

# TOLERANCIA Y SOLUBILIZACIÓN DE COBRE POR RIZOBACTERIAS AISLADAS DE SITIOS CONTAMINADOS CON ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

## Tolerance and Solubilization of Copper by Rhizobacteria Isolated from Sites Polluted by Potentially Toxic Elements

Ma. del Carmen A. González-Chávez<sup>1‡</sup>, Rosalba Argumedo-Delira<sup>1</sup>, Rogelio Carrillo-González<sup>1</sup>, Patricia González-Ramírez<sup>1</sup>, Guillermo Carrillo-Castañeda<sup>1</sup>, Reyna Rojas<sup>1</sup> y Jaime Cruz-Díaz<sup>1</sup>

### RESUMEN

Este estudio se realizó para contribuir al conocimiento de alternativas biológicas, económicas y amigables con el ambiente, para la remediación de sitios contaminados con elementos potencialmente tóxicos (EPT). Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la tolerancia al cobre (Cu) de 133 rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos contaminados con EPT, además de la habilidad de las cepas más tolerantes para solubilizar Cu metálico, y para biosorber y bioacumular Cu en soluciones diluidas y con Cu metálico. Los resultados mostraron que sólo 6% de las cepas fueron tolerantes a Cu (3 mM). En las cepas más tolerantes se observó que el incremento de Cu en solución favoreció su crecimiento. Los mayores incrementos en biomasa se observaron en las cepas 29 (655%), 101 (457%) y 135 (313%) con respecto a su crecimiento en 0 mM de Cu. La cepa 95 fue la que presentó biomasa superior en todos los niveles de Cu probados, mientras que la cepa 21 tuvo mayor capacidad que las otras para biosorber Cu. La cepa 29 bioacumuló significativamente más cantidad de Cu. Se observó que las cepas seleccionadas como más tolerantes no se diferenciaron en su capacidad para solubilizar Cu (entre 9 y 14 mg). Se observó mayor biosorción (44 veces) y bioacumulación (13 veces) en las pruebas de Cu metálico que en las de soluciones diluidas.

**Palabras clave:** bioacumulación, biosorción, biorremediación, metales pesados.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (carmeng@colpos.mx)

### SUMMARY

This research was developed to contribute to knowledge of environment friendly and low cost biological alternatives for remediation of soils polluted with potentially toxic elements (PTE). The objectives of this study were to determine Cu tolerance in 133 rhizobacteria isolated from plants growing in PTE polluted soils, to evaluate the ability of the most tolerant strains to solubilize metallic Cu and to bioabsorb and bioaccumulate Cu in diluted solutions and metallic Cu. Only 6% of strains were Cu tolerant (3 mM). In the most tolerant strains, Cu content in the medium significantly augmented bacterial biomass. The highest biomass increment (in relation to growth at 0 mM Cu) was found in strains 29 (655%), 101 (457%) and 135 (313%). Strain 95 produced the highest biomass at all tested levels of Cu. Strain 21 had the highest Cu biosorption capacity. Strain 29 significantly bioaccumulated more Cu. The most Cu tolerant strains showed similar metallic Cu solubilization capacity (from 9 to 14 mg). Higher biosorption (44 times) and bioaccumulation (13 times) were observed in the Cu metallic tests than in the diluted solutions.

**Index words:** bioaccumulation, biosorption, bioremediation, heavy metals.

### INTRODUCCIÓN

Con los avances biotecnológicos, la remediación de sitios contaminados utilizando plantas y microorganismos para reducir la toxicidad de elementos potencialmente tóxicos (EPT) es una alternativa que se está desarrollando rápidamente para la recuperación de suelos contaminados (Thacker y Madamwar, 2005; Kuffner *et al.*, 2008). La bioaumentación (adición de microorganismos nativos o alóctonos al suelo) se puede utilizar como una opción para reducir

la biodisponibilidad de algunos EPT en suelos agrícolas y contaminados (Jezequel *et al.* 2005). Sin embargo, se debe tener especial cuidado en la introducción de organismos alóctonos en el suelo, ya que este proceso se relaciona con la invasión y perturbación de los sistemas, así como con las alteraciones en la función de los ecosistemas nativos (Angle *et al.*, 2001; Carrillo-González y González-Chávez, 2006). Una alternativa para este problema es el aislamiento y la caracterización de microorganismos de cada sitio para usarlos en las áreas afectadas de la misma región. En teoría, estos microorganismos estarán mejor adaptados al suelo y las condiciones climáticas locales, y se podrán utilizar para producir inóculo específico para estas áreas contaminadas (Khan, 2005).

Algunos autores sugieren que el uso de bacterias de la rizosfera facilita la proliferación de las plantas, especialmente en condiciones altamente perturbadas (Kuffner *et al.*, 2008). En consecuencia, se induce la estabilización de los contaminantes en el suelo, se favorece la revegetación y recuperación de las áreas contaminadas (Glick, 2003; González-Chávez, 2005; Khan, 2005). La fitorremediación se puede hacer más rápida y eficiente con ayuda de rizobacterias (Glick, 2003). Sin embargo, es necesario entender los mecanismos involucrados en la movilización y transferencia de EPT para desarrollar estrategias que optimicen este proceso. El conocimiento de las propiedades bacterianas es vital en el momento de realizar estos procesos, pues de esta manera se favorecerá la supervivencia y, por lo tanto, se tendrá éxito (Khan, 2005).

