (Coates y col., 1998). La mayoría de las bacterias reductoras de hierro que han sido estudiadas presentan la capacidad de transferir electrones a las sustancias húmicas y otras quinonas extracelulares (Lovley y col., 1998). Aunque no ha sido reportada la reducción del Cr (VI) mediada por sustancias húmicas, la transferencia de electrones desde dichas sustancias ( $E_h = 0,2\text{mV}$ ) al Cr (VI) ( $E_h = 1,23\text{mV}$ ) es termodinámicamente favorable.

## **Factores que influyen en la reducción microbiana de cromo**

**La densidad celular.** Se ha demostrado que la velocidad de reducción de Cr (VI) es afectada por la densidad celular en ambas condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Wang y col. (1989) informaron un aumento en la velocidad de reducción de Cr (VI) con el aumento de la densidad celular bajo condiciones anaeróbicas. Similares observaciones fueron hechas en cultivos, tanto aeróbicos como anaeróbicos de *Escherichia coli*. Sin embargo, la velocidad de reducción de Cr (VI) no era proporcional al incremento de la densidad celular, la velocidad específica de reducción de Cr (VI) fue mayor a densidades celulares relativamente bajas (Shen y Wang, 1994). Estas observaciones también fueron documentadas en cultivos de *Enterobacter cloacae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* LB300, *Bacillus coagulans* y *Microbacterium* sp.

**La concentración inicial de Cr.** Dependiendo de la concentración inicial de Cr (VI), se ha observado una reducción completa o incompleta del tóxico en *Enterobacter cloacae* HO1 (Fujie y col., 1990; Komori y col., 1989). Se ha observado una disminución de la viabilidad celular en cultivos en fase de crecimiento adicionados con Cr (VI) (Komori y col., 1989; Wang y col., 1989); sin embargo, la velocidad inicial de reducción de Cr (VI) aumentó con el incremento de la concentración inicial de Cr (VI) en cultivos de *Enterobacter cloacae* (Wang y col., 1989), *Escherichia coli* (Shen y Yi-Tin, 1994), *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* sp (Wang y Xiao, 1995). De manera similar, la velocidad inicial específica de reducción de Cr (VI) en cultivos de *Escherichia coli* se incrementó con el aumento de las concentraciones de Cr (VI), pero se requiere un tiempo más prolongado para la reducción completa (Shen y Wang, 1994).

**El efecto de otros aceptores de electrones.** La presencia de oxígeno no inhibe completamente la reducción de Cr (VI) en algunas bacterias, pero lo reprime como en el caso de *Agrobacterium radiobacter* BPA-916, *Escherichia coli* ATCC 33456 y *Pseudomonas stutzeri* CMG463 (Badar y col., 2000; Komori

y col.,1989; Llovera y col.,1993; Shen y Yi-Tin, 1994; Shen y Wang, 1993; Wang y Shen, 1995). La reducción microbiana de Cr (VI) se inhibió completamente en condiciones aeróbicas como en el caso de *Enterobacter cloacae* HO1, aunque se observó crecimiento celular (Fujie y col., 1990). Los estudios con microcosmos enriquecidos de Marsh y col. (2000) mostraron que bajo condiciones aeróbicas sólo hubo un 41% de reducción de Cr (VI), en comparación con el 84% observado en condiciones anaerobias concluyendo que el oxígeno y el nitrato inhiben la reducción de Cr (VI).

Entre otros principales aceptores de electrones de origen natural, sulfato y nitrato tienen poco efecto sobre la reducción de Cr (VI) hasta concentraciones de 10 mM y 16 mM, respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que la concentración de sulfatos y nitratos que no afectan la reducción microbiana de Cr (VI) varía en las diferentes especies bacterianas.

**Los efectos de la temperatura y el pH.** La temperatura óptima y condiciones de pH reportados para la reducción microbiana de Cr (VI) sugieren que el proceso de reducción está íntimamente relacionado con el crecimiento bacteriano. Se observó que la reducción de Cr (VI) en cultivos de *Enterobacter cloacae* ocurre en un rango de pH de 6,0 a 8,5 y valores de pH entre 3,0 a 8,0 para cultivos de *Escherichia coli* y *Bacillus coagulans*. Sin embargo, la velocidad específica inicial máxima de reducción de Cr (VI) de las tres bacterias fue a pH 7, un pH óptimo para el crecimiento bacteriano. A pesar que la reducción de Cr (VI) en *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* se produjo en una amplia gama de temperatura de 10°C a 50°C, la temperatura óptima se encontró que era 36°C y 30°C respectivamente. Estas condiciones son óptimas para el crecimiento de las bacterias anaerobias. Estudios en sedimentos han demostrado que las condiciones óptimas de temperatura son de 22°C y 50°C, a pH de 6,8 (Marsh y col., 2000).

**Las fuentes de carbono.** Se han realizado estudios para tratar de establecer la relación entre los dadores de electrones y la velocidad de reducción de Cr (VI). Estudios de enriquecimiento en suelos realizados por Marsh y McInermey (2001), demostraron que el hidrógeno puede ser un dador de electrones eficiente para la reducción de Cr (VI). La adición de dadores de electrones que

aumenta la biodisponibilidad de hidrógeno, tales como glucosa, formiato, e hidrógeno, estimulan la reducción de Cr (VI) en los suelos en comparación con acetato, benzoato y lactato. El estudio también documentó que la concentración de hidrógeno disuelto en las condiciones de reducción de Cr (VI) es muy baja. Esta condición es similar a las condiciones reductoras en presencia de nitratos y de manganeso, y que la reducción de Cr (VI) se produce antes que la reducción de hierro o sulfato, se concluye que no se requieren condiciones altamente reductoras para el Cr (VI) (Marsh y McInermey, 2001).

# OBJETIVOS

Las principales amenazas de metales pesados para la salud humana están asociadas principalmente a la exposición a plomo, cadmio, cromo, mercurio y arsénico. El cromo (VI), catalogado contaminante de prioridad 1 por la Agencia de Protección Ambiental – USA, es considerado la especie más tóxica, carcinogénica y mutagénica. La bioreducción de cromo (VI) puede ocurrir directamente como resultado del metabolismo microbiano a través de vías enzimáticas, o indirectamente a través de un metabolito bacteriano como el ácido sulfhídrico (Losi y col., 1994). *Escherichia coli* tiene la capacidad de reducir el cromo (VI) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, siendo la actividad reductasa soluble el principal mecanismo de reducción del metal (Shen y Wang, 1993; Wang y Shen, 1995).

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Estudiar la sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 35218, a metales contaminantes como cromo, plomo y cadmio.
- Evaluar la capacidad de respuesta del microorganismo a posibles efectos tóxicos sinérgicos de soluciones multimetal (cromo, plomo y cadmio)
- Analizar el efecto del cromo (III) y cromo (VI) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 con el fin de determinar la toxicidad de estas especies químicas.
- Estudiar el desarrollo de tolerancia al cromo (VI) en *Escherichia coli* ATCC 35218 considerando dos variables concentración y tiempo de exposición al tóxico.
- Analizar la actividad de reductasa de *Escherichia coli* ATCC 35218 como mecanismo responsable de la tolerancia al cromo (VI).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se usó un cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 35218) en fase exponencial, empleando como caldo de cultivo el medio Luria-Bertani (LB). Los tubos conteniendo 3 mL del caldo LB fueron inoculados con un precultivo de 18 horas de forma tal de obtener una densidad óptica de 0.05 a 650 nm, y posteriormente incubados a 37°C. La velocidad de crecimiento se determinó por espectrofotometría a 650 nm durante la fase exponencial a intervalos de 1 hora durante 5 horas, empleando un espectrofotómetro Metrolab 300 (Argentina).

- Estudiar la sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 35218, a metales contaminantes como cromo, plomo y cadmio.

Se usó un tubo control que no contiene cromo, plomo o cadmio, y tubos conteniendo el tóxico (cromo, plomo o cadmio) en orden creciente de concentración. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron utilizando los siguientes parámetros: densidad óptica (D.O.) y porcentaje de inhibición del crecimiento (% de inhibición =  $100 - (At/Atc) \times 100$ ) donde At: absorbancia a tiempo T, Atc: absorbancia control a tiempo T, T: tiempo en horas.

#### Protocolo experimental para cromo:

Los reactivos utilizados fueron dicromato de potasio (Merck) y cloruro de cromo (III) (Sigma).

Se usaron las siguientes concentraciones de cromo (VI): 0,05 - 0,5 - 5 - 25 - 50 - 100 y 200 ppm; las concentraciones ensayadas de cromo (III) fueron 25, 50, 75, 100, 200, 400 ppm.

#### Protocolo experimental para plomo:

Se usó como reactivo nitrato de plomo (II) (Cicarelli). Se ensayaron las siguientes concentraciones de plomo (II): 10, 25, 50, 100 y 200 ppm.



Protocolo experimental para cadmio:

Se usó como reactivo cloruro de cadmio (Merck). Se emplearon las siguientes concentraciones de cadmio: 10, 25, 50, 100 y 200 ppm.

- Evaluar la capacidad de respuesta del microorganismo a posibles efectos tóxicos sinérgicos de soluciones multimetal (cromo, plomo y cadmio)

Para este fin, las células bacterianas crecieron en el medio LB en presencia de distintas concentraciones de cromo (VI: control) o en presencia de soluciones bimetales de cromo y cadmio (50 ppm), cromo y plomo (50 ppm) o en presencia de soluciones trimetales conteniendo cromo, plomo (50 ppm) y cadmio (50 ppm). Se determinó la densidad óptica (D.O.) durante la fase exponencial después de la incubación.

- Estudiar el desarrollo de tolerancia al cromo (VI) en *Escherichia coli* ATCC 35218 considerando dos variables concentración y tiempo de exposición al tóxico.

Se realizó considerando dos variables: concentración de cromo (VI: 0,25 – 2,5 y 25 ppm) y tiempo de exposición (72 y 120 hs). La adaptación de la *Escherichia coli* al cromo se realizó inoculando el medio de cultivo, en ausencia o presencia de cromo (VI), con un precultivo de *Escherichia coli* de 18 hs, y se incubó durante un determinado tiempo a 37°C con renovación del medio de cultivo para evitar el agotamiento de nutrientes. Por último, para evaluar la tolerancia al cromo se procedió a sembrar en caldo LB un inóculo de bacterias adaptadas para obtener una densidad óptica de 0,05 a 650 nm, y posteriormente se procedió según el protocolo descrito para evaluar la sensibilidad al metal contaminante.

- Analizar la actividad de reductasa de *Escherichia coli* ATCC 35218 como mecanismo responsable de la tolerancia al cromo (VI).

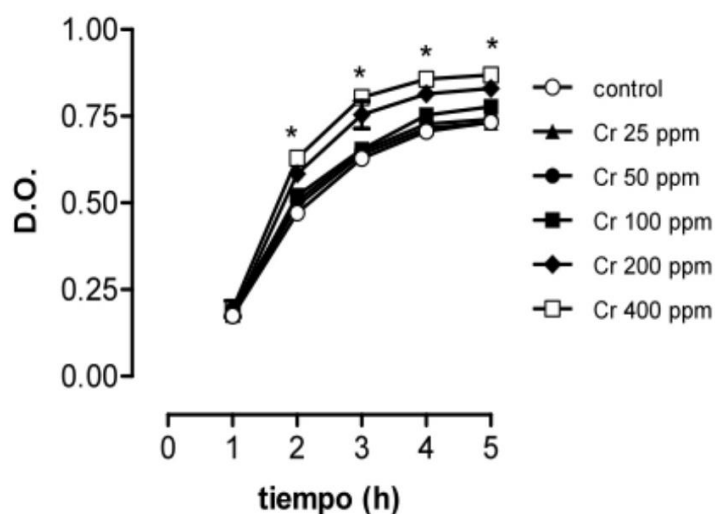
Se realizó una centrifugación de las células en crecimiento según el protocolo experimental, y en el sobrenadante se determinó la concentración de cromo (VI) a través del método colorimétrico de la difenilcarbazida a 540 nm. La concentración de cromo total se analizó por espectrometría de absorción atómica en un espectrofotómetro de absorción atómica Buck 210 (USA). Se utilizó para el análisis una llama de aire-acetileno y la lectura se realizó a 357,9 nm.

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error standard de la media. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de un factor. Las comparaciones “*a posteriori*” se realizaron mediante el test de Dunnett. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  para todos los casos.

# RESULTADOS

## 1. Efecto del cromo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218

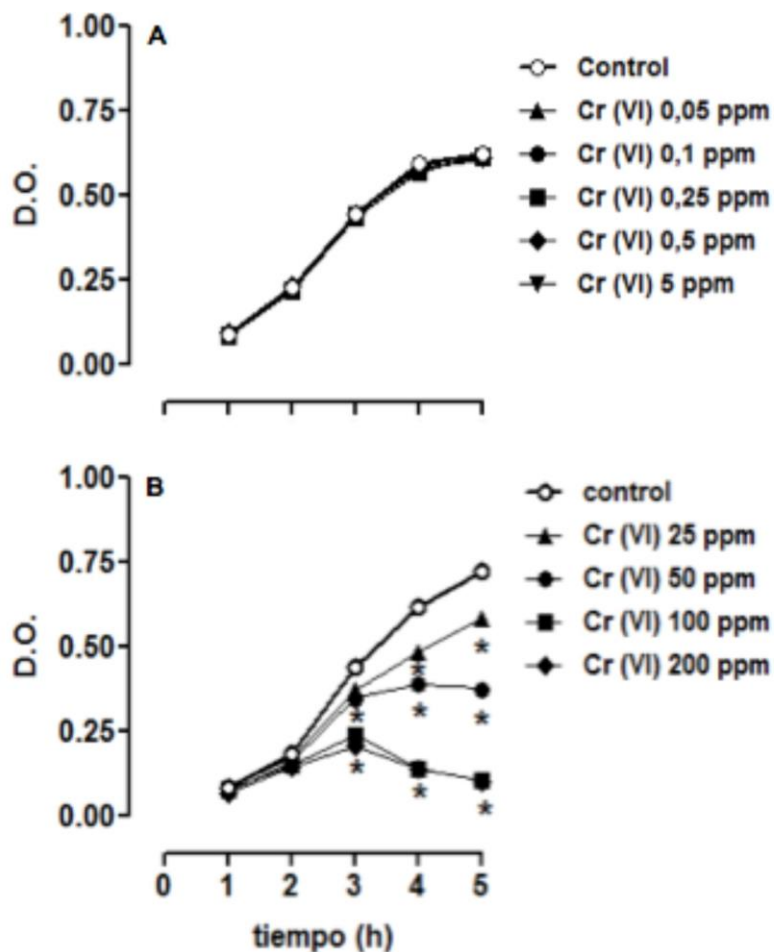
Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de una solución unimetal de cromo (VI: 0,05 – 200 ppm) o cromo (III: 25 - 400 ppm), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* en fase exponencial. El cromo (III) en un rango de concentración entre 25 y 100 ppm no modificó la curva de crecimiento del microorganismo ensayado mientras que concentraciones mayores (200 – 400 ppm) produjeron un aumento significativo del crecimiento bacteriano (Figura 17).



