

Este mismo comportamiento es observado a una concentración de 250 ppm, es decir hay una diferencia significativa en presencia de cadmio, mercurio y cromo, a excepción del plomo.

Con una concentración de 100 ppm los crecimientos con todos los metales se ve inhibido y presentan una diferencia significativa ($p<0.05$) con respecto al crecimiento control.

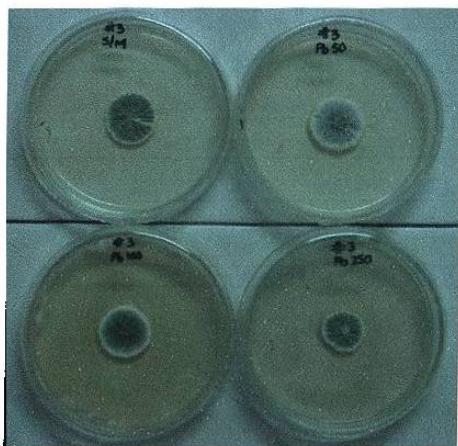


Fig 16. Resistencia a Plomo de la Cepa #3

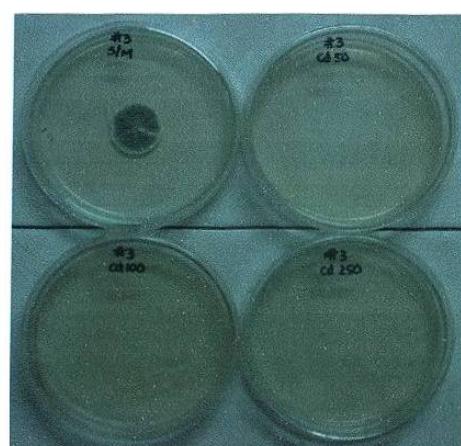


Fig 17. Resistencia a Cadmio de la Cepa #3

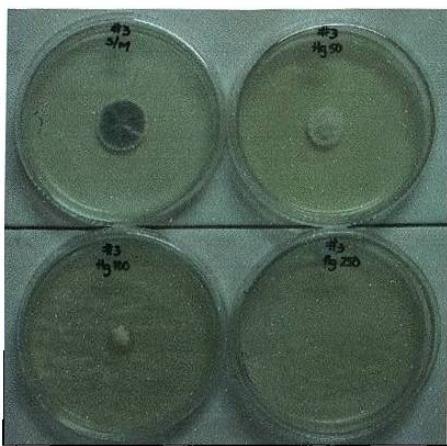


Fig 18. Resistencia a Mercurio de la Cepa #2

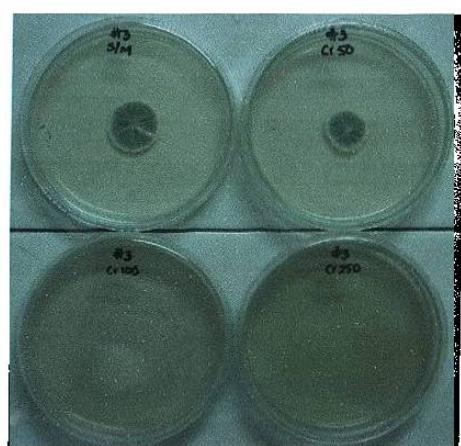
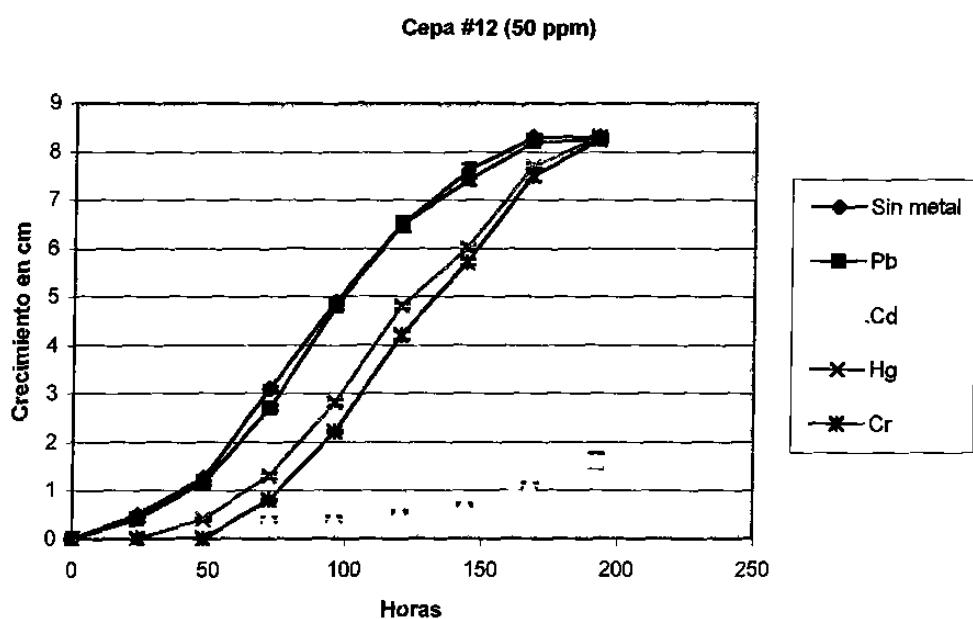
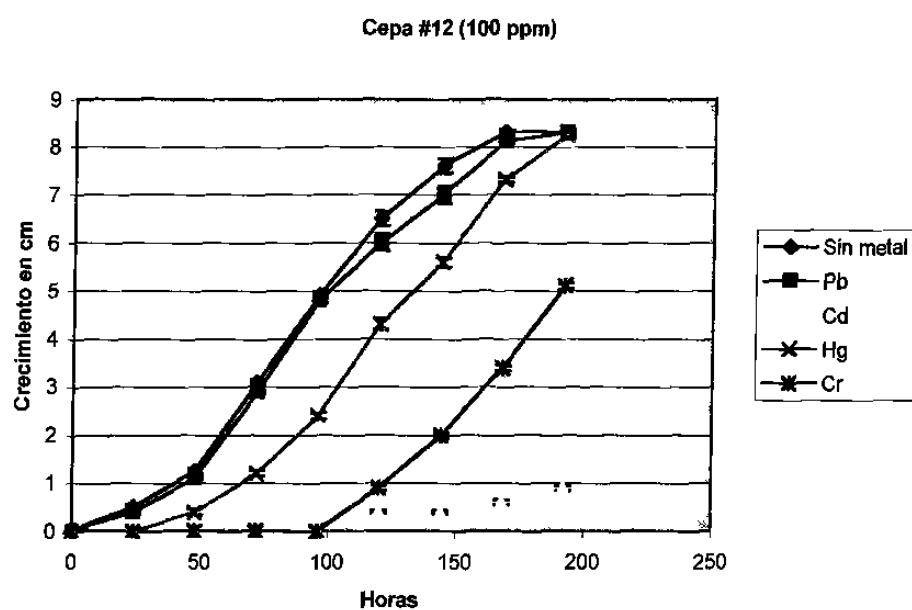


Fig 19. Resistencia a Cromo de la Cepa #2



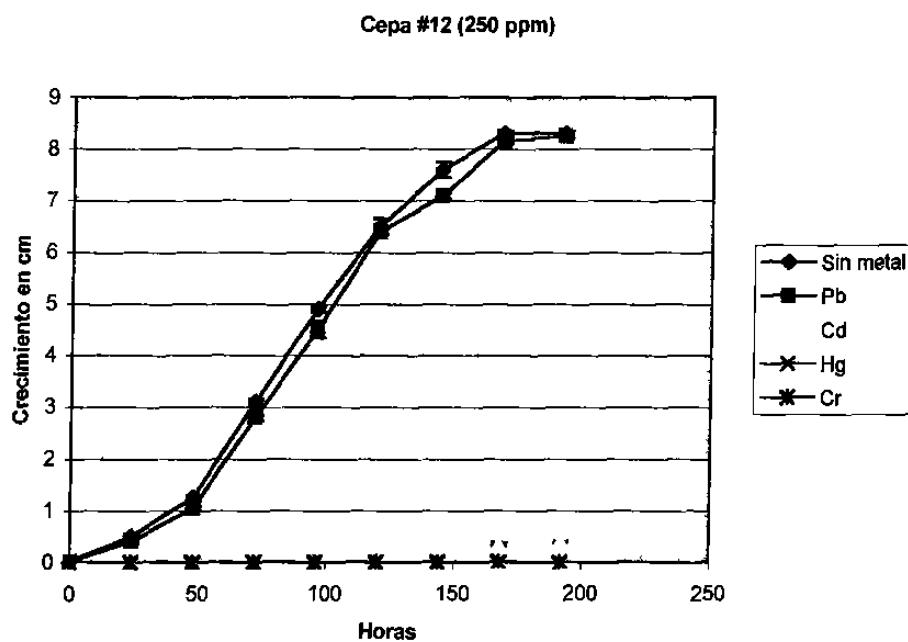
Gráfica 10. Crecimiento de la cepa #12 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).