Los objetivos del presente trabajo fueron, determinar la tolerancia al cobre (Cu) de 133 rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos contaminados con EPT, además de la habilidad de las cepas más tolerantes para solubilizar Cu metálico, y para biosorber y bioacumular Cu en soluciones diluidas y con Cu metálico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en tres etapas: 1) determinación de la tolerancia a Cu en 133 bacterias aisladas de la rizosfera de plantas creciendo en suelos contaminados con EPT; 2) cuantificación de la biosorción y bioacumulación de Cu en las bacterias más tolerantes

(seleccionadas de la primera etapa), y 3) análisis de la capacidad de estas cepas para biosorber y bioacumular Cu metálico.

### Fase 1. Tolerancia a Cobre en Rizobacterias

Se probó la tolerancia a Cu de 133 cepas bacterianas que se aislaron del rizoplasma y endorrizosfera de plantas que crecen en suelos contaminados por altas concentraciones de EPT (González-Ramírez, 2005). Los sitios de aislamiento se localizan en cuatro áreas contaminadas del estado de Zacatecas y una en Temascaltepec, México (Sánchez-Guzmán, 2005; González-Chávez *et al.*, 2005). Todas contienen altas concentraciones de Cu, Zn, Pb, Cd entre otros (Carrillo-González, 2005).

Se preparó un medio de cultivo (agar nutritivo, grado reactivo) con las siguientes concentraciones de Cu: 0, 0.7, 1, 2 y 3 mM (CuCl<sub>2</sub>). Las dosis de Cu establecidas se basaron en estudios previos realizados por Gordon *et al.* (1993), Hanssen *et al.* (1998) y Martin *et al.* (2004). Hanssen *et al.* (1998) reportaron que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (S15) y *Providencia rettgeri* (S7) más tolerantes a Cu crecieron a 1.8 y 1.6 mM. Martin *et al.* (2004) utilizaron entre 0 y 1.2 mM para la selección de cepas tolerantes a Cu de *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria*. Mientras que Gordon *et al.* (1993) reportaron que concentraciones iguales o mayores de 20 µM de Cu se consideran altas y, por lo tanto, los microorganismos que crecen en éstas se pueden denominar tolerantes a Cu.

El pH del medio se ajustó a 5.5 (pH promedio de las rizosferas donde se aislaron las bacterias) con ácido clorhídrico diluido y, posteriormente, se esterilizó en autoclave por 18 min a 1.1 kg cm<sup>-2</sup> de presión. Una vez que el medio se enfrió, se verificó el pH y se procedió al vaciado de éste en cajas de Petri. La inoculación se realizó por triplicado y se utilizaron 10 µL de una suspensión bacteriana con concentración de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de cada una de las 133 cepas bacterianas bajo estudio. Las cajas de Petri se incubaron por 48 h a 28 °C (incubadora Riossa Model 556).

Después del período de incubación, el crecimiento se cuantificó midiendo el área de las colonias bacterianas en cada uno de las concentraciones de Cu probadas. Esto se realizó con ayuda de un analizador de imágenes Digital Image Tool 1.1.

## Fase 2. Biosorción y Bioacumulación de Cobre en Cepas Bacterianas Altamente Tolerantes en Soluciones Diluidas

Esta fase se realizó con la finalidad de conocer más sobre el comportamiento de bacterias rizosféricas altamente tolerantes a Cu seleccionadas de la primera fase (que crecieron en concentración de 3 mM de Cu). La metodología utilizada se basó en las investigaciones realizadas por Chen *et al.* (2005), Kaduková y Viríková (2005) y Tangaromsuk *et al.* (2002).

Con la finalidad de analizar algunos mecanismos que pueden diferenciar a las bacterias bajo estudio, se utilizó caldo nutritivo con las siguientes concentraciones de Cu ( $\text{CuCl}_2$ ): 0, 0.02, 0.1, 1.6, 2.5 y 3 mM. Estas concentraciones se confirmaron con cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (Perkin Elmer 3110). Se adicionaron 10 mL de estos medios a tubos de incubación de 50 mL. Los tubos se esterilizaron en una autoclave a  $1.1 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión por 15 min. Una vez fríos los tubos, se procedió a confirmar la concentración disponible de Cu en todas las dosis bajo prueba y el pH. Posteriormente, los medios se inocularon por separado con 300  $\mu\text{L}$  de cada una de las cepas bacterianas tolerantes. Esto se realizó mediante suspensiones bacterianas a una concentración de  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Se dejaron durante 48 h a  $28^\circ\text{C}$  en una incubadora con agitación (Shel Lab Model 514). Después de la incubación se separó el paquete bacteriano del sobrenadante por centrifugación a 6500 g durante 8 min (Centrifuga Hermle Z 223). Éste se lavó dos veces con 10 mL de agua destilada utilizando las mismas condiciones de centrifugación y tiempo.