**Figura 17 | Efecto del cromo trivalente sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218**

Las células crecieron en medio LB en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de cromo. Se determinó la densidad óptica (D.O.) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n=3). \*  $p < 0,05$  vs. el valor control correspondiente (Análisis de la varianza – test de Dunnett).

En las Figuras 18A y 18B se observa el efecto del cromo VI sobre *Escherichia coli* a una concentración 0,05 - 5 ppm y 25 – 200 ppm, respectivamente. Se destaca que bajas concentraciones de cromo hexavalente (0,05 – 5 ppm) no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (Figura 18A) mientras que altas concentraciones de cromo VI (25 – 200 ppm) causaron una inhibición concentración-dependiente del crecimiento bacteriano (Figura 18B). Los porcentajes máximos de inhibición fueron de  $19,4 \pm 0,9$ ,  $48,2 \pm 0,5$ ,  $85,7 \pm 0,8$ ,  $86 \pm 1,7$  (n=3) para 25, 50, 100 y 200 ppm, respectivamente.

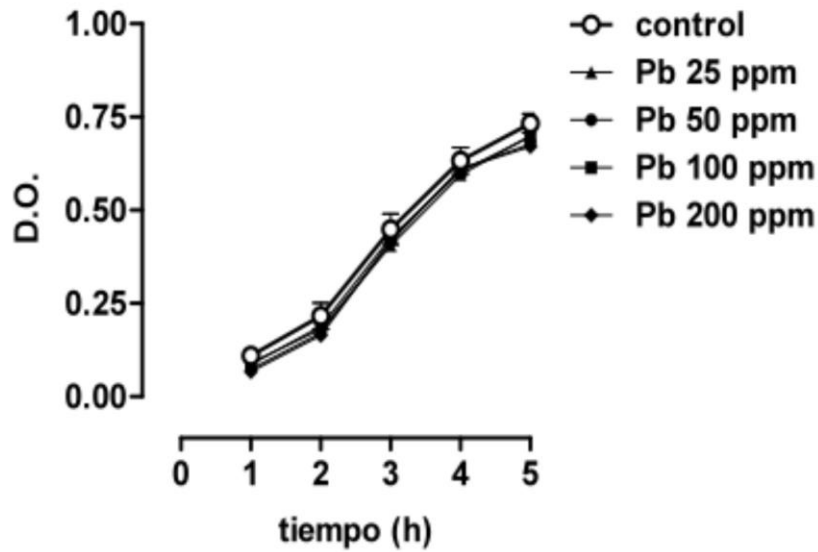


**Figura 18 | Efecto del cromo hexavalente sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218**

Las células crecieron en medio LB en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de cromo (VI). Se determinó la densidad óptica (D.O.) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n=3). \*  $p < 0,05$  vs. el valor control correspondiente (Análisis de la varianza – test de Dunnett).

## 2. Efecto del plomo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218

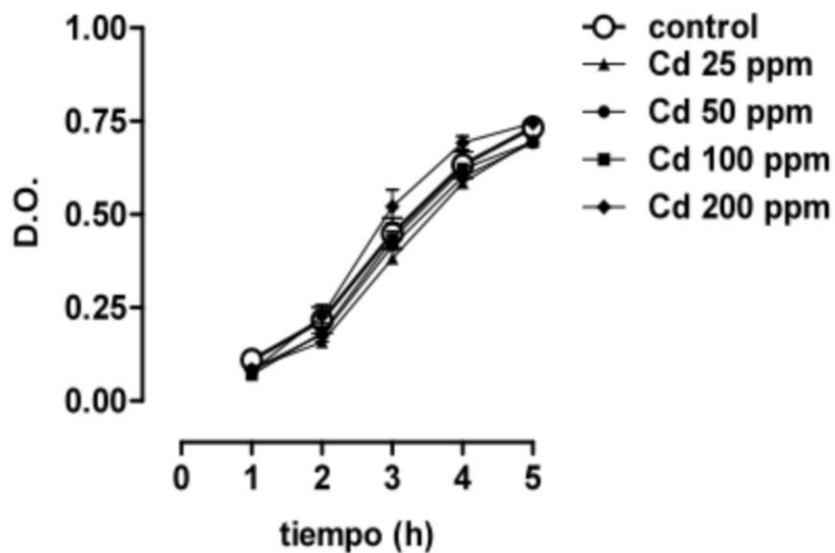
La Figura 19 muestra, el efecto sobre el crecimiento bacteriano de las distintas concentraciones de Pb ensayadas, observando que no hay modificaciones en las curvas respecto al control.



**Figura 19** | Efecto del plomo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218

Las células crecieron en medio LB en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de plomo. Se determinó la densidad óptica (D.O.) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n=3)

### 3. Efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218



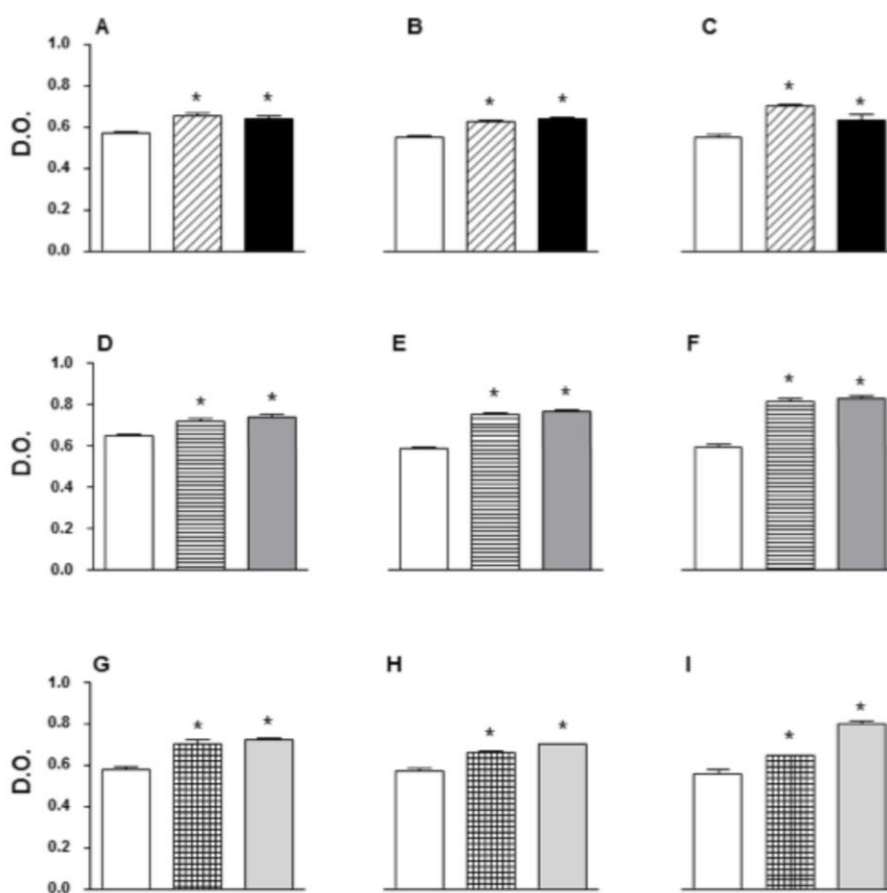
**Figura 20** | Efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218

Las células crecieron en medio LB en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de cadmio. Se determinó la densidad óptica (D.O.) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n=3).

Los resultados obtenidos muestran que la curva de crecimiento de *Escherichia coli* no fue alterada en forma significativa por el cadmio, en un rango de concentración comprendido entre 25 y 100 ppm (Figura 20).

#### 4. Efecto del cromo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 en presencia de plomo y cadmio

Se analizó el efecto del cromo hexavalente sobre el crecimiento bacteriano en presencia de plomo y cadmio, dos metales altamente tóxicos que se presentan frecuentemente con el cromo.



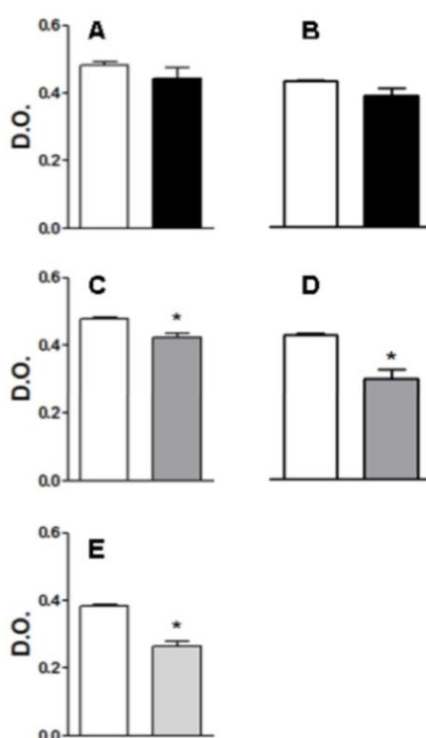
**Figura 21 | Estimulación del crecimiento bacteriano inducido por bajas concentraciones de cromo: potenciación en presencia de cadmio y plomo.**

Las células crecieron en medio LB en presencia de distintas concentraciones de cromo VI: control, barras vacías: 0,05 ppm en A-D-G; 0,5 ppm en B-E-H; 5 ppm en C-F-I. En presencia de soluciones bimetales de cromo y cadmio, barras rayadas diagonal: Cd 25 ppm y barras negras: Cd 50 ppm en A-B-C. Cromo y plomo, barras rayadas horizontal: Pb 25 ppm y barras grises: Pb 50 ppm en D-E-F. En presencia de soluciones multimetal conteniendo cromo, cadmio y plomo, barras cuadrículadas: Cd y Pb 25 ppm; barras grises claras: Cd y Pb 50 ppm en G-H-I. Se representa la densidad óptica (D.O.) obtenida a las 4 h después de la incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3). \*  $p < 0,05$  vs. el valor correspondiente a Cr(VI) (Análisis de la varianza – Test de Dunnett)

En presencia de cadmio, plomo o ambos (25 o 50 ppm), el cromo (VI: 0,05 - 5 ppm) produjo un aumento significativo del crecimiento de *Escherichia coli* (Figura 21).

El plomo potenció el efecto inhibitorio inducido por altas concentraciones de cromo (VI: 25 – 50 ppm) mientras que el cadmio no tuvo efecto según se observa en la Figura 22 A, B, C - D. La incubación conjunta de los tres metales en una concentración de 50 ppm produjo un porcentaje de inhibición que no difiere significativamente del obtenido cuando se ensayaron cromo y plomo conjuntamente (Figura 22 E).

El crecimiento bacteriano en presencia de soluciones bi- o multimetal de cromo (III) no difiere del obtenido con soluciones unimetal del mismo (datos no mostrados).



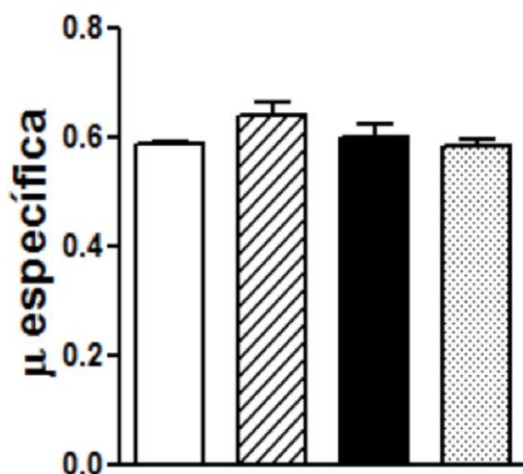
**Figura 22 | Inhibición del crecimiento bacteriano inducido por concentraciones altas de cromo: efecto del plomo y del cadmio.**

Las células crecieron en medio LB en presencia de distintas concentraciones de cromo (VI: control, barras vacías: 25 ppm en A-C; 50 ppm en B-D-E). En presencia de soluciones bimetales de cromo y cadmio (barras negras: Cd 50 ppm en A-B); de cromo y plomo (barras grises: Pb 50 ppm en C-D). En presencia de soluciones multimetal conteniendo cromo, cadmio y plomo (barras grises claras: Cd y Pb 50 ppm en E). Se representa la densidad óptica (D.O.) obtenida a las 4 h después de la incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3). \*  $p < 0,05$  vs. el valor correspondiente a Cr (VI) (Análisis de la varianza – Test de Dunnett).