Gráfica 11. Crecimiento de la cepa #12 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Con la cepa #12 a una concentración de 50 ppm se presentó una diferencia significativa ($p<0.05$) del crecimiento en presencia del metal cadmio, y con los metales plomo, mercurio y cromo no hubo diferencia significativa entre sus crecimientos y el crecimiento control.

En el caso de la concentración de 100 ppm la diferencia significativa ($p<0.05$) en el crecimiento con relación al crecimiento control se presentó con los metales cadmio y cromo, y donde no hubo ninguna diferencia significativa con relación al crecimiento control fue en presencia de los metales plomo y mercurio.



Gráfica 12. Crecimiento de la cepa #12 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

En la concentración de 250 ppm de cada uno de los metales con la cepa #12 hubo diferencia significativa ($p<0.05$) en el crecimiento de todos con relación al crecimiento control a excepción del plomo en el cuál no hubo diferencia significativa, por lo que en esta concentración en casi todos los metales se inhibe el crecimiento.



Fig 20. Resistencia a Plomo de la Cepa #12

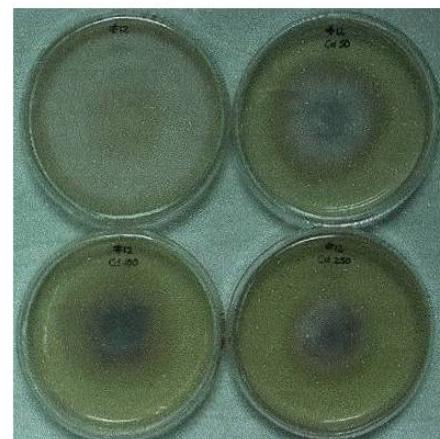


Fig 21. Resistencia a Cadmio de la Cepa #12



Fig 22. Resistencia a Mercurio de la Cepa #12

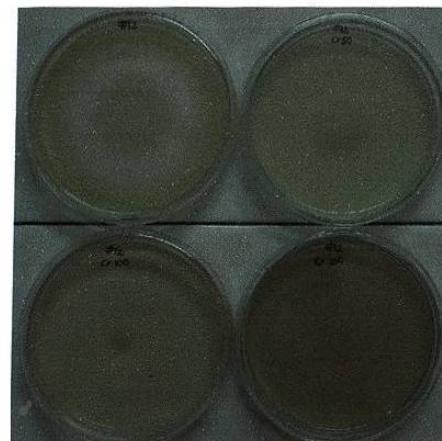
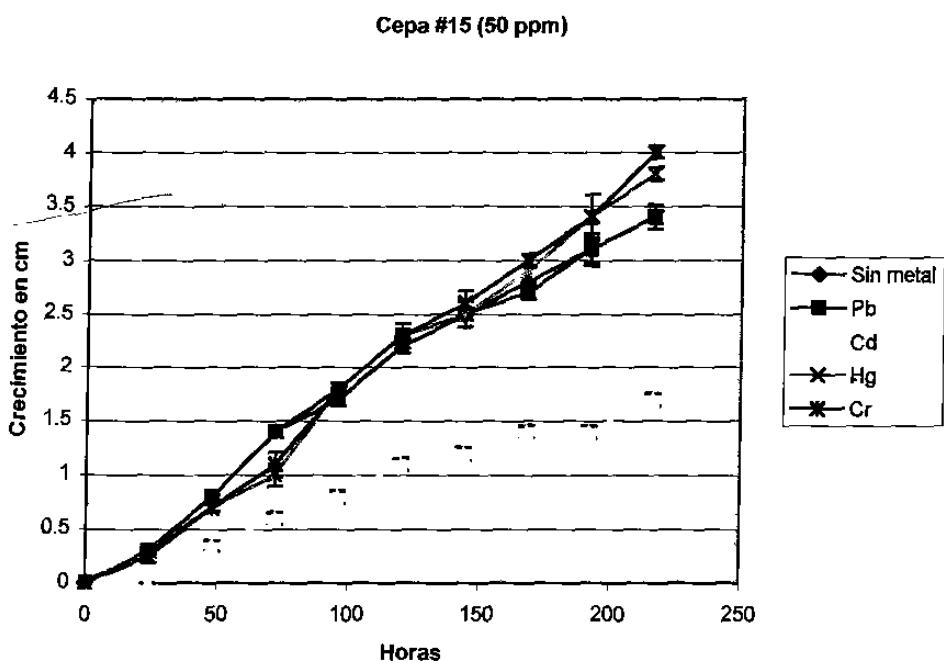
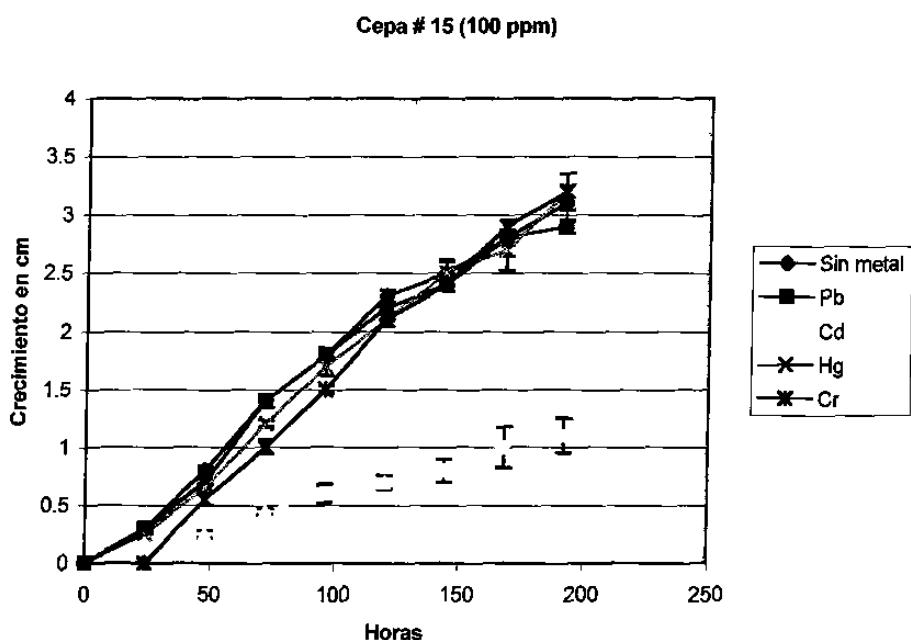


Fig 23. Resistencia a Cromo de la Cepa #12

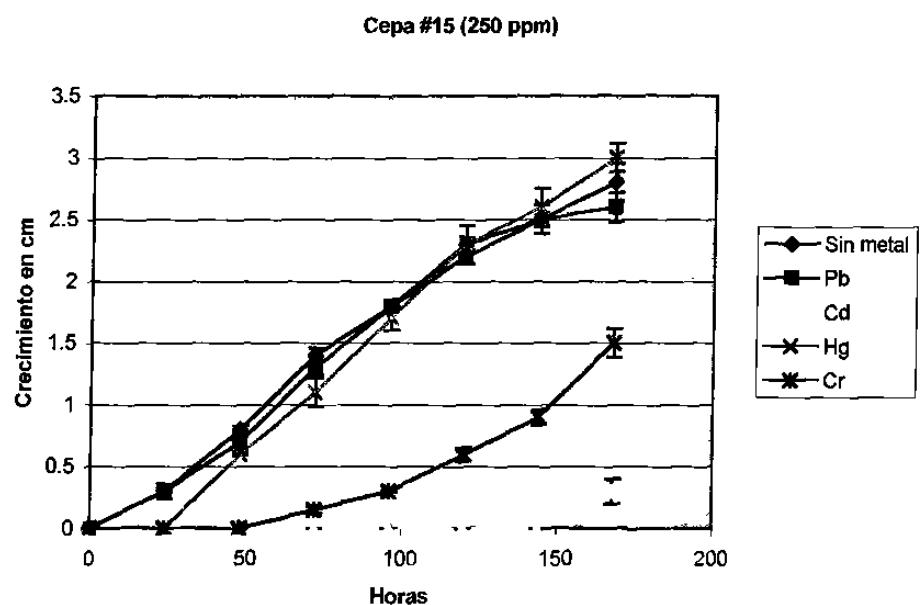


Gráfica 13. Crecimiento de la cepa #15 en 50 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).