La habilidad de las bacterias para biosorber Cu se determinó con base en la cantidad de Cu adsorbido a las células. Al paquete bacteriano se le adicionaron 10 mL de HCl 0.1 M, se dejó en esa solución por 10 min. Después se centrifugó a 6500 g durante 8 min y se decantó el sobrenadante. En este último se determinó la concentración de Cu por EAA (Perkin Elmer 3110). El paquete bacteriano se secó en una estufa (VWR Scientific Model 1350FSM) a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 h hasta peso constante, se pesó y la biomasa se expresó como peso seco.

La habilidad de las bacterias para bioacumular Cu se determinó con base en el contenido de este elemento en las células. El paquete bacteriano seco y pesado se colocó en un tubo de digestión, al cual se le adicionaron 2 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. La digestión se realizó a

$120^\circ\text{C}$  durante 7 h. Finalmente, las muestras se aforaron a 10 mL y se analizaron por EAA para cuantificar la concentración de Cu.

## Fase 3. Capacidad de Bacterias Altamente Tolerantes para Solubilizar Cobre Metálico, Biosorberlo y Bioacumularlo

En esta etapa se estudió la capacidad para solubilizar Cu metálico de las cepas bacterianas consideradas tolerantes a Cu, mismas que se seleccionaron en la primera etapa. Se colocaron 10 mL de caldo nutritivo ( $\text{pH} = 5.5$ ) en tubos de incubación de 50 mL. Los tubos se esterilizaron en una autoclave a  $1.1 \text{ kg cm}^{-2}$  de presión por 15 min. En las mismas condiciones de tiempo, presión y temperatura se esterilizaron, en cajas de Petri, fragmentos de alambre de Cu de 3 cm de largo (aproximadamente 1.4 g cada uno). Una vez fríos los tubos, el alambre de Cu se colocó en condiciones estériles. Los tubos se inocularon por separado con 300  $\mu\text{L}$  de cada suspensión con  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$  de las cepas bacterianas seleccionadas como tolerantes a Cu. Se dejaron incubar por 48 h a  $28^\circ\text{C}$ . Después de la incubación se extrajo el alambre, se secó y determinó su peso. El paquete bacteriano también se separó del sobrenadante por centrifugación a 6500 g durante 8 min. Se lavó dos veces con 10 mL de agua destilada, utilizando las mismas condiciones de centrifugación y tiempo que en la etapa 2. De igual manera se determinó la biomasa bacteriana y la capacidad de biosorción y bioacumulación de Cu en ésta, siguiendo la metodología que se presentó en la etapa anterior.

Todos los experimentos se realizaron una sola vez con tres repeticiones en cada tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase 1. Tolerancia a Cobre en Rizobacterias

De las 133 cepas estudiadas sólo 8.3% fue altamente sensible al Cu, ya que su crecimiento se inhibió totalmente aun a la concentración más baja de este elemento (0.7 mM). De las cepas inoculadas, 2.2% se desarrollaron a 0.7 mM, mientras que 15.7% a 1 mM, 9.8% a 2.5 mM y 6% a la concentración más alta de Cu (3 mM). La mayoría de las cepas crecieron a 2 mM (58%). Estos resultados permiten observar que no todas las cepas bacterianas que habitan en la zona radical de las plantas que crecen en suelos contaminados

son tolerantes, al menos a este metal. Así, una población que crece en suelos contaminados donde no todas las bacterias son tolerantes y pueden sobrevivir la condición de contaminación, muestra las relaciones cooperativas entre los microorganismos (Gordon *et al.*, 1993). Adicionalmente, sólo un bajo porcentaje de las cepas es altamente tolerante (3 mM). Spain y Alm (2003) reportaron que la concentración inhibitoria para *Escherichia coli* en un medio con Cu fue de 1 mM. También, Martin *et al.* (2004) reportaron que cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* se consideraron tolerantes al crecer a 1 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Los resultados del presente trabajo permiten corroborar que las rizobacterias de suelos contaminados presentan mayor tolerancia al Cu, al menos hasta la más alta concentración probada (3 mM). Kuffner *et al.* (2008) también reportaron alta tolerancia de algunas bacterias a Cd, Zn y Pb aisladas de zonas contaminadas.

De las cepas que fueron tolerantes a 1 mM de Cu, algunas crecieron significativamente más que otras (Figura 1). La cepa 86 produjo una colonia con área mayor de 1.5  $\text{cm}^2$ ; en contraste, la cepa 54 no alcanzó los 0.5  $\text{cm}^2$ .