## 5. Adaptación de la *Escherichia coli* ATCC 35218 al cromo

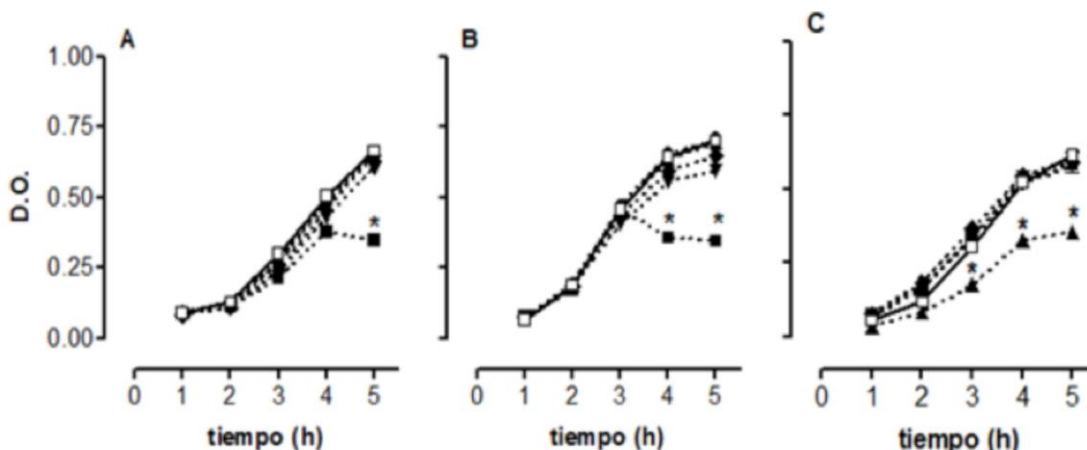
En *Escherichia coli* no adaptadas al cromo (VI), la velocidad de crecimiento específico resultó  $0,586 \pm 0,004$  (n=3) mientras que en *Escherichia coli* adaptadas durante 72 h al cromo (VI: 0,25 - 2,5 o 25 ppm) es de  $0,638 \pm 0,025$ ,  $0,599 \pm 0,023$  y  $0,581 \pm 0,013$  respectivamente (n=3, p >0,05) Figura 23.



**Figura 23** | Velocidad de crecimiento específico de *Escherichia coli* ATCC 35218 expuestas a cromo (VI) durante 72 h

Las células crecieron en ausencia (control, barra vacía) y en presencia de 0,25 (barra rayada), 2,5 (barra negra) y 25 ppm (barra punteada) de cromo (VI) durante 72 h. Se representa la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) obtenida a las 4 h después de la incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3).

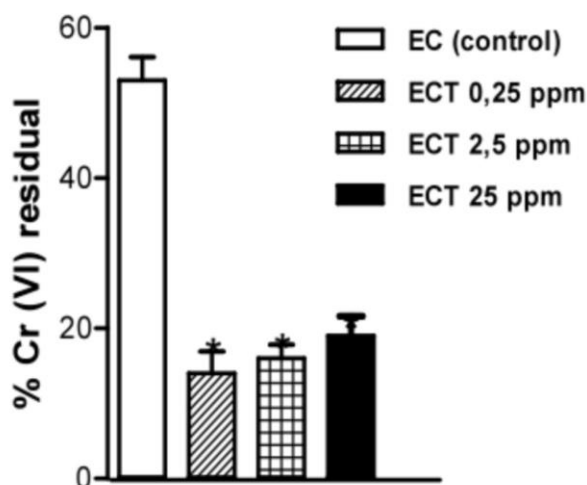
El cromo (VI: 25 - 200 ppm; n=3) no inhibió significativamente el crecimiento bacteriano mientras que 500 ppm del metal produjo una inhibición de aproximadamente un 35 % en el microorganismo adaptado al tóxico (Figura 24). En la Figura 18B se puede observar que el cromo (VI), en el mismo rango de concentración, causó una inhibición concentración dependiente del crecimiento de *Escherichia coli* no adaptadas al tóxico.



**Figura 24** | Efecto del cromo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* adaptadas a diferentes concentraciones de cromo durante 72 horas

Se representa la densidad óptica (D.O.) vs. tiempo (h) durante la fase exponencial de cultivos de *Escherichia coli* adaptadas durante 72 horas a 0,25 ppm de Cr (A), a 2,5 ppm de Cr (B) y a 25 ppm de Cr (C) en ausencia de cromo (control) y en presencia de diferentes concentraciones del metal (rombo lleno: 25 ppm; cuadrado lleno: 50 ppm; triángulo invertido lleno: 100 ppm; círculos lleno: 200 ppm; triángulo lleno: 500 ppm). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3). \*  $p < 0,05$  vs. el valor correspondiente a Cr (VI) (Análisis de la varianza – Test de Dunnett).

La capacidad de reducción de cromo (VI) fue significativamente mayor en *Escherichia coli* adaptadas al cromo (Figura 25).

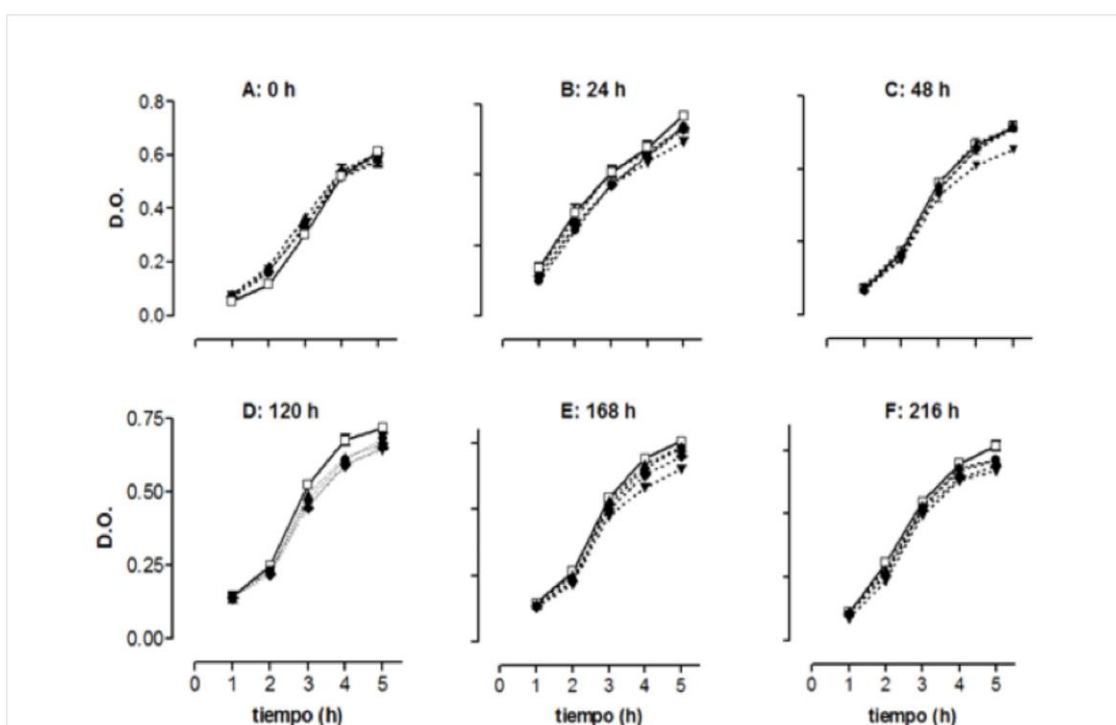


**Figura 25** | Capacidad de reducción de Cromo (VI) en *Escherichia coli* ATCC 35218 adaptadas a cromo (VI) durante 72 h

Las células crecieron en ausencia (control) y en presencia de 2,5 y 25 ppm de cromo (VI) durante 72 h. Se representa el porcentaje de cromo (VI) residual obtenido para una concentración inicial del tóxico de 25 ppm. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3). \*  $p < 0,001$  vs el valor correspondiente en EC (Análisis de la varianza- Test de Newman Keuls).

Para una concentración inicial de cromo (VI) de 25 ppm, el porcentaje de cromo residual fue de 14%, 16% y 19% para el cultivo adaptado a 0,25 - 2,5 y 25 ppm, mientras que para el cultivo no adaptado fue del 53% (Figura 25).

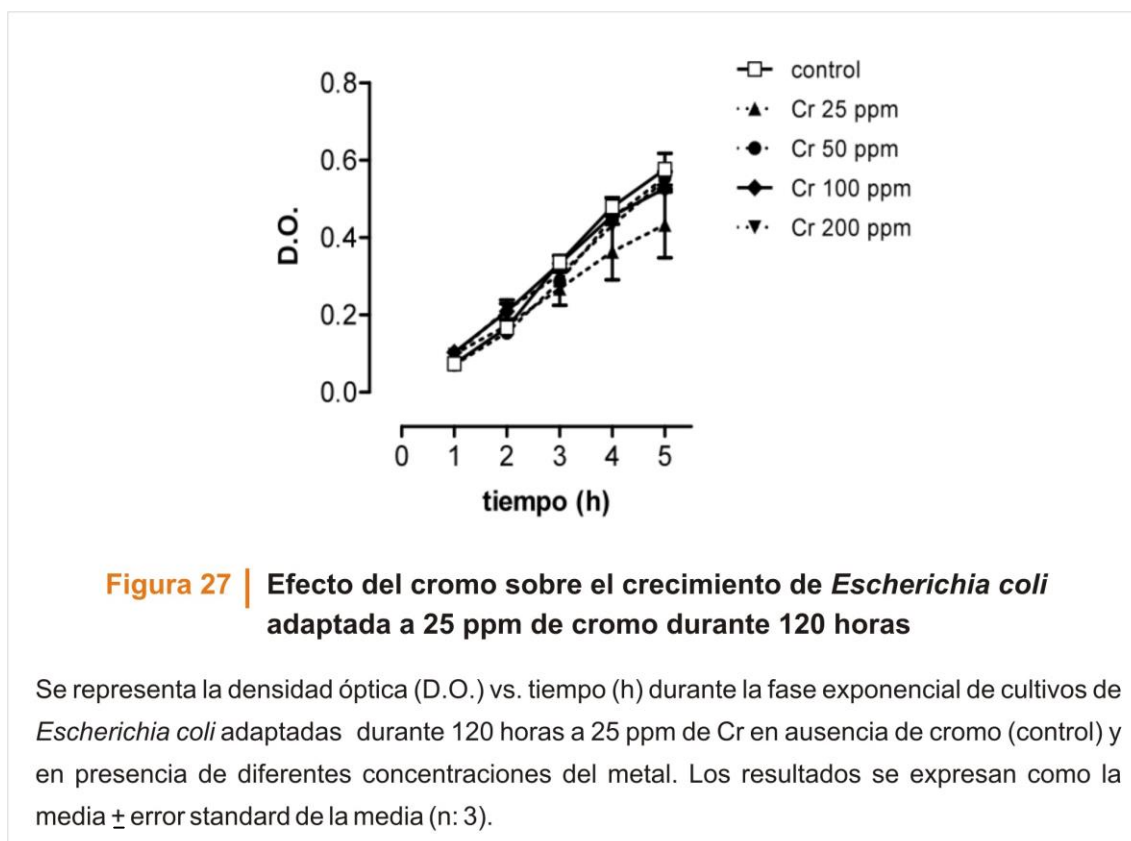
Se analizó temporalmente en *Escherichia coli* adaptadas a una concentración de cromo de 25 ppm durante 72 horas el comportamiento frente a concentraciones del tóxico de 25 a 200 ppm a las 24, 48, 120, 168 y 216 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26. Se puede observar que en el rango de concentración estudiado el cromo no modifica significativamente el crecimiento bacteriano.



**Figura 26** | Análisis temporal del efecto del cromo en *Escherichia coli* ATCC 35218 adaptadas a cromo (VI) durante 72 h

Se representa la densidad óptica (D.O.) vs. tiempo (h) durante la fase exponencial de cultivos de *Escherichia coli* adaptadas durante 72 horas a 25 ppm de Cr. En ausencia de cromo (control, cuadrados vacíos) y en presencia de diferentes concentraciones del metal (triángulo lleno: 25 ppm; círculo lleno: 50 ppm; rombo lleno: 100 ppm; triángulo invertido lleno: 200 ppm) a los siguientes tiempos post-adaptación: 0 h en A; 24h en B; 48 h en C; 120 h en D; 168 h en E y 216 h en F. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de la media (n: 3).

Se estudió la adaptación de *Escherichia coli* ATCC 35218 a 25 ppm de cromo durante 120 horas. En estas condiciones experimentales, el cromo no alteró el crecimiento bacteriano cuando se ensayaron concentraciones del tóxico de 25 a 200 ppm (Figura 27).



La capacidad de reducción de cromo (VI) fue significativamente mayor en *Escherichia coli* adaptadas al cromo. Para una concentración inicial de cromo (VI) de 25 ppm, el porcentaje de cromo residual fue 13% para el cultivo adaptado mientras que para el cultivo no adaptado fue del 54,5%. Por otro lado, la capacidad reductora de cromo hexavalente no difiere significativamente de la obtenida para un tiempo de adaptación de 72 h (Figura 25).

# **DISCUSIÓN y CONCLUSIONES**

En general, los metales desempeñan un papel integral en la vida microbiana. Entre estos elementos químicos, el cromo es considerado como un micronutriente necesario para el crecimiento biológico, es decir, un elemento esencial (Bruins y col., 2000). En el hombre y otros mamíferos, el cromo (III) contribuye al mantenimiento de la glucemia a través de la regulación del metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos, optimizando la señalización de la insulina (Stearns, 2007). Por otro lado, el cromo en su estado fundamental no causa efectos adversos en el hombre mientras que el cromo hexavalente presenta efectos tóxicos agudos y crónicos (Baruthio, 1992). Sin embargo, el papel del cromo (III) como micronutriente esencial es controversial debido en parte a la falta de conocimiento de las vías bioquímicas de esta especie química. En resumen, la esencialidad o la toxicidad del cromo depende del estado de oxidación y de la localización celular (Cervantes y Campos-García, 2007; Ramírez y Díaz, 2008).

El estado de oxidación y la solubilidad son determinantes importantes en los efectos biológicos de los compuestos de cromo (Cervantes y Campos-García, 2007). Existen estudios que sugieren que el cromo sólo posee efectos tóxicos sobre microorganismos y plantas (Ramírez y Díaz, 2008) mientras que otros sugieren que este metal puede causar una estimulación del crecimiento bacteriano a bajas concentraciones, inclusive en su estado de oxidación hexavalente (Yetis y col., 1999; Gikas y Romano, 2006).