Gráfica 14. Crecimiento de la cepa #15 en 100 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

La gráfica 13 y 14 nos muestra el crecimiento de la cepa #15 en presencia de los metales, el cuál presentó una diferencia significativa ($p<0.05$) con el metal cadmio y no hubo diferencia significativa con los metales plomo, mercurio y cromo tanto en la concentración de 50 ppm y 100 ppm.



Gráfica 15. Crecimiento de la cepa #15 en 250 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

En el caso de la concentración de 250 ppm para la cepa #15 observamos que hay diferencia significativa ($p<0.05$) del crecimiento promedio en relación con el crecimiento control en los metales cadmio y cromo, es decir éstos metales a 250 ppm inhiben el crecimiento de la cepa a diferencia de los metales plomo y mercurio en los cuales no se encontró una diferencia significativa en relación al crecimiento control.

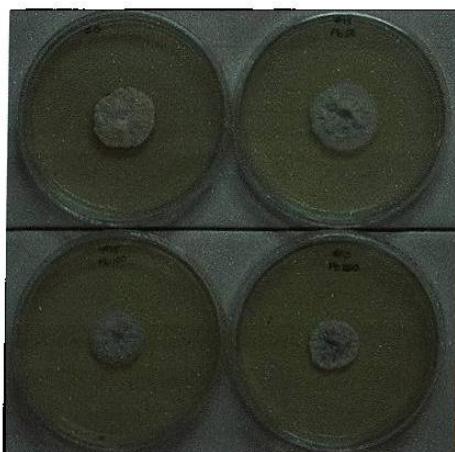


Fig 24. Resistencia a Plomo de la Cepa #15



Fig 25. Resistencia a Cadmio de la Cepa #15

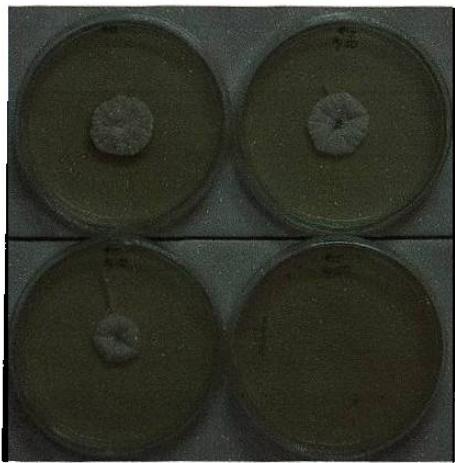


Fig 26. Resistencia a Mercurio de la Cepa #15

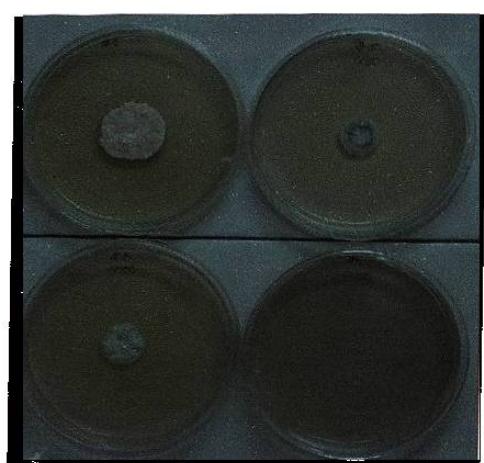
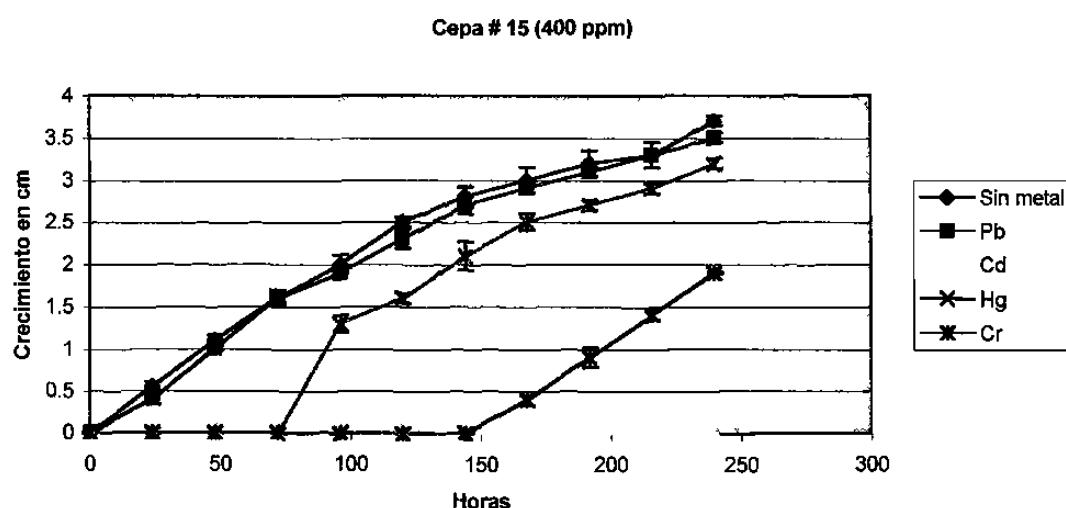


Fig 27. Resistencia a Cromo de la Cepa #15

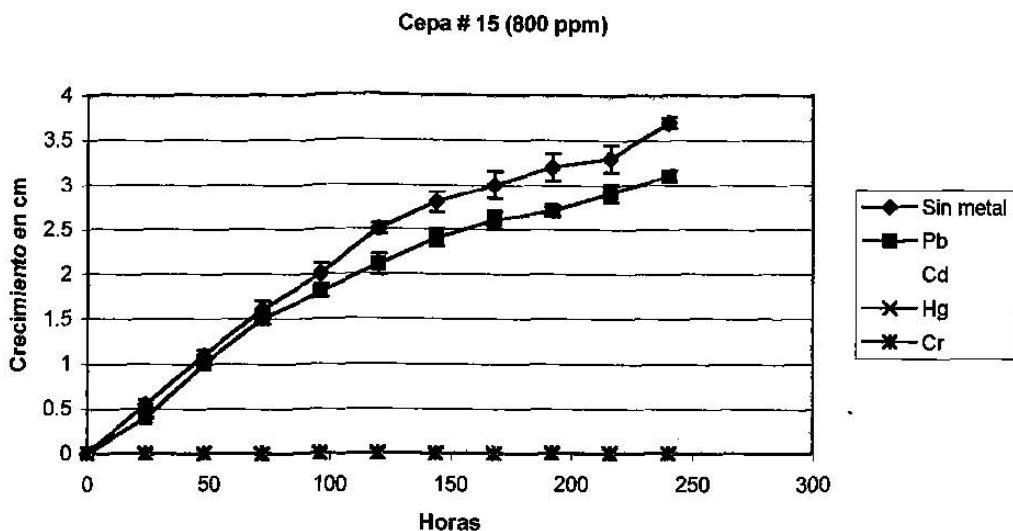
8.4 Análisis de Resistencia de la Cepa #15.

Debido a que la cepa #15 fue la que presentó menor inhibición en su crecimiento en presencia de metales como plomo, mercurio y cromo (a excepción del cadmio) en la mayor concentración (250 ppm) en comparación con las otras cepas restantes, se realizó un análisis de mayor resistencia con dicha cepa a dos concentraciones mayores como 400 y 800 ppm para cada uno de los metales.



Gráfica 16. Crecimiento de la cepa #15 en 400 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

En la gráfica 16 observamos que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre el crecimiento de la cepa #15 en presencia del cadmio y el cromo, comparado con el crecimiento de la cepa en presencia del plomo y el mercurio en los cuales no hay diferencia significativa entre éstos últimos y el crecimiento promedio del crecimiento control (sin presencia de metal).



Gráfica 17. Crecimiento de la cepa #15 en 800 ppm en presencia de los 4 metales (Pb,Cd,Hg y Cr).

Con la concentración de 800 ppm (gráfica 17) con todos los metales hubo una diferencia significativa ($p<0.05$) entre el crecimiento de la cepa en presencia de casi todos los metales y el crecimiento control a excepción del plomo.

Cultivamos la cepa #15 en medio de cultivo líquido para observar si también era capaz de desarrollar en medio líquido y cómo sería su crecimiento en presencia y ausencia del metal (plomo 400 ppm y cromo 250 ppm).



Fig 28. Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin plomo, con plomo 400 ppm y caldo únicamente.