De las cepas que toleraron 2 mM de Cu, la 63 produjo el menor tamaño de colonia, mientras que la 58 y 74 fueron las que mayor crecimiento tuvieron

(Figura 2). La mayoría de las cepas que toleraron niveles entre 2.5 mM de Cu en el medio de cultivo presentaron crecimiento muy homogéneo, excepto las cepas 10 y 17, las cuales tuvieron áreas de crecimiento mayores de 1.5  $\text{cm}^2$ , pero menores de 2  $\text{cm}^2$ . En el caso de aquellas que fueron altamente tolerantes a Cu y crecieron a 3 mM, su crecimiento no superó 1  $\text{cm}^2$  de área de colonia (Figura 3). Futuras investigaciones deben considerar el efecto de estas cepas tolerantes sobre el crecimiento de las plantas hospederas y su protección contra la toxicidad por Cu.

## Fase 2. Biosorción y Bioacumulación de Cobre en Cepas Bacterianas Altamente Tolerantes

La Figura 4 muestra la biomasa de cepas con diferentes concentraciones de Cu. Se observó que, con respecto a 0 mM, las diferentes concentraciones incrementaron significativamente la biomasa de todas las cepas, excepto en la cepa 21 (*Pseudomonas* sp.) a 0.02 mM. Las mayores biomásas las produjo la cepa 29 (sin identificación molecular, con 655%), la 101 (*Salmonella* sp.) con 457% y la 135 (*Bacillus cereus*) con 313% de incremento con respecto a 0 mM de Cu. Se observó que la biomasa aumentó significativamente hasta 0.1 mM de cobre en casi todas las cepas

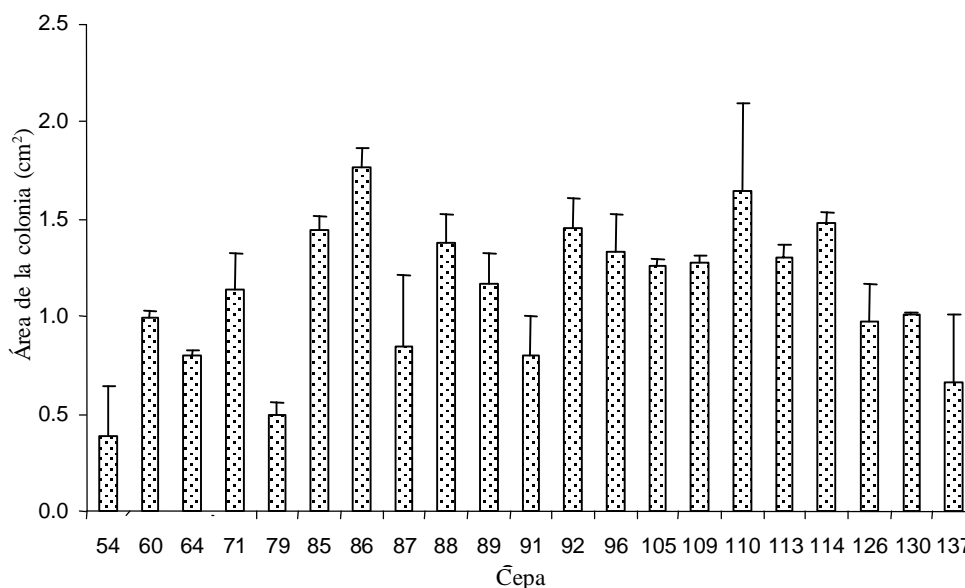
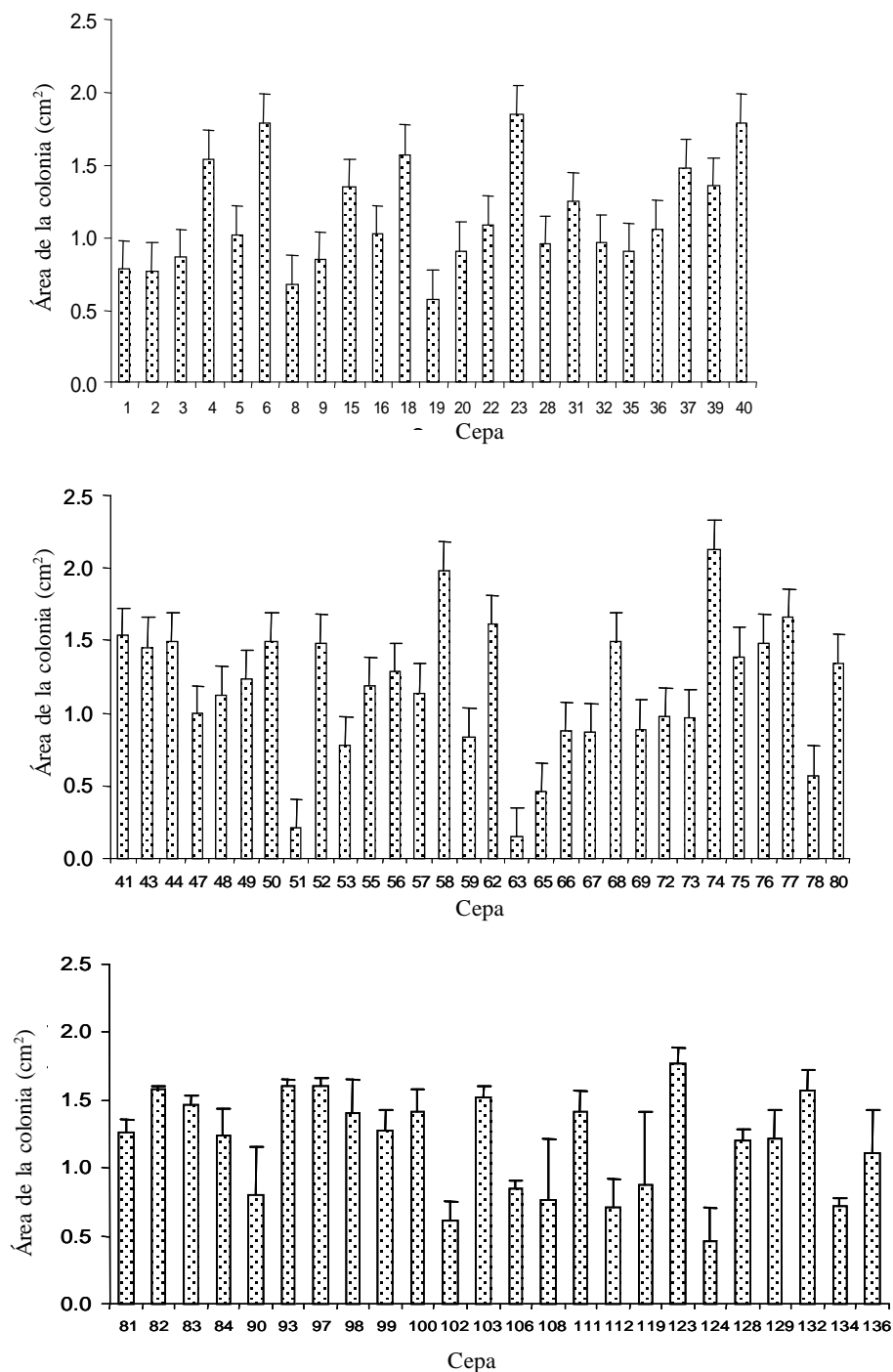