Numerosas especies bacterianas pueden acumular cromo a través de un transporte activo del metal mediante el transportador del anión sulfato (Nies y Silver, 1995). El cromato, que posee cuatro oxígenos unidos al cromo y dos cargas negativas, presenta una similitud estructural con el sulfato y se comporta como un inhibidor competitivo del transporte de este anión (Nies, 1999). En contraste, la mayoría de las células son impermeables al cromo (III) que forma en general compuestos insolubles en ambientes no ácidos (pH neutro a ligeramente básico). El cromo (VI) es más móvil que el cromo (III) y puede atravesar con cierta facilidad las membranas biológicas. En el interior de las células, el cromo (VI) es reducido a cromo (III), el cual puede ejercer diversos efectos biológicos (Bencheike-Latmani y col., 2007; Cervantes y Campos-García, 2007). Específicamente, el modo de acción aceptado para el cromo hexavalente (como anión cromato) incluye el ingreso a la célula a través

del transportador de aniones ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y reacciones subsecuentes con agentes reductores como glutatión, ascorbato, o NAD(P)H, que generan intermediarios altamente reactivos como el cromo (IV) y (V), y que causan daño al ADN. Finalmente, estas reacciones conducen a la formación de uniones cruzadas entre cromo (III)- proteínas- ADN y cromo (III)-ADN, altamente estables y que producen la interrupción de los procesos de transcripción (Levinaa y col., 2007). En el caso que el cromo (VI) sea reducido en el lado externo de la membrana celular, el cromo (III) formado no puede ingresar a la célula. En resumen, el cromo (VI) es altamente tóxico para la mayoría de las bacterias y el cromo (III) es relativamente inocuo debido a ser una especie insoluble y, en consecuencia, incapaz de atravesar las membranas celulares (Cervantes y Campos-García, 2007).

La respuesta cuali y cuantitativa de un microorganismo a un determinado metal pesado depende del tóxico y de la cepa analizada. En este estudio, el cromo trivalente no produjo en el rango de concentración utilizado una disminución del crecimiento bacteriano. En contraste, la forma hexavalente de este metal causó un efecto tóxico sobre el crecimiento bacteriano. Este efecto diferencial de las especies de cromo ensayadas puede atribuirse a que el cromo (VI), como anión cromato, puede atravesar la membrana celular a través del transporte de sulfato mientras que el cromo (III) no es sustrato del mismo con lo cual el acceso al interior de la célula es limitado. Este hecho podría explicar las diferencias en la capacidad de estas dos especies de cromo de inducir la formación de especies reactivas del oxígeno y producir daño oxidativo celular (Bagchi y col., 2002; Ramirez-Diaz y col., 2008). En este sentido, Ackerley y col. (2006) demostraron que la exposición de cultivos de *Escherichia coli* K-12 a cromato desencadena un efecto prooxidante que afecta el crecimiento y la morfología celular, causa una depleción de los *pools* intracelulares de glutatión y otros grupos tioles libres, y la activación de mecanismos antioxidantes como la inducción de las proteínas SodB, CysN y CysK que contrarrestan el stress oxidativo. Helbig y col. (2009) demostraron la importancia del glutatión en el mantenimiento de la homeostasis de distintos metales de transición, incluido el cromo, a través de la delección del gen *gsh A* que codifica para la  $\gamma$ -Glu-Cys sintetasa, o del gen *gshB* que codifica para la glutatión sintetasa, o de ambos en la cepa W3110 de *Escherichia coli*.

En este estudio, la curva de crecimiento de *Escherichia coli* no fue alterada en forma significativa por el cadmio o el plomo, en un rango de concentración de 25 a 200 ppm. Es importante mencionar, que existen estudios en los cuales se observa un efecto tóxico de estos metales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (Peng y col., 2007; Helbig y col., 2008; Kalantari y Ghaffari, 2008) en un rango de concentración similar al empleado en el presente estudio.

La toxicidad del cromo hexavalente sobre el crecimiento bacteriano puede ser afectada por la presencia de otros metales debido a sinergismo o antagonismo. Se han descrito efectos sinérgicos entre el cromo (VI) y el níquel en la estimulación del crecimiento en lodos activados (Dilek y col., 1998). Por el contrario, Rai y Raizada (1989) encontraron un efecto sinérgico inhibitorio o estimulador sobre el crecimiento de cianobacterias entre el cromo (VI) y el níquel o plomo, respectivamente.

En el presente estudio, el empleo de soluciones bimetales o trimetales conteniendo plomo, en una concentración que *per se* no modifica el crecimiento bacteriano, causó un mayor efecto inhibitorio del obtenido con soluciones unimetales de cromo. Por el contrario, el empleo de soluciones conteniendo cadmio no tuvieron efecto sobre la respuesta obtenida en presencia de cromo únicamente. La potenciación del efecto inhibitorio del cromo hexavalente causado por el plomo podría atribuirse a que este metal altera la integridad de la membrana celular en *Escherichia coli*. En este sentido, Peng y col. (2007) sugieren que dada la similitud entre el radio iónico y la relación carga/radio, el plomo (II) puede reemplazar al calcio (II) de los sitios de unión a los lipopolisacáridos causando una ruptura de las áreas de protección de la superficie celular.

Se han descrito los siguientes mecanismos de resistencia a metales pesados en células procariotas como exclusión por alteración de la permeabilidad celular por modificación de la composición química de la membrana, secuestro intra- o extracelular, eflujo a través de mecanismos de transporte activo, detoxificación enzimática, reducción de la sensibilidad de los “blancos” celulares del tóxico, entre otros (Bruins y col., 2000).



La resistencia celular al cromo está basada principalmente en dos procesos: eflujo y reducción del cromo (VI) a cromo (III) (Nies, 1999). Se han aislado numerosas cepas bacterianas resistentes al cromo en las cuales se ha sugerido que los mecanismos de resistencia a este tóxico podrían estar codificados en plásmidos o en genes bacterianos (Niess y col., 1998; Cervantes y Campos-García, 2007). Generalmente, los genes localizados en plásmidos codifican para transportadores de membrana los cuales participan directamente en el eflujo de iones cromato del citoplasma celular. Por otro lado, los sistemas de resistencia codificados dentro de los cromosomas bacterianos están relacionados con la reducción específica o inespecífica de cromo (VI), actividad de detoxificación de radicales libres, y mecanismos de reparación de daños al ADN (Vaiopoulou y Gikas, 2012).

El eflujo transmembrana de cromato es un mecanismo de resistencia en el que interviene la proteína ChrA que actúa como una bomba quimioosmótica que expulsa los iones cromato citoplasmático según la fuerza de protones, y es inhibida por iones sulfato. Este mecanismo de resistencia se ha descrito en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y en *Cupriavidus metallidurans* (Ramirez-Díaz y col., 2008), entre otras. La reducción bacteriana de cromo (VI) a (III) como mecanismo de resistencia ha sido descrito en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En el primer caso, la reducción de cromato está asociada con un sistema de reductasa de cromato soluble que utiliza NADH o NADPH como cofactor. En condiciones anaeróbicas, algunas bacterias como *Pseudomonas fluorescens* LB 300 (Bopp y Ehrlich, 1988) pueden usar el cromo (VI) como aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones. Además, la reducción de cromo (VI) puede tener lugar a través de reacciones químicas asociadas con diferentes compuestos como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, ácidos orgánicos o glutatión. La reducción enzimática de cromo (VI) ha sido estudiada en diferentes bacterias entre las que se destacan *Enterobacter cloacae* HO1 (Ohtake y col., 1990); *Pseudomonas putida* (Ackerley y col., 2004) y *Escherichia coli* (Bae y col., 2000, 2005). En este último trabajo se purificó y caracterizó la reductasa de Cr (VI) que posee una estructura dimérica, requiere NADH o NAD(P)H como cofactor, y es activa a temperaturas comprendidas entre 10 a 37°C, y en un rango de pH de 6 a 8.

En este trabajo, se estudió la adaptación de *Escherichia coli* ATCC 35218 al cromo hexavalente considerando dos variables: concentración del tóxico y tiempo de exposición. Los resultados obtenidos muestran que la bacteria puede tolerar concentraciones muy elevadas de cromo (VI) como 200 ppm cuando la adaptación ocurre durante 72 o 120 horas en presencia tanto de una concentración del tóxico muy baja (0,25 ppm) que no modifica el crecimiento bacteriano como en presencia de una concentración de cromo similar a la encontrada en ciertos efluentes industriales (25 ppm) que inhibe el crecimiento bacteriano en *Escherichia coli* no adaptadas. Este desarrollo de tolerancia al cromo puede ser atribuido a un aumento de la reducción de cromo hexavalente dado que el porcentaje remanente de cromo (VI) en los cultivos adaptados fue significativamente menor que en aquellos no adaptados al tóxico, a través de un incremento en la actividad de la reductasa citoplasmática. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de la reductasa de Cr (VI) celular y de otros mecanismos bacterianos de resistencia al metal analizado. En este sentido, *Escherichia coli* posee un sistema de protección al cromato que incluye la activación de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa para disminuir el stress oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se producen durante la reducción de cromo (VI) a cromo (III) (Ackerley y col., 2006). Además y como se mencionó anteriormente, la exposición al cromato puede llevar a una depleción de las reservas de glutatión y otros tioles que desempeñan un rol importante en la detoxificación por cromo (Ackerley y col., 2006).

La resistencia al cromo en un rango de concentración entre 10 y 200 ppm se mantuvo al menos durante 216 horas posteriores a la adaptación de *Escherichia coli* ATCC 35218 a 25 ppm del tóxico durante 72 horas sugiriendo una aclimatación al tóxico de larga duración. Asimismo, la cinética de crecimiento bacteriano es similar a la obtenida en los cultivos de *Escherichia coli* no adaptados. Ackerley y col. (2006) encontraron resultados similares a los hallados en este trabajo respecto a la velocidad de crecimiento bacteriano de células no adaptadas y adaptadas al cromato. Además, demostraron una menor alteración de la morfología celular en los cultivos adaptados al tóxico y una mayor resistencia al stress oxidativo causado por esta especie química.

Los microbioensayos han cobrado interés para el screening de tóxicos ambientales debido a su sencillez, rapidez, bajo costo, y a que requieren volúmenes pequeños de muestras. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten sugerir el uso de la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 como bioensayo para el monitoreo ambiental de Cr (VI) en medios acuosos. Esta herramienta es accesible desde el punto de vista económico como práctico y muestra una sensibilidad diferencial para el cromo (VI) con respecto a soluciones de plomo y cadmio ensayadas.

La biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema contaminado. Dicho proceso explota la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos para transformar contaminantes en productos finales menos tóxicos, los cuales son integrados en los ciclos biogeoquímicos naturales. Una ventaja importante de la biorremediación es su bajo costo en relación a otros tratamientos de descontaminación ambiental. En términos generales, se estima que la biorremediación es diez veces más económica que las tecnologías fisicoquímicas tradicionales. Además, la biorremediación es una tecnología “limpia” porque los contaminantes pueden ser transformados a compuestos inocuos. Sin embargo, el conocimiento de la fisiología y evolución de los mecanismos adaptativos al tóxico en los microorganismos usados en la biorremediación es crítico para la implementación de esta herramienta biotecnológica.

La reducción de Cr (VI) a Cr (III) es un mecanismo potencialmente útil en el contexto de biorremediación de contaminación por cromo. Este trabajo contribuye al conocimiento de este complejo mecanismo de resistencia biológica a un tóxico ambiental. Los experimentos futuros están dirigidos a la caracterización de la reductasa de cromo (VI) en *Escherichia coli* ATCC 35218, a la estimación de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ), al análisis de los factores que modifican la actividad de la enzima como pH, temperatura, NADH y NAD(P)H como dadores de electrones, entre otros; y al estudio de la actividad enzimática en cultivos adaptados al tóxico.

## **Conclusiones**

El cromo, a diferencia de los otros metales pesados (plomo y cadmio) usados, modifica el crecimiento de la *Escherichia coli*. El cromo (VI), a diferencia del estado de oxidación trivalente, produjo una inhibición concentración-dependiente del crecimiento bacteriano. En nuestras condiciones experimentales la tolerancia al cromo se desarrolla rápidamente y se manifiesta tanto con una concentración del metal dentro del límite aceptado como la encontrada en ciertos efluentes industriales. Estos resultados permiten sugerir el uso de la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* como bioensayo para el monitoreo ambiental de cromo, y contribuyen al conocimiento del mecanismo de resistencia biológica a un tóxico ambiental con el fin de emplear a un microorganismo como herramienta biotecnológica.