Fig 29. Micelio seco cepa #15. Izq. sin metal; der. hongo en presencia de Pb 400 ppm

Al momento de cultivar la cepa #15 en presencia del mercurio a 400 ppm no se obtuvo crecimiento alguno, de hecho se observó la presencia de un precipitado negro en el fondo del matraz, por lo que pensamos que estábamos teniendo un problema con la solubilización del plomo en medio líquido, por lo que no podríamos llevar a cabo bien el experimento, tras realizar varias modificaciones al medio líquido para tratar de eliminar el precipitado pero sin éxito alguno, optamos por modificar el experimento realizando el crecimiento con el cromo a 250 ppm.

La cepa #15 también desarrolló en caldo Sabouraud más cloranfenicol 0.005% (CS) en presencia de 400 ppm de plomo (fig. 26), procedimos a filtrarlo, secarlo y pesarlo para ver la reducción del crecimiento. La diferencia de micelio sin metal y el micelio en presencia de plomo fue de 0.06 g, es decir se redujo en un 4.84 %.

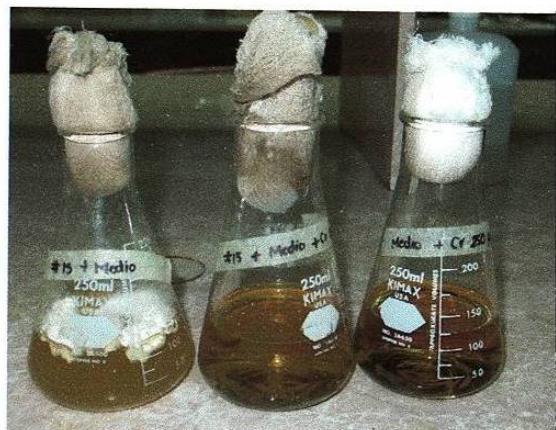


Fig 30. Cepa #15 en CS (izq. a der.) sin cromo, con cromo 250 ppm y caldo únicamente.

En el caso del cromo a 250 ppm el crecimiento micelial en el medio líquido fue mínimo por lo que no se pudo llevar a filtración y ver el porcentaje de reducción del mismo entre el micelio sin el cromo y en presencia de éste.

8.5 Extracción de DNA de las cepas de hongos.

Se realizó Extracción de DNA de las cepas de hongos utilizando un Kit de Extracción comercial para muestras de suelo.

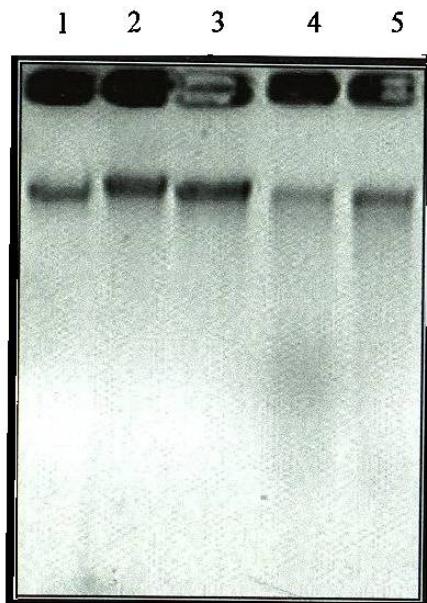


Fig 31. Extracción de DNA de los aislamientos de hongos.
Carriles del 1 al 5: Cepas #1, #2, #3, #12 y #15
respectivamente.

8.6 Amplificación de DNA genómico con PCR de 18S-rDNA.

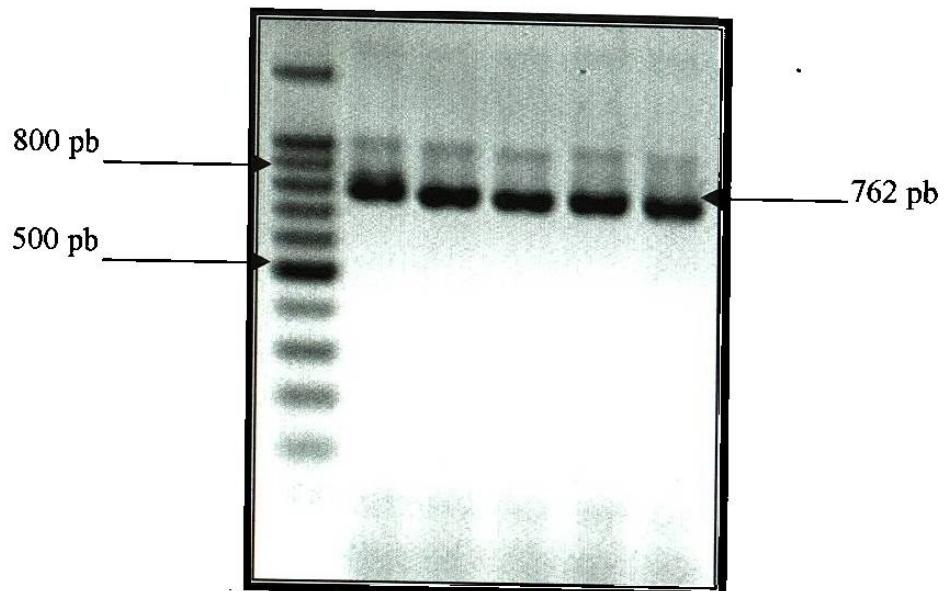


Fig 32. Productos de PCR de DNA genómico de los aislamientos de hongos. Carriles 1: Marcador, carriles 2 al 6: Cepas #1, #2, #3, #12 y #15 respectivamente.

8.7 Clonación de la cepa #15.

Caracterización de las clonas

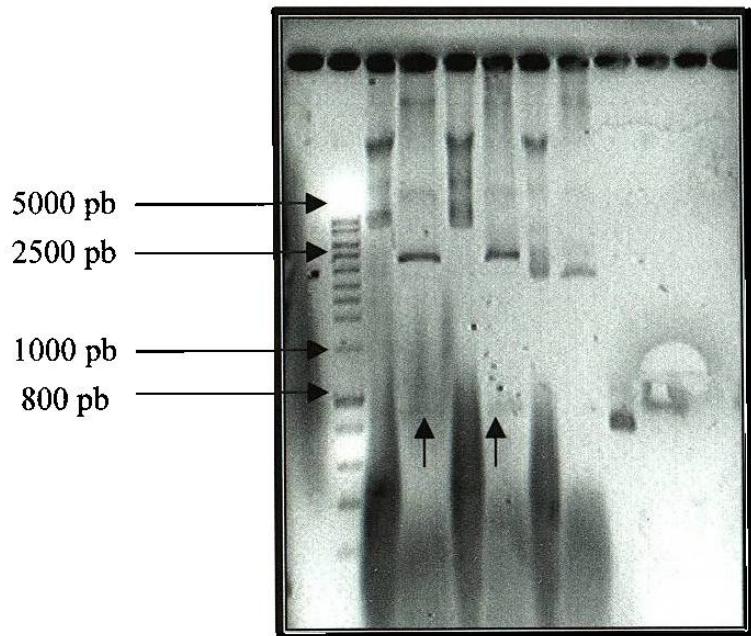


Fig 33. Digestión de las clonas 2, 3 y 5 con *EcoRI*.
Carril 2: marcador; carril 3: clona 2 s/d; carril 4: clona 2 dig; carril 5: clona 3 s/d; carril 6: clona 3 dig; carril 7: clona 5 (negativo) s/d; carril 8: clona 5 (neg) dig; carril 9: PCR (inserto) de cepa #15.

PCR de las clonas

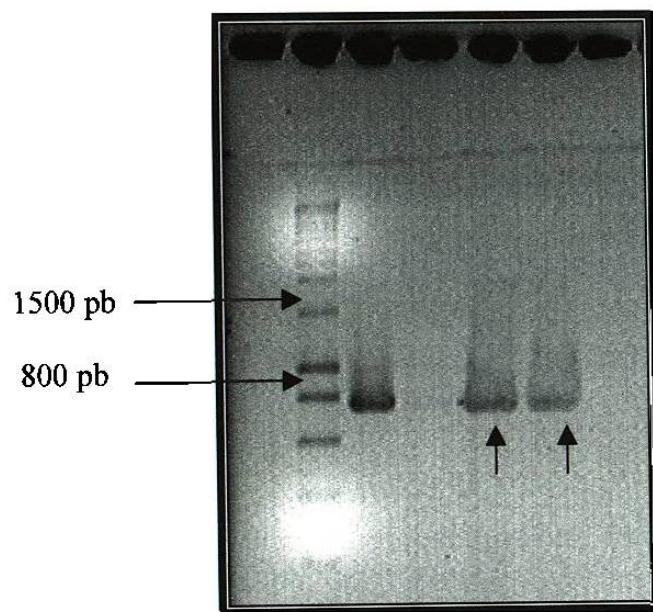


Fig 34. PCR de las clonas 2, 3 y 5. Carril 2: marcador; Carril 3: PCR de DNA genómico de la cepa #15 (control +); Carril 4: PCR de DNA plasmídico (control -); carril 5: PCR de la clona 2; carril 6: PCR de la clona 3.