Figura 1. Crecimiento de bacterias rizosféricas tolerantes a 1 mM de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) en agar nutritivo. Las barras muestran la desviación estándar (n = 3).



**Figura 2.** Capacidad de crecimiento de las cepas bacterianas rizosféricas tolerantes a 2 mM de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) en agar nutritivo. Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

bacterianas, pero en el caso específico de la cepa 95 (*Pseudomonas plecoglossicida*) esto se observó hasta 1.6 mM. Las cepas 21 (*Pseudomonas* sp.) y 29 (sin identificación molecular) mantuvieron su biomasa significativamente igual desde 1.6 a 3 mM, pero la 101 y 135 mostraron un ligero decremento en ésta. La cepa

95 presentó una alta producción celular en todos los niveles de cobre probados.

Al analizar los mecanismos que tienen estas bacterias para tolerar Cu, se observó que la cepa 21 presentó mayor capacidad que las otras para biosorber Cu, pero la cepa 29 bioacumuló significativamente

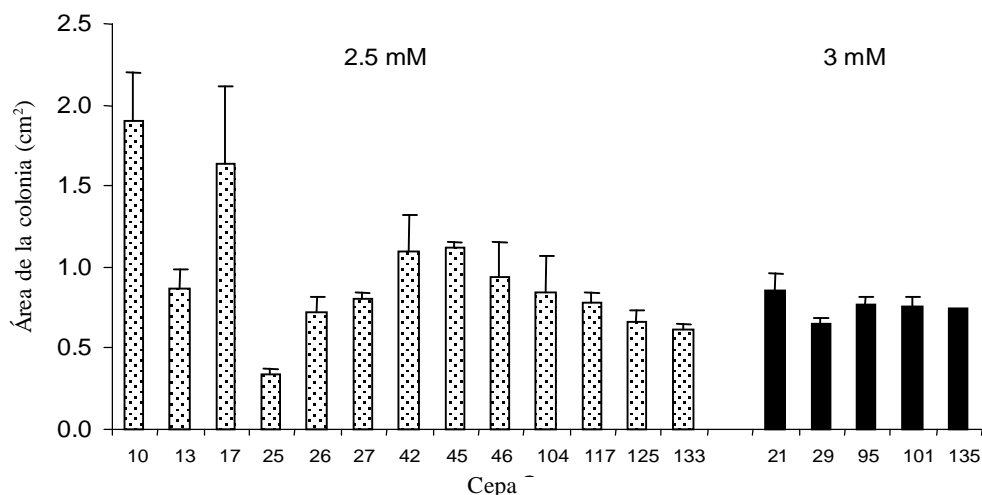


Figura 3. Crecimiento de cepas bacterianas rizosféricas tolerantes a 2.5 y 3 mM de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) en agar nutritivo. Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