# RESUMEN

El cromo (VI) es considerado un contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental (USA) debido a su capacidad de causar mutaciones y cáncer en el hombre. El riesgo asociado a la contaminación de suelos y aguas subterráneas con cromo (VI) derivado de diferentes actividades industriales es elevado y, en consecuencia, la remediación de cromo (VI) posee una importancia crítica. En este sentido, la reducción de cromo (VI) por acción microbiana constituye una estrategia biológica limpia respecto a la preservación del medio ambiente y costo-efectiva, que requiere del conocimiento del microorganismo empleado y del mecanismo involucrado en el proceso de reducción del contaminante. La bacteria conocida como *Escherichia coli* tiene la capacidad de reducir el cromo (VI) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, siendo la actividad reductasa soluble el principal mecanismo de reducción del metal. Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar la toxicidad de cromo sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218, analizar si la presencia de otros metales pesados como el plomo y el cadmio, pueden interferir en la acción del cromo (VI), estudiar el desarrollo de tolerancia en la bacteria expuesta a distintos tiempos y concentraciones del tóxico y analizar la actividad de reductasa como mecanismo responsable de la adaptación al cromo (VI). Para ello, se usó un cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 35218) en fase exponencial, empleando como caldo de cultivo el medio LB. La velocidad de crecimiento se determinó por espectrofotometría a 650 nm durante la fase exponencial a intervalos de 1 hora durante 5 horas. La determinación de cromo (VI) residual se realizó por el método de la difenilcarbazida y la de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica. El cromo hexavalente inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, cuando se encuentra en un rango de concentración (25 -100 ppm) similar al de efluentes industriales, y dicho efecto es potenciado por la presencia de plomo, que *per se* no modifica la viabilidad bacteriana. Por otro lado, las concentraciones bajas de cromo (VI, 0.05 - 5 ppm) no alteran el crecimiento pero producen una estimulación en presencia de plomo o cadmio. La forma trivalente de cromo no modifica el crecimiento bacteriano a concentraciones bajas (25 a 100 ppm) pero causa una estimulación a concentraciones más altas (200 - 400 ppm). El cromo hexavalente, en un rango de concentración comprendido entre 25 y 200 ppm, no inhibió el crecimiento bacteriano cuando se empleó un cultivo de

*Escherichia coli* ATCC 35218 expuesto previamente a cromo (VI: 0.25, 2.5 o 25 ppm) durante 72 h. En estas condiciones, la capacidad de reducción de cromo (VI) fue significativamente mayor respecto de un cultivo de *Escherichia coli* no adaptado al tóxico. Resultados similares se obtuvieron para un tiempo de adaptación de 120 h. La resistencia al cromo en un rango de concentración entre 10 y 200 ppm se mantuvo al menos durante 216 horas posteriores a la adaptación de *Escherichia coli* ATCC 35218 a 25 ppm del tóxico durante 72 horas sugiriendo una aclimatación al tóxico de larga duración.

### Summary

Chromium (VI) has been designated as a priority pollutant by the Environmental Protection Agency (USA) due to its ability to cause mutations and cancer in humans. The risk associated with soil and the groundwater contamination of chromium (VI) derived from various industrial activities is high, and therefore, chromium (VI) remediation is of critical importance. In this regard, microbial reduction of chromium (VI) is a clean biological strategy regarding the preservation of the environment and cost-effective, which requires the knowledge of microorganism used and the mechanism involved in the reduction process of the pollutant. The bacterium *Escherichia coli* has the ability to reduce chromium (VI) in both aerobic and anaerobic conditions, being soluble reductase activity the primary mechanism for reducing metal. The aims of this study were to evaluate the toxicity of chromium on the growth of *Escherichia coli* ATCC 35218, to analyze if other heavy metals such as lead and cadmium, may interfere with the action of chromium (VI), to study tolerance in bacterium exposed to different toxic concentrations and time exposition and to analyze reductase activity as the mechanism responsible for adaptation to chromium (VI). *Escherichia coli* ATCC 35218 was grown in LB medium. For each experiment, a control tube was prepared without toxicant while the rest of the tubes contained different concentrations of the toxicant. Growth rate was determined in the tubes by spectrophotometry at 650 nm during the exponential phase. Residual hexavalent chromium was determined by diphenyl carbazide assay. Hexavalent chromium, at concentrations (25 -100 ppm) similar to those found in industrial effluents, inhibits the growth of *Escherichia coli*. This

inhibitory effect is potentiated by the presence of lead, which does not modify per se the bacterial viability. On the other hand, low concentrations of chromium (VI, 0.05 to 5 ppm) do not alter the growth but cause stimulation in the presence of either lead or cadmium. The trivalent form of chromium does not modify the bacterial growth at low concentrations (25 to 100 ppm) but causes stimulation at higher concentrations (200 - 400 ppm). Hexavalent chromium in a concentration range between 25 and 200 ppm did not inhibit bacterial growth when used a culture of *Escherichia coli* ATCC 35218 previously exposed to chromium (VI: 0,25 , 2,5 or 25 ppm) for 72 h. Under these conditions, the ability to reduce chromium (VI) was significantly higher respect to chromium nonadapted *Escherichia coli* culture. Similar results were obtained for an adaptation time of 120 h. Chromium resistance was maintained at least for 216 hours after adaptation of *Escherichia coli* ATCC 35218 to 25 ppm of the toxin for 72 hours suggesting a long lasting toxic acclimatation.



# **BIBLIOGRAFIA**

- Abadin, H.G., Hibbs, B.F. y Pohl, H.R. (1997). Breast-feeding exposure of infants to cadmium, lead, and mercury: A public health viewpoint. *Toxicol Ind Health*. 15(4):1–24.
- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M. y Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 873-882.
- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S. V., Curtin, J. y Matin, A. (2006). Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 188(9): 3371-3381.
- Adams, M.L., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Nicholson, F.A. y Chambers, B.J. (2004). Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties. *J. Environ. Qual.* 33: 532-541.
- Adhikari, T., Singh, M.V. (2003). Sorption characteristics of lead and cadmium in some soils of India. *Geoderma* 114: 81-92.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). Toxicological Profile for Lead. Division of Toxicology, U.S. Department of Health and Human Services.
- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A. y Siddiqui, M.K. (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Sci. Total Environ.* 346: 48–55.
- Aislabie, J., y Loutit, M.W. (1986). Accumulation of Cr(III) by bacteria isolated from polluted sediment. *Mar. Environ. Res.* 20:221-232.
- Ajmal, M., Nomani, A. y Ahmad, A. (1984). Acute toxicity of chrome electroplating wastes to microorganisms - adsorption of chromate and chromium(VI) on a mixture of clay and sand. *Water Air Soil Poll.* 23:119-127.
- Alessio L, Berlin A, Roi, R. y Boni, M. (1983). Human biological monitoring of industrial chemicals: cadmium. Commission of the European Communities. 25-44.
- Alissa, E.M., Bahjri, S.M., Ahmed, W.H., Al-Ama, N. y Ferns, G.A.A. (2009). Chromium status and glucose tolerance in Saudi men with and without coronary artery disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 131: 215–228.

- Anders, E., Dietz, D.D., Bagnell, C.R., Gaynor, J., Krigman, M.R. y Ross, D.W. (1982). Morphological, pharmacokinetic, and hematological studies of lead-exposed pigeons. *Environ Res.* 28:344–63.
- Anderson, R. A. (1989). Essentiality of chromium in humans. *Sci. Tot. Environ.* 86:75-81.
- Anderson, R. A., Polansky, M. M. Bryden, N. A. Bhatena, S. J. y Canary, J. (1987). Effects of supplemental chromium on patients with symptoms of reactive hypoglycemia. *Metabolism* 36:351-355.
- Andrade, M.L., Bao, M. y Guitián, F. (1985). Adición de lodos residuales a un suelo ácido: influencia sobre el contenido total, disponibilidad y absorción por el cultivo de Zn, Pb, Cr y Cd. *An. Edafol. Agrobiol.* 44: 1141-1156.
- Anon (1974). Medical and Biological effects of pollutants: chromium. National Academy Press, Washington.
- Antosiewicz, D.M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ Pollut. Mar.* 134(1):23-34.
- Arnold, R., DiChristina, T. y Hoffman, M. R. (1988). Reductive dissolution of Fe (III) oxides by *Pseudomonas* sp 200. *Biotechnol. Bioeng.* 32:1081-1096.
- Avila, A. y Rodrigo, A. (2004). Trace metal fluxes in bulk deposition, throughfall and stemflow at two evergreen oak stands in NE Spain subject to different exposure to industrial environment. *Atm. Environ.* 38: 171-180.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L. y Kizek, R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Env. Chem. Lett.* 6(4):189-213.
- Badar, U., Ahmed, N., Beswick, A. J., Pattanapitpaisal, P. y Macaskie, L. E. (2000). Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnol. Lett* 22:829-836.
- Bae, W., Kang, T., Jung, J., Park C., Choi, S. y Jeong, B. (2000). Reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 in batch and continuous cultures. *J Microbiol Biotechnol* 38(1):36-39.
- Bae, W. C., Lee, H. K., Choe, Y. C., Jahng, D. J., Lee, S. H., Kim, S. J. y Jeong, B. C. (2005). Purification and characterization of NADPH-dependent

Cr (VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiol*, 43(1), 21-27.

- Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M. y Preuss, H.G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180, 5–22.
- Baird, C. y Cann, M. (2005). *Environmental Chemistry*. W. H. Freeman. Toronto, Canada).
- Baldi, F., Vaughan, A. M. y Olson, G. J. (1990). Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage-treatment plant receiving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:913-918.
- Barceló, J. y Poschenrieder, Ch. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta* 2: 345-361.
- Bartlett, R. (1991). Chromium cycling in soils and water: Links, Gaps, and Methods. *Environ Health Persp.* 92:17-24.
- Bartlett, R., y Kimble, J. M. (1976). Behavior of chromium in soils: I Trivalent Forms. *J. Environ. Qual.* 5:379-386.
- Baruthio, F. (1992). Toxic effects of Chromium and its compounds. *Biological Trace Element Research.* 32: 145-153.
- Baveye, P., McBride, M., Bouldin, D., Hinesly, T., Dahdoh, M. y Abdel-sabour, M.F. (1999). Mass balance and distribution of sludge-borne trace elements in a silt loam soil following long-term applications of sewage sludge. *The Science of the Total Environment* 227: 13-28.
- Beas, C. F. J. y Messmer, R. E. (1986). *The hydrolysis of cations*. John Wiley and Sons, New York.
- Benavides, M. Gallego, S. y Tomaro, M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17(1): 21-34.
- Bencheikh-Latmani, R., Obratzsova, A., Mackey, M., Ellisman, M. y Tebo, B. M. (2007). Toxicity of uncomplexed trivalent chromium to *Shewanella* sp. strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environ. Sci. Technol.* 41(1): 214-220.
- Berthet, B., Mouneyrac, C., Amiard J.C., Amiard-Triquet, C. Berthelot, Y. y Le Hen, A. (2003). Accumulation and soluble binding of cadmium, copper, and zinc in the polychaete *Hediste diversicolor* from coastal sites with different trace metal bioavailabilities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:468–78.

- Bertini, I. y Cavallaro, G. (2008). Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 3–14.
- Beyersmann, D. y Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms, *Arch. Toxicol.*: 82(8): 493-512.
- Bianchi, V., Zantedeschi, A., Montaldi, A. y Majone, F. (1984). Trivalent chromium is neither cyto-toxic nor mutagenic in permeabilized hamster fibroblasts. *Toxicol Lett.* 23:51-59.
- Bianchi, V. y Levis, A. G. (1984). Mechanisms of chromium genotoxicity. *Toxicological and Environmental Chemistry* 9:1-25.
- Bishop, P.L. (2002). *Pollution Prevention: fundamentals and practice*, Tsinghua University Press, Beijing, 768.
- Bluskov S, Arocena, J.M., Omotoso O.O. e Young J.P. (2005). Uptake, distribution, and speciation of chromium in *Brassica Juncea*. *Int J Phytorem*; 7:153–5.
- Bondarenko, B. M., y Ctarodoobova, A. T. (1981). Morphological and cultural changes in bacteria under the effect of chromium salts. *J Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. USSR.* 4:99-100.
- Bopp, L. H., Chakrabarty, A. M. y Ehrlich, H. (1983). Chromate resistance Plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol.* 155:1105-1109.
- Bopp, L. H. y Ehrlich, H. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch. Microbiol.* 150: 426 - 431.
- Bourg, A.C.M. y Loch, J.P.G. (1995). Mobilization of heavy metals as affected by pH and redox conditions. In *Biogeodynamics of pollutants in soils and sediments*. Edited by W. Salomons, W.M.S. pp. 87-101. Springer.
- Bowen, H. J. M. (1979). *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press, New York.
- Brama, M., Gnessi, L., Basciani, S., Cerulli, N., Politi, L., Spera, G., Mariani, S., Cherubini, S., Scotto d’Abusco, A., Scandurra, R. y Migliaccio, S. (2007). Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol*; 264:102–8.

- Bruins, M.R., Kapil, S. y Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207
- Bur, T., Probst, A., Bianco, A., Gandois, L. y Crouau, Y. (2010). Determining cadmium critical concentration in natural soils by assessing *Collembola* mortality, reproduction and growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 415-422.
- Canet, R., Pomares, F., Tarazona, F., y Estela, M. (1998). Sequential fractionation and plant availability of heavy metals as affected by sewage sludge application to soil. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 29: 697-716.
- Canfield, R.L., Henderson, C.R., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A. y Lanphear, B.P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 17;348(16):1517-26.
- Capdevila, F., Nadal, M., Schuhmacher, M. y Domingo, J.L. (2003). Intake of lead and cadmium from edible vegetables cultivated in Tarragona Province, Spain. *Trace Elem Electr* ;20:256–61
- Cappuyns, V., Swennen, R. y Niclaes, M. (2007). Application of the BCR sequential extraction scheme to dredged pond sediments contaminated by Pb-Zn mining: A combined geochemical and mineralogical approach. *Journal of geochemical exploration* 93: 78-90.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Blood Lead Levels in Children Aged 1–5 Years — United States, 1999–2010. *MMWR.* / 62(13);245-248.
- Cervantes, C. y Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Nies D.H., Silver S. (eds), *Molecular Microbiology of heavy Metals*, Springer-Verlag, Berlin 407-420.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C. y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants, *FEMS Microbiol. Rev.*: 25, 335-347.
- Cervantes, C., y Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27:65-71.