8.8 Secuenciación de la cepa #15.

A continuación se presenta la secuencia que se obtuvo con un tamaño de 775 pb.

1 ttagcatggaaatggataggacgtcggtcttatttttgtggtttcgtggaccgcgtaatgattaatgggatagtcggggcgctcgtatttcgc 100
101 tgtcagaggtaattcttgatttgcgtgactaactactgcgaagcattcgccaggatgtttcattaatcagggacgaaagttagggatcgaa 200
201 gacgatcagataccgtcgtagtcattaaaccataaactatgcgcgactaggatcgacgggatctatgtatgacccgttcgcacccatcgaaaatcaaag 300
301 tttttgggtctggggggagtatggtcgcaggctgaaacttaaaggaaattgacggcaggacccacaaggcgtggagccctgcggcttaatttgcactcaa 400
401 cacccggggaaaactcccaagggtcttagaccaaaaataaggatggacagatggaggetctttttgtatttttgtatgggtgggtgcatggccgtttcttag 500
501 ttgggtggaggtggattttgtctgtttaattggcgataacgaaacqagacgttgcggcccccttaaatagccggccatctgcggggcgctggcttcttag 600
601 ggggactatcggtcaagccgttgcggaaatcacgggtctgtatgccttagatgttctggccgcacgcgcgtacactgtacaggcccg 700
701 cgagttatccatcccttggccggagggtctggtaatctgttaaacccgtcgctgtcgatggggatagagcattgtcaat 775

Fig 35. Secuencia Nucleotídica obtenida de la secuenciación de la clona .

Datos Obtenidos con el programa Blast al comparar la secuencia nucleotídica obtenida de la cepa #15

Se enlistan las primeras 20 secuencias nucleotídicas en score descendente.

GENBANK ACCESSION NO.	STRAIN	IDENTITIES	GAPS	SCORE (BITS)
AB074658.1	Uncultured ascomycete	759/777 (97%)	15/777 (1%)	1289
AB086834.1	<i>Penicillium herquei</i>	759/777 (97%)	15/777 (1%)	1289
AF548090.1	<i>Penicillium glabrum</i>	758/777 (97%)	15/777 (1%)	1281
AB069704.1	<i>Thysanophora</i> sp. WC 0944	758/777 (97%)	15/777 (1%)	1281
EJU21298	<i>Eupenicillium javanicum</i>	758/777 (97%)	16/777 (2%)	1273
D88321.2	<i>Talaromyces emersonii</i>	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
AB032120.1	<i>Penicillium argillaceum</i>	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
PVY13996	<i>Paecilomyces variotii</i>	757/778 (97%)	15/778 (1%)	1267
AB033534.1	<i>Penicillium argillaceum</i>	758/778 (97%)	16/778 (2%)	1267
D88323.1	<i>Chromocleista malachitea</i>	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB075440.1	<i>Thysanophora longispora</i>	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB069700.1	<i>Thysanophora longispora</i>	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
AB032070.1	<i>Penicillium lagena</i>	756/777 (97%)	15/777 (1%)	1265
D88322.1	<i>Talaromyces eburneus</i>	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
D88320.2	<i>Geosmithia cylindrospora</i>	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
AB008396.1	<i>Aspergillus candidus</i>	757/778 (97%)	16/778 (2%)	1259
D88319.1	<i>Penicillium namyslowskii</i>	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB028190.1	<i>Penicillium namyslowskii</i>	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB031391.1	<i>Eladia saccula</i>	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257
AB027410.1	<i>Penicillium sacculum</i>	755/777 (97%)	15/777 (1%)	1257

IX. DISCUSIÓN

La liberación de metales pesados al medio ambiente ha ido incrementando continuamente como resultado de las actividades industriales y desarrollo tecnológico, siendo una amenaza significativa para el ecosistema y la salud pública debido a su toxicidad, acumulación en la cadena alimenticia y su persistencia en la naturaleza. Por eso es importante desarrollar nuevos métodos para la remoción de metales y la recuperación de soluciones diluidas o de iones metales pesados a bajas concentraciones.

El uso de tecnologías convencionales, tales como intercambio iónico, precipitación química, ósmosis inversa y recuperación evaporativa, es casi siempre ineficiente y/o muy caro (Yu and Kaewsarn, 1999; Zhao *et al.*, 1999). A diferencia de los herbicidas, pesticidas y otros compuestos tóxicos que pueden degradarse biológicamente, los metales pesados no pueden ser eliminados y permanecen en los suelos o sedimentos, de donde se liberan lentamente al agua (Ehrlich, 1990). La remoción de los metales pesados de los cuerpos de agua mediante métodos tradicionales, tales como el intercambio iónico o la precipitación con limo, resulta muchas veces costosa e ineficiente, en particular a bajas concentraciones del metal. Además, el tratamiento de los lodos representa uno de los mayores costos en el tratamiento de las aguas residuales. Sin embargo, a pesar de que los lodos suelen ser excelentes fertilizantes, su uso en la agricultura se ve limitado por la presencia de metales pesados. La lixiviación química también es costosa por requerir grandes cantidades de ácido; en cambio es más sencilla y económica la lixiviación efectuada por microorganismos como *Thiobacillus ferrooxidans* (Couillard y Zhu, 1992).

Por estas razones, se requiere desarrollar nuevas tecnologías capaces de reducir la concentración de metales pesados en cuerpos de agua a concentraciones biológicas

- aceptables, y cuyos costos sean accesibles. Desde hace más de un siglo se ha reconocido el potencial de los microorganismos para utilizarse en la degradación o remoción de contaminantes ambientales (Schönborn, 1986) y se han aplicado desde hace mucho tiempo, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales (Brock y Madigan, 1988).

Con mayor conocimiento de la fisiología y la genética molecular de los microorganismos se han podido establecer las bases para aplicar la biotecnología ambiental y los procesos denominados de biorremediación o biorremoción.

Con esto en mente el objetivo de nuestro trabajo fue seleccionar e identificar microorganismos, específicamente hongos filamentosos, capaces de tolerar concentraciones de metales pesados, con el objetivo de identificar alguna especie que pueda servir de estudio para su utilización como agente biorremediativo de efluentes contaminadas con metales pesados o la utilización de algún gen de resistencia que pueda ser utilizado en otra cepa con características más óptimas de crecimiento o producción.

En nuestro trabajo escogimos cuatro de los principales metales que consideramos son foco de contaminación por las diferentes industrias que se encuentran en nuestra ciudad, como son el plomo, el cadmio, el mercurio y el cromo. De los 5 aislados de hongos filamentosos que obtuvimos de las muestras de agua del proceso de lodos activados de la planta de tratamiento de agua residual, pudimos observar que las capacidades de cada una de las cepas para desarrollar en presencia de plomo, cadmio, mercurio o cromo, varían tanto del tiempo de incubación, el metal así como la concentración del mismo. En estudios extensivos acerca de la utilización de biomasa microbiana como bioabsorbentes para la remoción de metales pesados, se han investigado las capacidades de remoción de varias especies de bacterias, algas, hongos y levaduras (Yetis *et al*; 2000) y se ha visto que los mecanismos como intercambio de ion, quelación, adsorción y difusión que son los que

- participan en este tipo de procesos, difieren de las especies utilizadas, el origen y el procesamiento de la biomasa y solución química (Churchill *et al.*, 1995).

Observamos que existían diferencias significativas con todas las variables (tiempo de incubación, metal y concentración) por lo que nos enfocamos específicamente en la variable metal, fijando la concentración y tomando en cuenta el último tiempo de incubación. Dandonos como resultado que para la cepa #1 a 50 ppm los metales para los cuales ésta presentó mayor tolerancia fueron el plomo, el mercurio y el cromo. A 100 ppm se inhibió el crecimiento y a 250 ppm únicamente toleró la presencia del plomo y el cromo. La cepa # 2 a 50 ppm toleró la presencia del plomo, cadmio y mercurio; a 100 ppm toleró los 4 metales: plomo, cadmio, mercurio y cromo; y para la concentración de 250 ppm únicamente fue con el metal plomo. Con la cepa #3, el metal con el que no se inhibió el crecimiento a 50 y 250 ppm fue el plomo. A 100 ppm se inhibió el crecimiento de la cepa #3 con todos los metales.