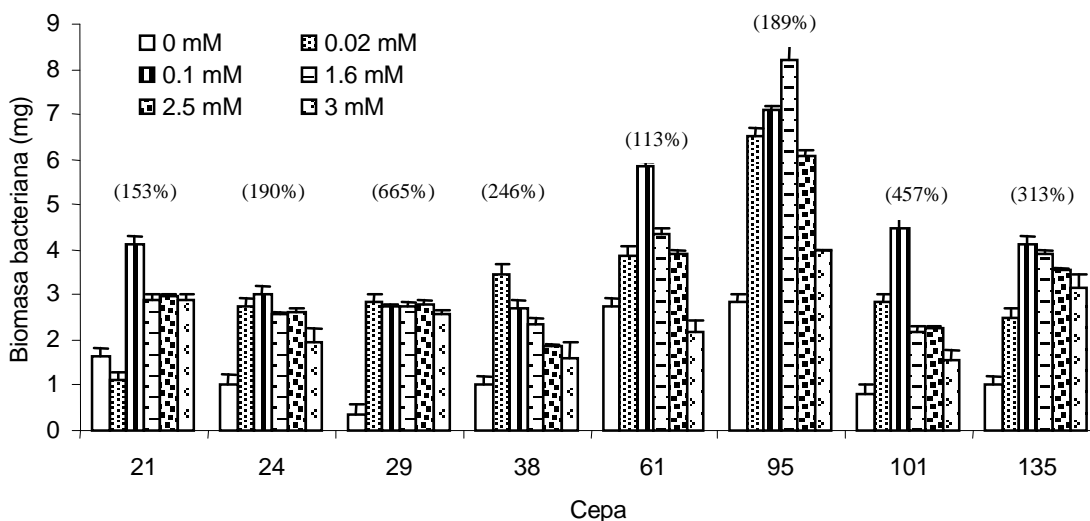


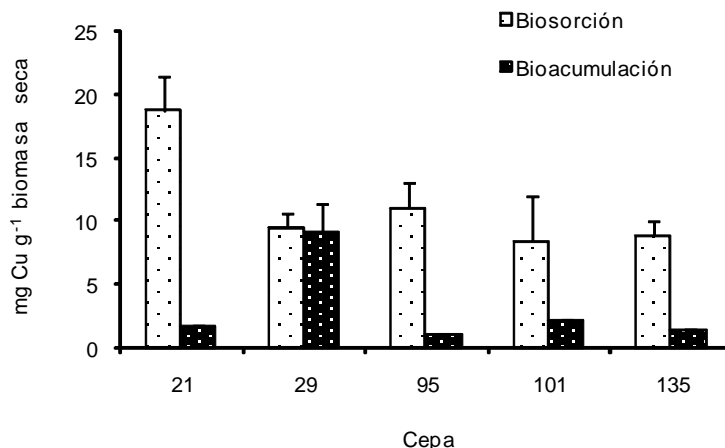
Figura 4. Efecto de la concentración de cobre en la producción de biomasa de cultivos de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de plantas creciendo en suelos contaminados con residuos de minas. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje en incremento de biomasa del cultivo de la cepa respectiva en la concentración de cobre donde obtuvo el máximo crecimiento con respecto al tratamiento sin cobre (0 mM). Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

mayores cantidades que los otros aislados (Figura 5). La cepa 101 presentó la menor capacidad en biosorción. Se observó que, mientras la cepa 21 no absorbió altas concentraciones de Cu en sus células, la cepa 29 lo bioacumuló. Esto muestra la variabilidad natural de las especies para adaptarse a estas condiciones.

Los resultados obtenidos muestran que las bacterias tolerantes, presentan alta capacidad de biosorción a Cu. Resultados similares fueron reportados por Chen *et al.* (2005), quienes observaron que el aislado CZ1 de *Pseudomonas putida* fue tolerante a metales como el Cu (1 mM) y el zinc (Zn) (1 mM), y tuvo alta capacidad

de biosorción de éstos (40-50%). Chovanova *et al.* (2004) observaron resultados similares en bacterias aisladas de lodos residuales con alta capacidad para tolerar y remover Cadmio (Cd) de soluciones acuosas.

Vullo *et al.* (2005) mostraron que cepas bacterianas de *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens* presentaron alta capacidad para extraer EPTs como Cd (65%) y Zn (35%) de soluciones acuosas. Por lo anterior y con base en los resultados del presente trabajo, las rizobacterias pueden usarse no sólo en el suelo contaminado sino también en el tratamiento de aguas contaminadas y en la posible extracción de Cu de minerales. Todo ello



**Figura 5.** Biosorción y bioacumulación de cobre por bacterias de las cepas indicadas cultivadas en caldo nutritivo adicionado con 3 mM de  $\text{CuCl}_2$ . Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