- Chan, D. y Hale, B. (2004). Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *J. Exp. Botany*. 55, 2571–2579.
- Chaney, R.L., Reeves, P.G., Ryan, J.A., Simmons, R.W., Welch, R.M. y Angle, J.S. (2004). An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks. *BioMetals* 17:549–53
- Chary, N.S., Kamala, C.T. y Raj, D.S.S. (2008). Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. *Ecotoxicol. Environ. Safe* 69:513–24.
- Christensen, T.H. (1987a). Cadmium soil sorption at low concentrations (V): Evidence of competition by other heavy metals. *Water Air and Soil Pollution* 34: 293-303.
- Christensen, T.H. (1987b). Cadmium soil sorption at low concentrations (VI): A model for Zinc competition. *Water Air and Soil Pollution* 34: 305-314.
- Clark, D. P. (1994). Chromate reductase-activity of *Enterobacter aerogenes* is induced by nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:233-237.
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol.* 163(3):319-32.
- Clemens, S., Antosiewicz, D., Ward, J., Schachtman, D. y Schroeder, J. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Plant Biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12043–12048.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Blunt-Harris, E. L., Gaw, C. V., Roden, E. E. y Lovley, D. (1998). Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. microbiol.* 64:1504-1509.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin synthase and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123:825-832.
- Codd, R., Dillon, C.T., Levina, T. y Lay, P.A. (2001). Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell, *Coord. Chem. Rev.* 216: 537-582.
- Coeurdassier, M, de Vaufleury, A., Crini, N., Scheifler, R. y Badot, P.M. (2005). Assessment of whole effluent toxicity on aquatic snails:

bioaccumulation of Cr, Zn, and Fe, and individual effects in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:198–204.

- Cohen, M.D., Prophete, C., Sisco, M., Chen, L. y Zelikoff, J.T. (2006). Pulmonary immunotoxic potentials of metals are governed by select physicochemical properties: chromium agents. *J Immunotoxicol.* 3:69–81.
- Coleman, R. N., y Paran, J. H. (1983). Accumulation of hexavalent chromium by selected bacteria. *Environ. Technol. Lett.* 4:149-156.
- Commission of the European Communities. (1979). Trace metals: Exposure and health effects, Oxford, Pergamon Press.
- Cooke, A.J. y Johnson, M.S. (1996). Environmental Contaminants in Wildlife. Cadmium in small mammals. (Beyer WN y Heinz GH). Lewis Publisher. New York. 377-388.
- Costa, M., 1997. Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. *Crit. Rev. Toxicol.* 27: 431–442.
- Cotton, F. A., y Wilkinson, G. (1980). Advanced Inorganic Chemistry. A comprehensive text. (John Wiley & Sons). New York. 376-379.
- Cupo, D. Y. y Wetterhahn, K. E. (1984). Repair of chromate-induced DNA damage in chick-embryo hepatocytes. *Carcinogenesis* 5:1705-1708.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Angronsveld, V.J. y Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 23:927–940
- Dally, H. y Hartwig, A. (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18 (5):1021-1026.
- Darrin, M. (1956). Chromium. Chromium compounds: Their industrial use. (Udy, M. J.). Reinhold, New York. 251-262.
- Daulton, T. L., Little, B. J., Lowe, K. y Jones-Meehan, J. (2001). In situ environmental cell-transmission electron microscopy study of microbial reduction of chromium(VI) using electron energy loss spectroscopy. *Microsc. Microanal.* 7:470-485.



- Davies, N.A., Hodson, M.E. y Black, S. (2003). The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environ. Pollut.* 212: 55-61.
- De Flora, S. (2000). Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 533–541.
- De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. y Znacchi, P. (1990). Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res.* 238: 99–172.
- De Flora, S., Camoirano, A., Bagnasco, M. y Znacchi, P. (1995). *Bioinorganic Medicine. Chromium and carcinogenesis. Handbook on Metal Ligand Interactions in Biological Fluids.* (Berthon, G.). Marcel Dekker. New York. 1020–1036.
- De Flora, S. y Wetterhahn, K.E. (1989). Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 17: 169–244.
- DeFlora, S., Bianchi, V. y Levis, A. G. (1984). Distinctive mechanisms for interaction of hexavalent and trivalent chromium with DNA *Toxicol. Environ. Chem.* 8:287-294.
- Dilek, F.B., Gokcay, C.F. y Yetis, U. (1998). Combined effects of Ni(II) and Cr(VI) on activated sludge. *Wat. Res.* 32 (2): 303-312.
- Dominguez-Solis, J.R., Lopez-Martin, M.C., Ager, F.J., Ynsa, M.D., Romero, L.C. y Gotor, C. (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 2, 469–476
- Eary, L. E. y Rai, D. (1987). Kinetics of Cr(III) oxidation to Cr(VI) by reaction with manganese dioxide. *Environ. Sci. Tech.* 21:1187-1193.
- Eary, L. E. y Rai, D. (1988). Chromate removal from aqueous wastes by reduction with ferrous ion. *Environ. Sci. Tech.* 22:972-977.
- Eaton, D. y Robertson, W. (1994). *Toxicology. Clinical Occupational and Environmental Medicine.* (Rosenstick, L. y Cullen, M.R.). WB Saunders Company. Philadelphia. 116-117.
- Efstathiou, J. D. y McKay, L. L. (1977). Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130:257-265.

- Eissa, B.L., Salibián, A. y Ferrari, L. (2006). Behavioral alterations in juvenile *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal waterborne cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol.* 77(6):931-7.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539.
- Evan, G.I. y Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342–348.
- Flora, S.J.S., Mittal, M. y Mehta, A., (2008). Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501–523.
- Flora, S.J.S. y Pachauri, V. (2010). Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2745–2788.
- Flores-Tena, F.J. y Martinez-Tabche, L. (2001). The effect of chromium on the hemoglobin concentration of *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Ecotoxicol Environ Safe*; 50:196–202.
- Francis, C. A., Obratsova, A. Y. y Tebo, B. M. (2000). Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:543-548.
- Francoise, C. R., y Bourg, A.C.M. (1991). Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water Res.* 25:807-816.
- Fujie, K., Toda, K. y Ohtake, H. (1990). Bacterial reduction of toxic hexavalent chromium using a fed-batch culture of *Enterobacter cloacae* strain HO1. *J. Ferment. Bioengr.* 69:465.
- Gadd, G. M. y Griffiths, A. J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4:303-317.
- Gaines, R. W. (1988). West San Joaquin Valley Agricultural setting-A Report.
- Gallego, S.M., Kogan, M.J., Azpilicueta, C.E., Peña, C. y Tomaro, M.L. (2005). Glutathione-mediated antioxidative mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cells in response to cadmium stress. *Plant Grow. Regul.* 46: 267-276.

- Ganguli, A. y Tripathi, A. K. (2001). Inducible periplasmic chromate reducing activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a leather tannery effluent. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11:355-361.
- Gao, S., Walker, W.J., Dahlgren, R.A. y Bold, J. (1997). Simultaneous sorption of Cd, Cu, Ni, Zn, Pb and Cr on soils treated with sewage sludge supernatant. *Water Air and Soil Pollution* 93: 331-345.
- Garbisu, C., Alkorta, I., Llama, M. J. y Serra, J. L. (1998). Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 9:133-141.
- Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G. y Cano-Aguilera, I. (2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ Contam Toxicol*; 48:225–32.
- Gikas, P. y Romanos, P. (2006). Effects of trivalent (Cr(III)) and hexavalent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 133: 212–217.
- Gil Hernandez, F. (2005). *Toxicología Industrial (III)*. Toxicidad de los metales pesados. Ed. Masson. Barcelona. 803-820
- Gimbert, F., Vijver, M.G., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Peijnenburg, W.J. y Badot, P.M. (2008). How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environ Toxicol Chem* 27:1284–1292.
- González, M.J., Ramos, L. y Hernández, L.M. (1994). Distribution of trace metals in sediments and relationship with their accumulation in earthworms. *Inten. J. Environ. Anal. Chem.* 57: 135-150.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:190–198.
- Gurer, H. y Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 29, 927–945.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819–1828.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press. Hamer, D.H., 1986. Metallothioneins. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913–951.

- Hamer, D. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913–51.
- Han, F.X., Sridhar, B.B.M., Monts, D.L. y Su, Y. (2004). Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytol*; 162:489–99.
- Hartford, W. H. (1979). Chromium compounds. *Encyclopedia of chemical technology.* 82-120. John Wiley & Sons, New York.
- Haskell, P. T. y McEwen, P. (1998). *Ecotoxicology: pesticides and beneficial organisms.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Henson, M.C. y Chedrese, P.J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med*; 229:383–92.
- Hermle, S., Günthardt-Goerg, M. y Schulin, R. (2006). Effects of metal-contaminated soil on the performance of young trees growing in model ecosystems under field conditions. *Environ. Pollut.* 144: 703-714.
- Hernando-Costa, J. y López-Lafuente, A. (2007). Degradación de suelo por contaminación y su repercusión en la salud humana. In *Contaminación y salud.* Edited by Villarejo, S.J.G.y.A.L.D. 47-68. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G.J. y Nies, D.H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*: 190(15), 5431-5438.
- Helbig, K., Grosse, C. y Nies, D.H. (2008). Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*: 190(15), 5439-5454.
- Hoffman, D.J., Heinz, G.H., Sileo, L., Audet, D.J., Campbell, J.K., LeCaptain, L.J. y Obrecht, H.H. (2000). *J. Toxicol. Environ. Health A* 59, 235–252.
- Horitsu, H., Futo, S., Ozawa, K. y Kawai, K. (1983). Comparison of characteristics of hexavalent chromium-tolerant bacterium, *Pseudomonas ambigua* G-1, and its hexavalent chromium sensitive mutant. *Agri. Biol. Chem.* 47:2907-2908.
- Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S. y Kawai, K. (1987). Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agricul. Biol. Chem.* 51:2417-2420.

- Hsu, P.C. y Guo, Y.L. (2002). Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180, 33–44.
- Huang, J.W., Shaff, J.E., Grunes, D.L. y Kochian, L.V. (1992). Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol*; 98:230–7
- Huang, J.W. y Cunningham, S.D. (1996). Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologists*, vol. 134, 75-84.
- Huffman, E. W. D. y Allaway, W. H. (1973). Chromium in plants-distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agricul. Food Chem.* 21:982-986.
- Hummel, M., Standl, E. y Schnell, O. (2007). Chromium in metabolic and cardiovascular disease. *Horm. Metab. Res.* 39, 743–751.
- Hunaiti, A.A. y Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Sci. Total Environ.* 248, 45–50.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy
- Izzotti, A., Bagnasco, M., Camoirano, A., Orlando, M. y De Flora, S. (1998). DNA fragmentation, DNA-protein crosslinks, postlabeled nucleotidic modifications, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillations of chromium(VI). *Chemoprevention by oral N-acetylcysteine. Mutat. Res.* 400, 233–244.
- James, B.R. y Barlett, R.J. (1983a). Behavior of chromium in soils VII. Adsorption and reduction of hexavalent forms. *J Environ Qual*; 12:177–81.
- James, B. R. y Bartlett, R. J. (1983b). Behavior of chromium in soils:V. Fate of organically complexed Cr(III) added to soil *J Environ. Qual.* 12:169-172.
- Jamil, K. y Hussain, S. (1993). Biochemical variations in ovaries of water hyacinth weevils *Neochetina eichhorniae*. *Ind J Exp Bot*; 31:36–40.
- Järup, L. (2003). Hazard of heavy metal contamination, *British Medical Bulletin* 68, 167-182.

- Järup, L. y Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem, *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 201-208.
- Jeejeebhoy, K. N., Chu, R. C., Marliss, E. B., Greenberg, G. R. y Brucerobertson, A. (1977). Chromium deficiency, glucose-intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 30:531-538.
- Jensen, A. y Bro-Rasmussen, F. (1992). Environmental Cadmium in Europe. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 125: 101-181.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M. y Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 345, 91–104.
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma.* 122: 143-149.
- Kabata-Pendias, A. y Pendias, H. (1992). Trace elements in soil and plants. Boca Raton, Fla., CRC Press.
- Kalantari, N. y Ghaffari, S. (2008). Evaluation of toxicity of heavy metals for *Escherichia coli* growth, Iran *J. Environ. Health. Sci. Eng.:* 5 (3), 173-178.
- Kan, C.A. y Meijer, G.A.L. (2007). The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.,* 133: 84-108.
- Kaufmann, F. y Lovley, D. R. (2001). Isolation and characterization of a soluble NADPH-dependent Fe(III) reductase from *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 183:4468-4476.
- Keegan, G.M., Learmonth, I.D. y Case, C.P. (2008). Asystematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 645–674.
- Kerger, B.D., Finley, B.L., Corbett, G.E., Dodge, D.G. y Paustenbach, D.J. (1997). Ingestion of chromium (VI) in drinking water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. *J. Toxicol. Environ. Health* 50, 67–95.

- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z. y Zhu, Y.G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ Pollut.* 152:686–92.
- Kirkham, M. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments: *Geoderma.* 137. 20.
- Kobayashi, E., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kido, T., Nishijo, M. y Nakagawa, H. (2002). Association between total cadmium intake calculated from the cadmium concentration in household rice and mortality among inhabitants of the cadmium-polluted Jinzu River basin of Japan. *Toxicol Lett.* 129:85–91.
- Komori, K., Rivas, A., Toda, K. y Ohtake, H. (1989). Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 35:951-954.
- Komori, K., Wang, P. C., Toda, K. y Ohtake, H. (1989). Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain HO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:567-570.
- Kotas, J. y Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pol lut.* 107:263–83.
- Kozuh, N., Stupar, J. y Gorenc, B. (2000). Reduction and Oxidation processes of chromium in soils. *Environ. Sci. Tech.* 34:112-119.
- Krysik, M., Grajeta, H. y Prescha, A. (2008). Chromium content in selected convenience and fast foods in Poland. *Food Chem.*107:208–12.
- Ku, Y., Alvarez, G.H. y Mahaffey, K.R. (1978). Comparative, effects of feeding lead acetate and phospholipid-bound lead on blood and tissues lead concentration sin youngand adult rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 20:561–7
- Kumar, A. y Scott-Clark, C. (2009). Lead loadings in household dust in Delhi, India. *Chemicals and Health, Toxics Link, New Delhi, India. Indoor Air.* 19(5):414-20.
- Lacatusu, R., Dumitru, M., Risnoveanu, I., Ciobanu, C. y Lungu, M. (1999). Soil pollution by acid rains and heavy metals in Zlatna Region, Romania. In 10th International Soil Conservation Organization.
- Langard, S. (1980). *Metals in the environment.* Academic Press, New York. 111-132.