La cepa #12 a 50 ppm toleró la presencia de plomo, mercurio y cromo, a 100 ppm la presencia de plomo y mercurio, y únicamente del plomo a 250 ppm. Y con la cepa #15 tanto a 50 como 100 ppm el crecimiento no se inhibió en presencia del plomo, mercurio y cromo y en una concentración de 250 ppm toleró al plomo y mercurio. Uno de los efectos de la toxicidad por metales pesados en los hongos es la alteración de su pared celular (PC), estructura que tiene a su cargo la forma de la célula y está compuesta de polisacáridos, quitina, las glucanas y la quitosana; y de otros componentes como glicoproteínas y lípidos.

En la Fig. 9 se muestra el cambio drástico en la morfología de la cepa #1 en presencia del cadmio, donde se aprecia una modificación en el color café del crecimiento filamentoso a un color amarillo intenso, al igual que la apariencia polvoriento del hongo a una más rugosa y engrosada. Muchos de los componentes de las células interactúan fuertemente con los

metales en ensayos realizados *in vitro*. El Cu, a una concentración de 571 ppm produjo cambios morfológicos en el hongo filamento *Cunninghamella blakesleena* caracterizados por un ensanchamiento y vacuolización de las hifas, así como un engrosamiento irregular de la pared celular (Venkateswerlu *et al.*, 1989). En la cepa #2 en presencia del plomo y en la cepa #12 en presencia del plomo y cadmio podemos observar la formación de un pigmento radial café oscuro en el centro del crecimiento tanto en el anverso como el reverso (Fig. 12, Fig. 20 y Fig. 21). Para otros hongos como *Mucor rouxii* (Ramírez-Salgado, 1989) y *Trichoderma spp.* (Cortés-Penagos *et al.*, 1994) se obtuvieron observaciones similares; en estos hongos 203 ppm de Cu provocan la formación de hifas con una morfología aberrante. Dichas células mostraron alteraciones en la pared celular, que era más gruesa y estructuralmente diferente que la de las células crecidas sin el metal. *Rhizopus stolonifer*, desarrollado en 50 ppm de Ni, mostró también aberraciones morfológicas como hifas muy gruesas que tuvieron una frecuencia muy alta de ramificación (Babich y Stotzky, 1982^a).

Después de seleccionar la cepa #15 siendo la que toleró el mayor número de metales (plomo, mercurio y cromo) en las tres concentraciones, sobre todo a 250 ppm y teniendo en cuenta como característica importante que fue la única cepa que presentó tolerancia al mercurio a ésta última; aumentamos las concentraciones de los metales a 400 y 800 ppm en crecimiento sobre medio sólido, para observar si el comportamiento de la cepa #15 seguía siendo el mismo. A 400 ppm toleró la presencia del plomo y mercurio, pero con 800 ppm se inhibió el crecimiento en presencia de todos los metales.

Teníamos interés de saber si este tipo de comportamiento también podíamos obtenerlo en medio líquido, por lo que inoculamos los cultivos con los metales Pb y Hg a 400 ppm. En el caso del plomo, observamos que de la misma manera la cepa #15 desarrollaba en

presencia del plomo a 400 ppm, y únicamente se redujo el crecimiento en un 4.84%. Otro de los objetivos de realizarlo en medio líquido fue para analizar el micelio seco obtenido, es decir si el metal se encontraba dentro del micelio, precipitado extracelularmente o si estaba en el caldo de cultivo modificado químicamente y así darnos una idea del mecanismo o mecanismos que pudieran estar interviniendo en esa resistencia de la cepa #15 al metal. Por problemas con el equipo de espectroscopía de absorción atómica que utilizaríamos, no se logró este objetivo, el cuál se piensa que en estudios posteriores sea un objetivo a cumplir. En el caso del mercurio, no se obtuvo crecimiento micelial en medio líquido a 400 ppm, debido a la formación de un precipitado negro que se formó al inicio de la incubación de la cepa #15 con el metal Hg. Por lo que después de varios intentos de eliminar ésta limitante, se optó por sustituirlo por el cromo, a la mayor concentración a la cuál no se inhibió (250 ppm). En presencia del cromo a 250 ppm, el crecimiento en medio líquido, fue mucho menor, por lo que la recuperación del micelio para su secado fue más difícil y observar la reducción del micelio en presencia del cromo a 250 ppm. Desde hace tiempo se ha observado que la biomasa fúngica posee la capacidad de absorber metales a partir de soluciones acuosas, incluso cuando ya están muertas las células. Algunos estudios indican que la pared celular es el sitio primario donde se acumula el metal (Tobin *et al.*, 1984). Se señala a los polisacáridos quitina y quitosana como componentes de la pared celular útiles en la remoción de metales valiosos. La unión de los metales a la biomasa es un fenómeno complejo que depende de la naturaleza del adsorbente y de las especies de los metales presentes (éstas últimas en función del pH, su concentración, los aniones presentes y otros factores). A la biosorción se le considera como una alternativa biotecnológica de gran potencial para la remoción o recuperación de metales de diferentes fuentes que incluyen: efluentes industriales, aguas residuales de origen municipal, desechos de la industria, etc.

(Burgstaller, 1989). La biomasa utilizada generalmente proviene como desecho de procesos de fermentación basados en el uso de hongos filamentosos (Stoll y Duncan, 1996)

Deducimos una tolerancia a los metales aquí ensayados con las cepas aisladas, por que en varios de ellos no hubo diferencia significativa ($p<0.05$) entre su crecimiento con el metal y el crecimiento control (sin el metal).

En muchas de las ocasiones no es sólo uno de los mecanismos es el que participa, ya sea precipitación celular, formación de complejos, transformación de metales (oxidación, reducción, metilación, etc), biosorción a paredes celulares, pigmentos; expulsión, compartimentalización y/o atrapamiento por ciertas moléculas. Muchos microorganismos como levaduras y hongos acumulan cantidades considerables de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, oxálico, málico, tartárico, fumárico y pirúvico (Rehm y Reed., 1991).

Algunos hongos como *Trichoderma harzianum* pueden solubilizar MnO_2 , Fe_2O_3 y Zn mediante la liberación de agentes quelantes (Clarke, S.E., Stuart, J., 1987). Otro caso interesante resulta la utilización de una combinación de la solubilización microbiana del Pb de la piromorfita, $Pb_5(PO_4)_3Cl$, mediada por el hongo *Aspergillus niger* con la acumulación del metal disuelto por parte de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho metal (Gadd, G.M., 2000). La bioacumulación es otro proceso en el cuál una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioninas o compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

Después de la identificación por microbiología tradicional y la selección de la cepa #15, realizamos extracción de DNA para el análisis de su secuencia (Fig. 31), con el cuál se provee un mayor entendimiento de los microorganismos de hábitat naturales, y pueden ser estudiados y caracterizados sin ser cultivados. De las varias técnicas de ácidos nucleicos

utilizados para estimar la composición y la diversidad de una comunidad microbiana en hábitat complejo, la que utilizamos fue la determinación de las secuencias 18S rRNA (Ward *et al.*, 1992). Tanto la extracción como la amplificación del DNA se llevó a cabo de los 5 aislados (Fig. 31 y Fig. 32), pero únicamente la cepa #15 fue clonada para su secuenciación (Fig. 33 y Fig. 34); la cuál fue realizada en Puerto Rico, por el M.C. Hugo Leonid Gallardo García Blanco y William Rosado bajo la dirección del Dr. Govind Nadathur. El análisis de la secuencia obtenida (Fig. 35), fue realizado por el programa Blastn y comparado por similaridad con otras secuencias conocidas en la base de datos NCBI GeneBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). En suma, el hongo seleccionado como una cepa tolerante a metales pesados fue identificado como perteneciente al género *Penicillium*.