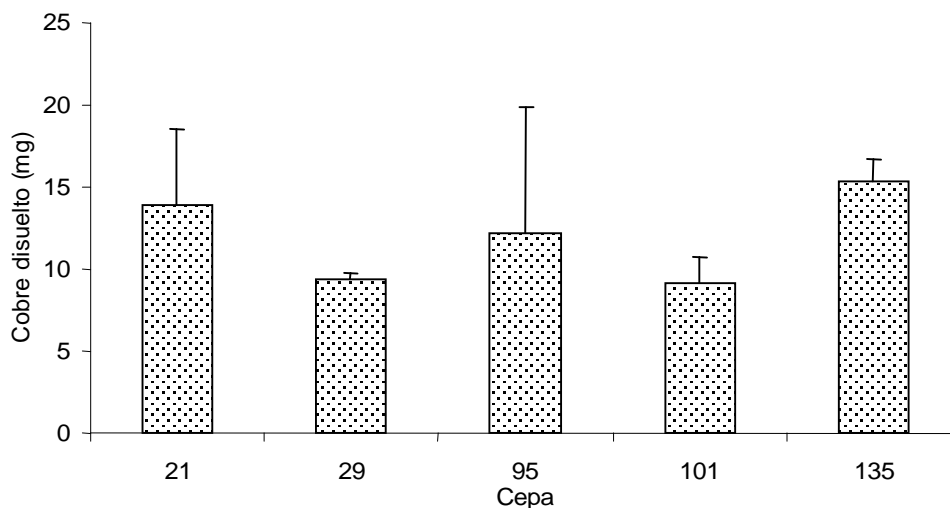
contribuiría para disminuir contaminación por EPT en suelo y agua.

### Fase 3. Capacidad de Bacterias Altamente Tolerantes para Solubilizar Cobre Metálico

Varios autores han reportado que los microorganismos son capaces de movilizar fuentes no disponibles de EPT (Ryan *et al.*, 2005). Por lo tanto, se analizó esta capacidad en las rizobacterias, para conocer su comportamiento frente a Cu metálico. Cuando estos aislados bacterianos crecieron en caldo nutritivo conteniendo un alambre de Cu metálico, se observó que

todos solubilizaron entre 9 y 14 mg de Cu (Figura 6), lo cual corresponde al 0.64 y 1% del peso inicial del alambre. La capacidad de biosorción se incrementó 44 veces y de bioacumulación 13 veces respecto a la capacidad de estos mecanismos cuando se utilizó Cu en forma de sal ( $\text{CuCl}_2$ ) (Figura 7).

En la actualidad, se continúa analizando la tolerancia a otros EPTs de las rizobacterias usadas en este trabajo. También se estudia su función en la promoción de crecimiento en las plantas, así como su efecto sobre la tolerancia de las plantas a la exposición de diferentes EPTs, ya que recientes hallazgos enfatizan su importancia (Wu *et al.*, 2006). Varios autores han



**Figura 6.** Capacidad de las bacterias para solubilizar el cobre a partir de una pieza de alambre. Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

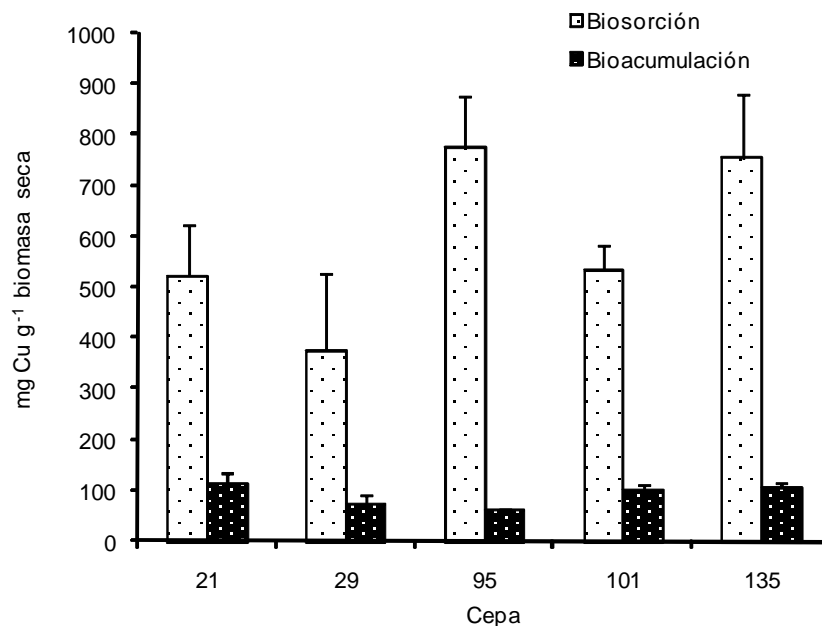


Figura 7. Biosorción y bioacumulación de cobre por bacterias de la rizosfera altamente tolerantes creciendo en caldo nutritivo conteniendo un alambre de cobre. Las barras muestran la desviación estándar ( $n = 3$ ).

mostrado que las bacterias aisladas de sitios contaminados pueden ser tolerantes a más de un EPT. Piotrowska-Seget y Cycon Kozdroj (2005) reportaron que *Methylobacterium mesopilicum* y *Flavobacterium* aisladas de un suelo limoso, *Pseudomonas gladioli* de un suelo arcilloso y *Variovorax paradoxus* aislada de desechos de minas presentaron fuerte tolerancia a Zn, Cu y Cd, o Ag, respectivamente. Belimov *et al.* (2005) mostraron que bacterias tolerantes a Cd, también lo fueron a Zn, Cu, Ni y Co, por lo que no se descarta la posibilidad de encontrar cotolerancia en las cepas tratadas a lo largo de este estudio.