- Langand, S. (1983). The carcinogenicity of chromium compounds in man and animals. In D. Burrows (ed.), *Metabolism and toxicity*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 13-30.
- Laskowski, R. y Hopkin, S.P. (1996). Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34: 59-69.
- Levinaa, A., Mulyania, I., Lay, P.A. y Vincent, J.B. (Ed.), Chapter 11-Redox Chemistry and Biological Activities of Chromium(III) Complexes, *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)* Elsevier (2007), pp. 225-256
- Levis, A. G., Bianchi, V., Tamino, G. y Pegoraro, B. (1978). Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian-cells invitro. *Brit. J. Cancer.* 37:386-396.
- Li, F., y Tan, T. C. (1994). Effect of heavy metal ions on the efficacy of a mixed Bacilli Bod Sensor. *Bio Sens. Bioelectron.* 9:315-324.
- Licsko, I., Lois, L. y Szebényi, G. (1999). Tailings as a source of environmental pollution, *Water Sci. Technol.* 39, 333-336.
- Lindeque, J.Z., Levanets, O., Louw, R. y van der Westhuizen, F.H. (2010). The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Curr. Protein Peptide Sci.* 11, 292–309.
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M. y Chai, L. (2007). Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. *Chemosphere* 69:99-107.
- Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M. D. y Congregado, F. (1993). Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3516-3518.
- Lloyd, J. R., Sole, V. A., Van Praagh, C. V. G. y Lovley, D. R. (2000). Direct and Fe(II) mediated reduction of Technetium by Fe(III)-Reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3743-3749.
- Lopez, M.L, Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Benitez, T. y Gardea-Torresdey, J.L. (2007). Gibberellic acid, kinetin, and the mixture indole–3-acetic acid–kinetin assisted with EDTA-induced lead hyperaccumulation in alfalfa plants. *Environ Sci Technol.* 41:8165–70.
- Lopez, M.L., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G. y Gardea-Torresdey, J.L. (2009). Effect of indole-3-acetic acid, kinetin, and ethylenediaminetetraacetic



acid on plant growth and uptake and translocation of lead, micronutrients, and macronutrients in alfalfa plants. *Int J Phytorem.* 11:131–49.

- López, C., Piñeiro, A., Pongelli, V., Villaamil - Lepori, E. y Roses, O. (2005). Valores referenciales de plumbemia en el área de Buenos Aires. Población adulta sana no expuesta laboralmente. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 39 (4): 453-8.
- Losi, M. E. y Frankenberger, W. T. (1994). Chromium-Resistant Microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant. *Water Air Soil Poll.* 74:405-413.
- Losi, M.E., Amrhein, C. y Frankenberger, W.T.S. (1994). Environmental biochemistry of chromium, *Rev. Environ. Contam. Toxicol:* 136, 91-121.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P. y Woodward, J. C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* 382:445-448.
- Lovley, D. R., Fraga, J. L., Blunt-Harris, E. L., Hayes, L. A., Phillips, E. J. P. y Coates, J. D. (1998). Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydroch. Hydrob.* 26:152-157.
- Lovley, D. R. y Phillips, E. J. P. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:726-728.
- Lu, A., Zhang, S. y Shan, X. (2005). Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma.* 125: 225-234.
- Ma, L.Q. y Rao, G.N. (1996). Heavy metals in the environment. *J. Environ. Qual.* 26: 259-264.
- Madany, I.M., Wahab, A.A.A. y Al-Alawi, Z. (1996). Trace metals concentrations in marine organisms from the coastal areas of Bahrain, Arabian Gulf. *Water Air and Soil Pollution.* 91: 233-248.
- Manahan, S.E. (2002). *Toxicological chemistry and biochemistry. Toxic elements.* Lewis Publishers. Boca Raton, Florida
- Manahan, S.E. (2007). *Introducción a la química ambiental.* Reverté. Barcelona. España.

- Marchese, M., Gagneten, A.M., Parma, M.J. y Pave, P.J. (2008). Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Arch Environ Contam Toxicol.* 55:603–9.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E. y Marmioli, N. (2005). Evidencia de la participación de la estructura lignocelulósica planta en el secuestro de Pb: una basada en la espectroscopía de rayos X análisis, *Environ. Poll.* 134: 217-227.
- Marqués, M.J., Salvador, A., Morales-Rubio, A.E. y De la Guardia, M. (1998). Analytical methodologies or chromium speciation in solid matrices: a survey of literature. *Fres J Anal Chem.* 362:239–48.
- Marsh, T. L. y McInerney, M. J. (2001). Relationship of hydrogen bioavailability to chromate reduction in aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1517-1521.
- Marsh, T. L., Leon, N. M. y McInerney, M. J. (2000). Physiochemical factors affecting chromate reduction by aquifer materials. *Geomicrobiol. J.* 17:291-303.
- Martell, A. E. y Smith, R. M. (1977). *Critical stability Constants. Other organic ligands*, Plenum Press, New York. 495.
- Martello, L., Fuchsman, P., Sorensen, M., Magar, V. y Wenning, R.J. (2007). Chromium geochemistry and bioaccumulation in sediments from the lower Hackensack River, New Jersey. *Arch Environ Contam Toxicol.* 53:337–50.
- Massanyi, P., Lukac, N., Uhrin, V., Toman, R., Pivka, J. y Rafay, J. (2007). Female reproductive toxicology of cadmium. *Acta Biol Hung.* 58:287–99.
- Matés, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153, 83–104.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. y Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595–603.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., Asenjo, M. y Márquez, J. (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34, 439–458.

- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. y Márquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 82, 273–299.
- Morning, J.L., Matthews, N.A., y Peterson, E.C. (1980). Chromium: In *Mineral Facts and Problems*, 1980 ed., U.S. Bureau of Mines. Bulletin 671: 167–182.
- McClean, J. y Beveridge, T. J. (2001). Chromate Reduction by a Pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1076-1084.
- Meeting. Edited by D.E. Stott, R.H.M.a.G.C.S. Purdue University. 817-820. Falta año
- Melamed, R., Cao, X., Chen, M. y Ma, L.Q. (2003). Field assessment of lead immobilization in a contaminated soil after phosphate application. *The Science of the Total Environment.* 305: 117-127.
- Mench, M.J. (1998). Cadmium availability to plants in relation to major long-term changes in agronomy systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 67: 175-187.
- Mertz, W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49:163-167.
- Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr.* 123:626-633.
- Micó, C., Peris, M., Recatalá, L. y Sánchez, J. (2007). Baseline values for heavy metals in agricultural soils in an European Mediterranean Region. *Science of the Total Environment.* 378: 13-17.
- Millis, P., Ramsey, M.H. y John, E.A. (2004). Heterogeneity of cadmium concentration in soil as a source of uncertainty in plant uptake and its implications for human health risk assessment. *Sci Total Environ.* 326:49–53.
- Myers, C. R., Carstens, B. P., Antholine, W. E. y Myers, J. M. (2000). Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Appl. Microbiol.* 88:98-106.
- Montes-Holguin, M.O, Peralta-Videa, J.R., Meitzner, G., Martinez-Martinez, A., De la Rosa, G. y Castillo-Michel, H. (2006). Biochemical and

- spectroscopic studies of the response of *Convolvulus arvensis* L. to chromium (III) and chromium (VI) stress. *Environ Toxicol Chem.* 25:220–6.
- Mouni, L., Merabet, D., Robert, D. y Bouzaza, A. (2009). Batch studies for the investigation of the sorption of the heavy metals  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  onto Amizour soil (Algeria). *Geoderma.* 154: 30-35.
  - Mustafa, G., Kookana, R.S. y Singh, B. (2006). Desorption of cadmium from goethite: effects of pH, temperature and aging. *Chemosphere.* 64: 856-865.
  - Nieboer, E. y Jusys, A. A. (1988). Biologic chemistry of chromium. F. O. Nriagu and E. Nieboer (eds.), *Chromium in the natural and human environments.* John Wiley, New York. 21.
  - Nies, D. H., y Silver, S. (1989). Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:896-900.
  - Nies, D. H. (1999). Microbial heavy metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730 – 750.
  - Nies, D.H., Koch, S. Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M.H.J. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force – driven transporters probably containing chromate/sulfate transporters. *J. bacterial.* 180:5799-5802
  - Nishioka, H. (1975). Mutagenic activities of metal-compounds in bacteria. *Mut. Res.* 31:185-189.
  - Nriagu, O. J. (1996). A History of Global Metal Pollution, *Science* 272 (5259), 222-225.
  - Nursita, A., Singh, B. y Lees, E. (2009). Cadmium bioaccumulation in *Proisotoma minuta* in relation to bioavailability in soils. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(6):1767-73.
  - O'Brien, T., Mandel, H.G., Pritchard, D.E. y Patierno, S.R. (2002). Critical role of chromium (Cr)-DNA interactions in the formation of Cr-induced polymerase arresting lesions. *Biochemistry.* 41, 12529–12537.
  - Occupational Safety and Health Administration (OSHA). (2006). Department of Labor (Occupational Exposure To Hexavalent Chromium). Final rule. *Fed. Regist.* 71, 10099–10385.
  - Oh, Y. S., y Choi, S. C. (1997). Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. *J. Microbiol.* 35:25-29.

- Ohta, H. y Cherian, M.G. (1991). Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107, 63–72.
- Ohtake, H., Komori, K., Cervantes, C. y Toda, K. (1990). Chromate-resistance in a chromate-reducing strain of *Enterobacter-cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:85-88.
- Olendrynski, K., Anderberg, S., Bartnicki, J., Pacyna, J. y Stigliani, W. (1995). Atmospheric emissions and depositions of cadmium, lead and zinc in Europe during the period 1955-1987. IIASA, Austria. 31.
- Oliver, M.A. (1997). Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science.* 48: 573-592.
- Olsson, I.M., Eriksson, J., Öborn, I., Skerfving, S. y Oskarsson, A. (2005). Cadmium in Food Production Systems: A Health Risk for Sensitive Population Groups. *Ambio.* 34, 4-5: 344-351.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., Nitter, S., Pregger, T., Pfeiffer, H. y Friedrich, R. (2007). Current and future emissions of selected metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment.* 41: 8557-8566.
- Pandey, N. y Sharma, C.P. (2003). Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environ Exp Bot.* 49:195–200.
- Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S. y Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1788-1795.
- Patrick, L. (2006a). Lead toxicity, a review of the literature. Part 1. Exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* 11, 2–22.
- Patrick, L. (2006b). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* 11, 114–127.
- Pearson, C.A. y Prozialeck, W.C. (2001). E-cadherin, beta-catenin and cadmium carcinogenesis. *Med. Hypotheses.* 56, 573–581.
- Peitzsch, N., Eberz, G. y Nies, D. H. (1998). *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:453-458.

- Peng, L., Lifang, R., Hongyu, X., Xi, L. y Chaocan, Z. (2007). Study on the toxic effect of lead (II) ion on *Escherichia coli*, *Biol. Trace Elem. Res.*: 115 (2), 195-202.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M. y Saupe, G.J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41, 1665–1677.
- Petrilli, F. L. y De Flora, S. (1978). Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.* 54:139-147.
- Petrilli, F. L., y Flora, S. D. (1977). Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:805-809.
- Philip, L., Iyengar, L. y Venkobachar, C. (1998). Cr(VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *J. Environ. Eng.-ASCE* 124:1165-1170.
- Pokorny, B. y Ribaric-Lasnik, C. (2000). Lead, Cadmium, and Zinc in Tissues of Roe Deer (*Capreolus capreolus*) near the Lead Smelter in the Koroska Region (Northern Slovenia). *Bull Environ Contam Toxicol.* 64: 20-26.
- Pratt, P. F. (1966). Chromium. H. D. Chapman (ed.), *Diagnostic criteria for plants and soils*. Quality Printing Co. Inc., Abilene, TX. 136-141.
- Price, D.J. y Joshi, J.G. (1983). Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* 258, 10873–10880.
- Proctora, D. M., Otanib, J.M., Finleyb, B.L., Paustenbachc, D. J., Blandd, J.A., Speizerd, N. y Sargent, E.V. (2002). Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65, 701–746.
- Quershi, A. A., Coleman, R. N. y Paran, J. H. (1984). Evaluation and refinement of the microtox test for use in toxicity screening, D. Liu and B. J. Dutka (eds.), *Toxicity Screening procedures using bacterial systems*. Marcel Dekker, New York. 1-22.
- Quievryn, G., Messer, J. y Zhitkovich, A. (2002). Carcinogenic chromium(VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells. *Biochemistry.* 41, 3156–3167.

- Quintanilla – Vega, B., Smith, D.R., Kahng, M.W., Hernandez, J.M., Albores, A. y Fowler, B. A. (1995). Leadbinding proteins in brain and tissue of environmentally lead-exposed humans. *Chemico-Biol Interact.* 98:193–9.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2, 219–236.
- Rai, L.C. y Raizada, M. (1989). Effect of bimetallic combinations of Cr, Ni and Pb on growth, uptake of nitrate and ammonia,  $^{14}\text{CO}_2$  fixation and nitrogenase activity of *Nostoc muscorum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 17: 75–85.
- Rai, D., Sass, B. M. y Moore, D. A. (1987). Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. *Inorg. Chem.* 26:345-349.
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*: 21(3), 321-332.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. y Garate, A. (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Latuca* sp. Cd – Mn interaction. *Plants Sci.* 162: 761 – 767.
- Ramos, L., Hernández, M. y González, M.J. (1994). Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from or near Doñana National Park. *J. Environ. Qual.* 23: 50-57.
- Redig, P.T., Lawler, E.M., Schwartz, S., Dunnette, J.L., Stephenson, B. y Dukett, G.E. (1991). Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red-tailed hawks. *Arch Environ Contam Toxicol.* 21:72–7.
- Rege, M. A. (1997). Bacterial reduction of hexavalent chromium by *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown on sucrose. *Biotechnol. Lett.* 19:691-694.
- Reynolds, M., Stoddard, L., Bepalov, I. y Zhitkovich, A. (2007). Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 35, 465–476.
- Rosko, J. J., y Rachlin, J. W. (1977). Effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell- division, growth, and chlorophyll-a content of

chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104:226-233.