Los resultados aquí presentados así sugieren que existe la posibilidad de aislar hongos filamentosos capaces de tolerar a metales pesados para su identificación y utilización por interacción metal-microbiota dentro de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados. Los hongos como ya vimos poseen diversos mecanismos para unir y remover metales pesados en solución. Un proceso de bioremediación fue desarrollado utilizando el hongo *Aspergillus niger* para producir ácidos orgánicos débiles para la lixiviación de metales pesados de suelos contaminados (Wasay, S., 1998). En algunas circunstancias, los hongos pueden adsorber derivados insolubles de metales, por ejemplo sulfuros, lo que puede representar otra área potencial de aplicación biotecnológica. *Aspergillus niger* es capaz de oxidar sulfuros de Cu, Fe y Zn a sus correspondientes sulfatos; las partículas de sulfuros son adsorbidas del medio a la superficie micelial (Wainwright y Grayston, 1986). *Mucor flavus* puede adsorber sulfuro de Fe, polvo de Zn e hidróxido férreo “ocre” a partir del drenaje

acidificado de un amina (Singleton *et al.*, 1990). *A. niger*, *Fusarium solani* y *Penicillium notatum* son capaces de remover ocre a partir de una solución, pero con menos eficiencia que *M. flavus* (Wainwright *et al.*, 1986).

Aunque en nuestro trabajo desconocemos específicamente el o los mecanismos que están presentes, suponemos que uno de los mecanismos de nuestra cepa de *Penicillium*, pudiera ser algún proceso de inmovilización fisicoquímico como la adsorción, es decir, la unión a grupos funcionales de la pared celular (-PO₃, -COO, -NH₂), etc; mecanismo que ha sido reportado como un nuevo modelo que describe la relación de adsorción de iones metales a grupos amino en una especie de *Penicillium chrysogenum* (Tan & Chen, 2003); cuyo trabajo sugiere que el micelio podría ser utilizado para la remoción a gran escala de Cr de aguas de desecho de curtidurías. También Sarret en su estudio de la determinación estructural del Zn y el Pb a los sitios de unión en las paredes de *Penicillium chrysogenum*, nos muestra la unión predominante a grupos fosforil y carboxil (Sarret *et al.*, 1998). La tolerancia existe, por las características anteriormente mencionadas, y para nuestro propósito la cepa óptima de nuestros aislados, fué la cepa #15 perteneciente al género *Penicillium*.

Por lo tanto más investigación en el campo de la ecología de hábitats contaminados con metales es mucha utilidad y es previsible que la manipulación genética de los hongos utilizados, bien sea por técnicas de genética formal o ingeniería genética, conducirá a incrementos en la eficiencia de la biosorción de las especies utilizadas hasta ahora o de otras nuevas.

X. CONCLUSIONES

1. Se realizaron 5 aislamientos de hongos filamentos de las muestras del proceso de agua residuales.
2. La selección de las cepas tolerantes a metales pesados se llevó a cabo en base al síntoma de intoxicación más fácilmente observable que es la inhibición del crecimiento y a la diferencia significativa en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo entre el crecimiento en presencia de cada uno de los metales y su crecimiento control.
3. La cepa #15 fue la óptima de nuestros aislados, ya que toleró el mayor número de metales (plomo, mercurio y cromo) en las tres concentraciones, sobre todo a 250 ppm. Una característica importante es que fué la única cepa que presentó tolerancia al mercurio a 400 ppm.
4. La cepa #15 tolerante a metales pesados fue identificada por métodos moleculares utilizando una base de datos de secuencias (NCBI Genebank Database) como perteneciente al género *Penicillium*.

XI. APÉNDICE

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.6±0.06*	1.8±0.06*	2.0±0.06*	2.4±0.06*	
48	5.4±0.10*	5.5±0.00*	2.7±0.00*	4.5±0.06*	5.5±0.10*	
72	7.1±0.10*	7.1±0.06*	3.7±0.06*	6.2±0.06*	7.2±0.00*	
96	8.2±0.12*	8.15±0.07*	4.75±0.14*	7.55±0.05*	8.1±0.06*	
120	8.4±0.03*	8.25±0.03*	6.4±0.06*	8.1±0.03*	8.2±0.03*	
144	8.5±0.06*	8.4±0.06*	8.3±0.17*	8.3±0.06*	8.3±0.03*	

Tabla 2. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.7±0.06*	1.4±0.06*	1.8±0.00*	1.7±0.35*	
48	5.4±0.10*	5.6±0.06*	2.4±0.06*	4.4±0.06*	5.3±0.44*	
72	7.1±0.10*	7.3±0.12*	3.1±0.06*	6.0±0.10*	7.5±0.32*	
96	8.2±0.12*	8.1±0.8*	3.9±0.03*	7.4±0.15*	8.2±0.03*	
120	8.4±0.03*	8.2±0.03*	4.8±0.10*	8.1±0.08*	8.25±0.03*	
144	8.5±0.06*	8.3±0.03*	6.3±0.12*	8.25±0.03*	8.3±0.03*	

Tabla 3. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3		CRECIMIENTO DE LA CEPA #1 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr	
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	
24	2.6±0.06*	2.6±0.06*	0.6±0.06*	0.0±0.00*	0.5±0.06*	
48	5.4±0.10*	5.4±0.10*	1.5±0.06*	0.0±0.00*	1.2±0.12*	
72	7.1±0.10*	7.0±0.12*	2.2±0.06*	0.0±0.00*	2.6±0.06*	
96	8.2±0.14*	8.0±0.00*	3.2±0.00*	0.0±0.00*	5.7±0.00*	
120	8.4±0.03*	8.25±0.05*	3.6±0.10*	0.0±0.00*	7.65±0.22*	
144	8.5±0.06*	8.35±0.03*	4.9±0.17*	0.0±0.00*	8.3±0.08*	

Tabla 4. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #1 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	1.0±0.06*	0.9±0.10*	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.3±0.10*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	1.7±0.06*	1.9±0.15*	1.6±0.06*
72	3.0±0.10*	2.8±0.06*	2.4±0.06*	2.8±0.10*	2.8±0.05*
96	3.8±0.20*	3.8±0.10*	3.6±0.10*	3.75±0.08*	3.75±0.10*
120	4.6±0.10*	4.7±0.06*	4.15±0.10*	4.4±0.12*	4.45±0.10*
144	5.6±0.21*	5.4±0.06*	5.1±0.12*	5.35±0.05*	5.4±0.15*
168	6.4±0.12*	6.3±0.06*	5.85±0.10*	6.1±0.06*	6.4±0.10*
192	6.9±0.06*	7.0±0.06*	6.55±0.05*	6.7±0.10*	7.0±0.12*
216	7.3±0.06*	7.3±0.06*	7.2±0.06*	7.3±0.11*	7.0±0.15*

Tabla 5. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.0*
24	1.0±0.06*	0.8±0.06*	0.2±0.06*	0.7±0.06*	0.0±0.00*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	0.8±0.06*	1.7±0.06*	0.4±0.00*
72	3.0±0.10*	2.9±0.06*	1.35±0.05*	2.7±0.03*	0.5±0.03*
96	3.8±0.20*	3.8±0.06*	2.0±0.06*	3.55±0.03*	1.8±0.15*
120	4.6±0.10*	4.8±0.12*	2.6±0.10*	4.25±0.05*	3.0±0.20*
144	5.6±0.21*	5.6±0.03*	3.5±0.15*	5.1±0.12*	4.0±0.23*
168	6.4±0.12*	6.5±0.12*	4.0±0.06*	5.9±0.21*	5.1±0.06*
192	6.9±0.06*	6.9±0.06*	4.6±0.15*	6.6±0.06*	6.05±0.05*
216	7.3±0.06*	7.3±0.10*	5.2±0.06*	7.2±0.06*	7.0±0.21*

Tabla 6. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #2 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	1.0±0.06*	1.0±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	2.2±0.06*	1.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	3.0±0.10*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	3.8±0.20*	3.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	4.6±0.10*	4.7±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	5.6±0.20*	5.6±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.2±0.10*
168	6.4±0.12*	6.5±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	2.6±0.10*
192	6.9±0.06*	7.0±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	3.7±0.10*
216	7.3±0.06*	7.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	4.8±0.10*

Tabla 7. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.4±0.06*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.3±0.06*	0.4±0.06*
48	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.0±0.00*	0.35±0.05*	0.6±1.05*
72	1.6±0.11*	1.4±0.06*	0.0±0.00*	0.7±0.11*	1.1±0.06*
96	2.1±0.06*	1.95±0.05*	0.0±0.00*	0.9±0.06*	1.7±0.06*
120	2.5±0.06*	2.1±0.03*	0.0±0.00*	1.2±0.08*	2.0±0.06*
144	2.8±0.06*	2.5±0.10*	0.0±0.00*	1.6±0.08*	2.3±0.10*
168	2.95±0.10*	2.7±0.03*	0.0±0.00*	1.85±0.05*	2.5±0.06*
192	3.2±0.06*	2.9±0.012*	0.0±0.00*	2.1±0.06*	2.75±0.05*
216	3.2±0.09*	3.15±0.03*	0.0±0.00*	2.5±0.21*	2.85±0.10*