### CONCLUSIONES

- La biosorción y bioacumulación en la remoción de cobre de soluciones diluidas (en forma de sal,  $\text{CuCl}_2$ ) dependieron de la especie bacteriana.
- Las rizobacterias solubilizaron cobre metálico y los procesos de biosorción y bioacumulación fueron 44 y 13 veces mayores respecto a estos mismos procesos en pruebas con soluciones diluidas de cobre.
- Las diferentes capacidades de estas bacterias, aisladas de la rizosfera de plantas que se desarrollan en sitios contaminados con elementos potencialmente tóxicos (Cu, Ni, Zn, Pb y Cd, entre otros), se debe explorar con mayor profundidad para la implementación de alternativas biológicas para la remediación de suelos y limpieza de aguas.

### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del proyecto SEMARNAT-CONACyT-CO-01-2002-0739.

### LITERATURA CITADA

- Angle, J., R. Chaney, Y. M. Li, and A. Baker. 2001. The risk associated with the introduction of native and hyperaccumulator plants. Agricultural Research Service. US Department of Agriculture. Washington, DC, USA.
- Belimov, A. A., N. Hotzeas, V. I. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bulitta and B. R. Glick. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.* 37: 241-250.
- Carrillo-González, R. 2005. Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. pp. 34-60. In: González-Chávez, M.C., J. Pérez-Moreno y R. Carrillo-González (eds.). El sistema planta-microorganismo-suelo de áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Carrillo-González, R. and M. C. González-Chávez. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144: 84-92.
- Chen, X. C., Y. P. Wang, Q. S. J. Y. Lin, W. X. Wu, and Y. X. Chen. 2005. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids Surfaces Biointerfaces* 46: 101-107.
- Chovanova, K., D. Sladekova, V. Kmet, M. Proksova, J. Harichova, A. Puskarova, B. Polek, and P. Ferienc. 2004. Identification



- and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. *Biol.* 59: 817-827.
- Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotech. Adv.* 21: 383-393.
- González-Chávez, M. C. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana* 23: 29-37.
- González-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno y R. Carrillo-González. 2005. Introducción y aspectos generales de los suelos contaminados con residuos de minas y su recuperación. pp. 1-8. *In: González-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, R. Carrillo-González (eds.). El sistema planta-microorganismo-suelo de áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.*
- González-Ramírez, P. 2005. Bacterias de la rizosfera en suelos contaminados con metales pesados. pp. 109-116. *In: González-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, R. Carrillo-González (eds.). El sistema planta-microorganismo-suelo de áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.*
- Gordon, A. S., J. V. Harwood, and S. Sayyar. 1993. Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein production in copper-stressed chemostat cultures of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 60-66.
- Hanssen A., N. Saidi, M. Cherif and A. Boudabous. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour. Tech.* 64: 7-15.
- Jezequel, K., J. Perrin, and T. Lebeau. 2005. Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula. *Chemosphere* 59: 1323-1331.
- Kaduková, J. and E. Viríková. 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ. Int.* 31: 227-232.
- Khan, A. G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elements Med. Biol.* 18: 355-364.
- Kuffner, K., M. Puschenreiter, G. Wieshammer, M. Gorfer, and A. Sessitsch. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304: 35-44.
- Martin, H. L., V. A. Hamilton, and R. A. Kopittke. 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 88: 921-924.
- Piotrowska-Seget, Z. and A. Cycon Kozdroj. 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.* 28: 237-246.
- Ryan, R. P., D. J. Ryan, and D. N. Dowling. 2005. Multiple metal resistant transferable phenotypes in bacteria as indicators of soil contamination with heavy metals. *J. Soil Sediment* 5: 95-100.
- Sánchez-Guzmán, P. 2005. Características de los suelos aledaños a los depósitos de residuos de minas. pp. 126-136. *In: M. C. González-Chávez, J. Pérez-Moreno, R. Carrillo-González (eds.). El sistema planta-microorganismo-suelo de áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.*
- Spain, A. and E. Alm. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. Undergraduate Res.* 2: 1-6.
- Tangaromsuk, J., P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue, and E. S. Upatham. 2002. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresour. Tech.* 85: 103-105.
- Thacker, U. and D. Madamwar. 2005. Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World J. Microbiol. Biotech.* 21: 891-899.
- Vullo D. L., H.M. Ceretti, E. A. Hughes, S. Ramirez, and A. Zalts. 2005. Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. *Environ. Monit. Assessment* 105: 81-97.
- Wu, S. C., K. C. Cheung, Y. M. Luo, and M. H. Wong. 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ. Pollut.* 140: 124-135.