- Ross, D. S., Sjögren, R. E. y Bartlett, R. J. (1981). Behavior of chromium in soils .4. Toxicity to microorganisms. *J. Environ. Qual.* 10:145-148.
- Salnikow, K. y Zhitkovich, A. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 28–44.
- Salomons, W. y Förstner, U. (1995). *Heavy metals. Problems and solutions.* Berlin: Springer. 412.
- Salomons, W. y Stigliani, W.M. (1995). *Biogeodynamics of Pollutants in Soils and Sediments: Risk Assessment of Delayed and Non-Linear Responses.* Springer – Verlag: Berlin.
- Salunkhe, P. B., Dhakephalkar, P. K. y Paknikar, K. M. (1998). Bioremediation of Hexavalent chromium in soil microcosms *Biotechnol. Lett.* 20:749-751.
- Saxena, D., Levin, R. y Firer, M. A. (2000). Removal of chromate from industrial effluent by a new isolate of *Staphylococcus cohnii*. *Water Sci. Technol.* 42:93-98.
- Scheifler, R., Coeurdassier, M. y Morilhat, C. (2006). Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworm inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Sci Total Environ.* 371:197–205
- Scheifler, R. y Gomot de Vaufleury, A. (2002). Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (1): 148-53.
- Schroll, H. (1978). Determination of the absorption of Cr<sup>+6</sup> and Cr<sup>+3</sup> in an algal culture of *Chlorella pyrenoidosa* using CR-51. *B. Environ. Contam. Tox.* 20:721-724.
- Schulin, R., Geiger, G. y Furrer, G. (1995). Heavy metal retention by soil organic matter under changing environmental conditions. *Environmental Science.* 53 – 85.
- Scott, D. T., Mcknight, D. M., Blunt-Harris, E. L., Kolesar, S. E. y Lovely, D. R. (1998). Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of



humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 32:2984-2989.

- Seregin, I.V., Shpigun, L.K. e Ivaniov, V.B. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ. J. Plant Physiol.* 51:525-533.
- Shah, K. y Nongkynrih, J.M. (2007). Metal hyperaccumulator and bioremediation. *Biologia Plantarum.* 51:618-634.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. y Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ Int.* 31:739–53.
- Sharma, N.C., Sahi, S.V., Jain, J.C. y Raghothama, K.G. (2004a). Enhanced accumulation of phosphate by *Lolium multiflorum* cultivars grown in phosphate-enriched medium. *Environ Sci Technol.* 38(8):2443-8.
- Sharma, P. y Dubey, R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:35-52.
- Sharma, N.C., Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J. y Sahi, S.V. (2004b). Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environ Toxicol Chem.* 23 (9): 2068-73
- Shen, H. y Yi-Tin, W. (1994). Biological reduction of chromium by *E.coli*. *J. Environ Eng-ASCE* 120:560-572.
- Shen, H. y Wang, Y. T. (1993). Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 *Appl. Environ. Microbiol.* 3771-3777.
- Shen, H. y Wang, Y. T. (1994). Modeling hexavalent chromium reduction in *Escherichia coli* 33456. *Biotechnol. Bioeng.* 43:293-300.
- Shi, X., Dalal, N.S. y Kasprzak, K.S. (1993a). Generation of free radicals from model lipid hydroperoxides and  $H_2O_2$  by Co (II) in the presence of cysteinyl and histidyl chelators. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 277–283.
- Shi, X.L., Dalal, N.S. y Kasprzak, K.S. (1993b). Generation of free-radicals from hydrogen-peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr (III). *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 294–299.
- Shparyk, Y.S. y Parpan, V.I. (2004). Heavy metal pollution and forest health in the Ukrainian Carpathians. *Environ. Pollut.* 130: 55-63.

- Silver, C. y Rothman, D. (1995). *Toxics and Health: The Potential Long-Term Effects of Industrial Activity*. [Washington, D.C.: World Resources Institute]. 7.
- Singh, J., Carlisle, D.L., Pritchard, D.E. y Patierno, S.R. (1998). Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol. Rep.* 5, 1307–1318.
- Sinicropi, M.S., Amantea, D., Caruso, A. y Saturnino, C. (2010). Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Arch. Toxicol.* 84, 501–520.
- Smith, D.R., Kahng, M.W., Quintanilla-Vega, B. y Fowler, B.A. (1998). High-affinity renal leadbinding proteins in environmentally-exposed humans. *Chemico-Biol Interact.* 115:39–52.
- Smith, R. M. y Martell, A. E. (1976). *Critical Stability Constants. Inorganic complexes*. Plenum Press, New York. 257
- Smolders, E., Brans, K., Foldi, A. y Merckx, R. (1999). Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Science Society of America Journal* 63: 78-85.
- Soghoian, S. y Sinert, R. (2008). Toxicity, Heavy Metals. eMedicine [On-line information]. <http://emedicine.medscape.com/article/814960-overview> . Acceso: 24/07/12.
- Speisky, H., Gómez, M., Burgos-Bravo, F., López-Alarcón, C., Jullian, C., Olea-Azar, C. y Aliaga, M.E. (2009). Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1803–1810.
- Stearns, D.M. (2007). *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). Multiple hypotheses for chromium (III) biochemistry: why the essentiality of chromium (III) is still questioned.* (Vicent, J.B.). Elsevier. Amsterdam. 57-70.
- Steinnes, E., Sjobakk, T., Donisa, E. y Brännvall, C. (2005). Quantification of pollutant lead in forest soils. *J. Environ. Qual.* 69: 1399-1404.
- Stohs, S. y Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336.

- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C, Bryngelsson, T., Lundborg, T. y Schat, H. (2003). Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ. Exp. Bot.* 49:21-28.
- Subset, R. (2003). Selection of an adsorbent for Lead removal from drinking water by a point-of-use treatment device, *Water Research.* 37, 4904-4912.
- Sugawara, E., Nakamura, K., Miyake, T., Fukumura, A. y Seki, Y. (1991). Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br. J. Ind. Med.* 48, 239–242.
- Summers, A. O. y Jacoby, G. A. (1978). Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Ch.* 13:637-640.
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y. y Okazaki, M. (1992). NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas-ambigua* G-1 - a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174:5340-5345.
- Tariq, S.R., Shah, M.H., Shaheen, N., Khalique, A., Manzoor, S. y Jaffar, M. (2006). Multivariate analysis of trace metals levels in tannery effluents in relation to soil and water: A case study from Peshawar, Pakistan. *Journal of Environmental Management.* 79: 20-29.
- Tebo, B. M. y Obraztsova, A. Y. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162:193-198.
- Theodotou, A., Stretton, R. J., Norbury, A. H. y Massey, A. G. (1976). Morphological effects of chromium and cobalt complexes on bacteria. *Bioinorg. Chem.* 5:235-239.
- Toxicological Profile for Lead, Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 43–59. Falta año
- Tsapakos, M. J., y Wetterhahn, K. E. (1983). The interaction of chromium with nucleic-acids. *Chem-Biol. Interact.* 46:265-277.
- Tsapakos, M. J., Hampton, T. H. y Wetterhahn, K. E. (1983). Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat-kidney, liver, and lung. *Cancer Research.* 43:5662-5667.

- Tsuda, H., y Kato, K. (1977). Chromosomal-aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. *Mut. Res.* 46:87-94.
- Ueno, D., Iwashita, T., Zhao, F.J. y Ma, J.F. (2008). Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd-hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Physiol.* 49: 540–548
- Vaiopoulou, E. y Gikas, P. (2012). Effects of chromium on activated sludge and on the performance of wastewater treatment plants: A review. *Water Res.* 46(3): 549 - 570.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208.
- Varga, A., Zaray, G., Fodor, F. y Cseh, E. (1997). Study of interaction of iron and lead during their uptake process in wheat roots by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim* 52B:1027–32.
- Vaziri, N.D., Ding, Y. y Ni, Z. (2001). Compensatory upregulation of nitric-oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 679–685.
- Vaziri, N.D., Wang, X.Q., Oveisi, F. y Rad, B. (2000). Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 36, 142–146.
- Veltman, K. y Huijbregts, M.A. (2008). Cadmium bioaccumulation factors for terrestrial species: application of the mechanistic bioaccumulation model OMEGA to explain field data. *Sci. Total Environ.* 406 (3): 413-8
- Venitt, S. y Levy, L. S. (1974). Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature.* 250:493-494.

- Vig, K., Mgharaj, M., Sethunathan, N. y Naidu, R. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*. 8: 121- 135.
- Vincent, J.B. (2010). Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans*. 39, 3787–3794.
- Vyskocil, A., Truchon, G., Leroux, T., Lemay, F., Lim, S., Gagnon, F., Gendron, M., Lim, S. El Majidi, N., Botez, S. Emond, C. y Viau, C. (2009). Substances chimiques et effets sur l'audition. l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). <https://www.irsst.qc.ca/en/-irsst-publication-chemical-substances-and-effect-on-hearing-literature-review-r-604.html>. Acceso: 4 julio de 2013
- Waalkes, M.P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem*. 79, 241–244.
- Waalkes, M.P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533: 107–120.
- Waalkes, M.P., Liu, J., Ward, J.M. y Diwan, L.A. (2004). Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology*. 198, 31–38.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. y Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192, 95–117.
- Walkees, M.P. y Poirier, L.A. (1984). In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium. *Toxicol Appl Pharmacol*. 75: 539-546.
- Wang, C., Brown, S. y Bhattacharyya, M.H. (1994). Effect of cadmium on bone calcium and <sup>45</sup>Ca in mouse dams on a calcium-deficient diet: evidence of Itai-Itai-like syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 127:320-30.
- Wang, P. C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K. y Ohtake, H. (1989). Isolation and characterization of an *Enterobacter-cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol*. 55:1665-1669.
- Wang, P.-C., Mori, T., Toda, K. y Ohtake, H. (1989). Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol*. 172:1670-1672.

- Wang, X., Shan, X., Zhang, S. y Wen, B. (2004). A model for evaluation of the phytoavailability of trace elements to vegetables under field conditions. *Chemosphere* 55: 811-822.
- Wang, Y. T. y Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *J. Ind. Microbiol.* 14:159-163.
- Wang, Y. T., y Xiao, C. S. (1995). Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. *Water. Res.* 29:2467-2474.
- Watjen, W. y Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals.* 17, 65–78.
- Wells, P. G., McCallum, G. P., Che, C. S., Henderson, J.T., Lee, C.J.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J. y Wong, A.W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer, *Toxicol. Sci.:* 108(1), 4-18.
- Wielinga, B., Mizuba, M. M., Hansel, C. M. y Fendorf, S. (2001). Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron- reducing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 35:522-527.
- Wood, J. M. (1984). Microbiological strategies in resistance to metal ion toxicity. H. Sigel (ed.), *Metal ions in biological systems.* Marcel Dekker Incorporated, New York. 333-351
- Yamoto, K., Kato, J., Yano, T. y Ohtake, H. (1993). Kinetics and modeling of hexavalent chromium reduction in *-Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:129-133.
- Yanai, R.D., Ray, D.G. y Siccama, T.G. (2004). Lead reduction and redistribution in the forest floor in New Hampshire Norther Hardwoods. *J. Environ. Qual.* 33: 141-148.
- Yao, H., Guo, L. Jiang, B.H., Luo, J. y Shi, X. (2008). Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.:* 27 (2), 77-88.
- Yassi, A., y Nieboer, E. (1988). Carcinogenicity of chromium compounds, p. 443-496. In J. O. Nriagu and E. Nieboer (eds.), *Chromium in natural and human environments.* John Wiley and Sons, New York.

- Yetis, U., Demirer, G.N. y Gokcay, C.F. (1999). Effect of chromium (VI) on the biomass yield of activated sludge. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 48-54.
- Yongming, H., Peixuan, D., Junji, C. y Posmentier, E.S. (2006). Multivariate analysis of heavy metal contamination in urban dusts of Xi'an, Central China. *Science of the Total Environment*. 355: 176-186.
- Zayed, A.M. y Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil*. 249:139–56.
- Zhang, W. y Jia, H. (2007). Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. *Toxicology*. 239:204–12.
- Zhang, W., Pang, F., Huang, Y., Yan, P. y Lin, W. (2008). Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicol Lett*. 182:18–23.
- Zhitkovich, A. (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chem. Res. Toxicol*. 18, 3–11.
- Zibilske, L. M., y Wagner, G. H. (1982). Bacterial-growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage-sludge containing cadmium, chromium, and copper. *Soil Science*. 134:364-370.
- Zwonitzer, J., Pierzynski, G., Hettiarachchi, G.M. (2003). Effects of phosphorous additions on lead, cadmium and zinc bioavailabilities in a metal-contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution*. 143: 193-209.

## **AGRADECIMIENTOS**

Desde estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante todos estos años han estado a mi lado, familia, amigos y compañeros de trabajo, que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a buen fin.

Quisiera expresar mi agradecimiento:

A la Dra. María del Carmen García su apoyo constante y la gran confianza que ha depositado en mí como Directora de esta Tesis y a lo largo de todas las tareas que bajo su dirección he realizado en el Laboratorio de Química del Departamento de Materias Básica de la Facultad Regional Concepción del Uruguay de Universidad Tecnológica Nacional.

A la Dra. Emilce Mendez, por su colaboración como Co-directora, en la revisión y ajuste de la presente tesis.

Al Dr. Leandro Marco por enseñarme a comprender la Salud Ambiental y a todo el equipo del Programa Salud para Todos de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Entre Ríos, en particular a Arq. Patricia Costa por al apoyo en los trabajos prácticos de la maestría.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por permitirme retornar a sus aulas y contribuir a mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Entre Ríos por la beca de cuarto nivel otorgada para la realización de la maestría.