Tabla 8. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.4±0.06*	0.4±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	0.8±0.06*	0.6±0.10*	0.0±0.00*	0.2±0.00*	0.0±0.00*
72	1.6±0.12*	1.2±0.06*	0.0±0.00*	0.4±0.03*	0.4±0.06*
96	2.1±0.06*	1.8±0.10*	0.0±0.00*	0.75±0.05*	1.1±0.06*
120	2.5±0.06*	2.0±0.08*	0.0±0.00*	1.0±0.03*	1.4±0.03*
144	2.8±0.06*	2.25±0.05*	0.0±0.00*	1.5±0.03*	1.8±0.08*
168	2.95±0.14*	2.6±0.08*	0.0±0.00*	1.6±0.03*	2.1±0.06*
192	3.2±0.06*	2.9±0.12*	0.0±0.00*	1.9±0.12*	2.45±0.05*
216	3.2±0.09*	3.0±0.08*	0.0±0.00*	2.15±0.10*	2.6±0.10*

Tabla 9. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #3 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.4±0.00*	0.4±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	0.8±0.06*	0.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	1.6±0.11*	1.4±0.12*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	2.1±0.06*	1.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	2.5±0.06*	2.2±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	2.8±0.06*	2.65±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.2±0.10*
168	2.95±0.10*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.35±0.03*
192	3.2±0.06*	3.1±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.7±0.05*
216	3.2±0.09*	3.3±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	1.3±0.10*

Tabla 10. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #2 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.15±0.05*	0.0±0.00*	0.4±0.03*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.7±0.06*	0.4±0.06*	1.3±0.06*	0.8±0.03*
96	4.9±0.06*	4.8±0.06*	0.4±0.06*	2.8±0.06*	2.2±0.03*
120	6.5±0.15*	6.5±0.15*	0.55±0.03*	4.8±0.06*	4.2±0.08*
144	7.6±0.15*	7.4±0.10*	0.7±0.03*	6.0±0.06*	5.7±0.06*
168	8.3±0.06*	8.2±0.03*	1.1±0.06*	7.7±0.06*	7.5±0.12*
192	8.3±0.06*	8.25±0.03*	1.6±0.15*	8.3±0.03*	8.25±0.05*

Tabla 11. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.1±0.03*	0.0±0.00*	0.4±0.06*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.9±0.03*	0.0±0.00*	1.2±0.06*	0.0±0.00*
96	4.9±0.06*	4.8±0.06*	0.0±0.00*	2.4±0.06*	0.0±0.00*
120	6.5±0.15*	6.0±0.17*	0.4±0.03*	4.3±0.12*	0.9±0.06*
144	7.6±0.15*	7.0±0.17*	0.4±0.03*	5.6±0.10*	2.0±0.06*
168	8.3±0.06*	8.1±0.06*	0.6±0.06*	7.3±0.06*	3.4±0.06*
192	8.3±0.06*	8.3±0.03*	0.9±0.06*	8.25±0.05*	5.1±0.06*

Tabla 12. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #12 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.5±0.06*	0.4±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.25±0.05*	1.05±0.04*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	3.1±0.06*	2.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	4.9±0.06*	4.5±0.15*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	6.5±0.15*	6.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	7.6±0.15*	7.1±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
168	8.3±0.06*	8.15±0.05*	0.35±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
192	8.3±0.06*	8.25±0.03*	0.4±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*

Tabla 13. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #12 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 50 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.3±0.01*	0.3±0.06*	0.0±0.00*	0.3±0.03*	0.25±0.06*
48	0.8±0.03*	0.8±0.03*	0.35±0.05*	0.7±0.03*	0.7±0.03*
72	1.4±0.06*	1.4±0.06*	0.6±0.06*	1.0±0.10*	1.1±0.12*
96	1.8±0.03*	1.7±0.06*	0.8±0.06*	1.8±0.03*	1.8±0.06*
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	1.1±0.06*	2.3±0.03*	2.3±0.12*
144	2.5±0.12*	2.5±0.06*	1.2±0.06*	2.5±0.06*	2.6±0.12*
168	2.8±0.15*	2.7±0.06*	1.4±0.06*	2.9±0.06*	3.0±0.06*
192	3.1±0.15*	3.1±0.12*	1.4±0.06*	3.4±0.21*	3.4±0.06*
216	3.4±0.12*	3.4±0.06*	1.7±0.06*	3.8±0.06*	4.0±0.06*

Tabla 14. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 50 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 100 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.3±0.01*	0.3±0.03*	0.0±0.00*	0.25±0.03*	0.0±0.00*
48	0.8±0.03*	0.7±0.03*	0.25±0.03*	0.65±0.03*	0.55±0.05*
72	1.4±0.06*	1.4±0.06*	0.45±0.03*	1.2±0.06*	1.0±0.06
96	1.8±0.03*	1.8±0.06*	0.6±0.08*	1.7±0.06*	1.5±0.03*
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	0.7±0.06*	2.1±0.17*	2.1±0.01*
144	2.5±0.12*	2.4±0.06*	0.8±0.10*	2.5±0.17*	2.4±0.06*
168	2.8±0.15*	2.8±0.06*	1.0±0.17*	2.7±0.17*	2.9±0.06*
192	3.1±0.15*	2.9±0.06*	1.1±0.15*	3.2±0.06*	3.2±0.15*
216	3.4±0.12*	3.4±0.06*	1.1±0.15*	3.6±0.06*	3.4±0.12

Tabla 15. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 100 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #3 250 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.3±0.01*	0.3±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	0.8±0.03*	0.7±0.8*	0.0±0.00*	0.6±0.01*	0.0±0.00*
72	1.4±0.06*	1.3±0.06*	0.0±0.00*	1.1±0.12*	0.15±0.03*
96	1.8±0.03*	1.8±0.03*	0.0±0.00*	1.7±0.10*	0.3±0.01*
120	2.3±0.06*	2.2±0.06*	0.0±0.00*	2.3±0.15*	0.6±0.06*
144	2.5±0.12*	2.5±0.06*	0.0±0.00*	2.6±0.15*	0.9±0.06*
168	2.8±0.15*	2.6±0.12*	0.3±0.10*	3.0±0.12*	1.5±0.12*
192	3.1±0.15*	3.3±0.17*	0.4±0.08*	3.2±0.15*	2.0±0.10*
216	3.4±0.12*	3.4±0.15*	0.5±0.01*	3.4±0.15*	2.5±0.08*

Tabla 16. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 250 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 400 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.55±0.05*	0.4±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.1±0.06*	1.0±0.03*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	1.6±0.10*	1.6±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	2.0±0.12*	1.9±0.01*	0.0±0.00*	1.3±0.10*	0.0±0.00*
120	2.5±0.06*	2.3±0.12*	0.0±0.00*	1.6±0.06*	0.0±0.00*
144	2.8±0.12*	2.7±0.10*	0.0±0.00*	2.1±0.17*	0.0±0.00*
168	3.0±0.15*	2.9±0.06*	0.0±0.00*	2.5±0.10*	0.4±0.06*
192	3.2±0.15*	3.1±0.06*	0.0±0.00*	2.7±0.06*	0.9±0.12*
216	3.3±0.15*	3.3±0.01*	0.0±0.00*	2.9±0.06*	1.4±0.06*
240	3.7±0.06*	3.5±0.06*	0.0±0.00*	3.2±0.06*	1.9±0.01*

Tabla 17. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 400 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

n=3	CRECIMIENTO DE LA CEPA #15 800 PPM				
HORA	Sin metal	Pb	Cd	Hg	Cr
0	0.0±0.00	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
24	0.55±0.05*	0.4±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
48	1.1±0.06*	1.0±0.01*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
72	1.6±0.10*	1.5±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
96	2.0±0.12*	1.8±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
120	2.5±0.06*	2.1±0.12*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
144	2.8±0.12*	2.4±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
168	3.0±0.15*	2.6±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
192	3.2±0.15*	2.7±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
216	3.3±0.15*	2.9±0.10*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*
240	3.7±0.06*	3.1±0.06*	0.0±0.00*	0.0±0.00*	0.0±0.00*

Tabla 18. Valores del crecimiento radial en cm de la cepa #15 en presencia de plomo, cadmio, mercurio y cromo a 800 ppm. según se describe en material y métodos.*Desviación estándar.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Tan T** y **Chen P** (2003). Biosorption of metals ions with *Penicillium chrysogenum*. *Appl Bioche Biotechnol*, 104(2):119-28.
2. **Baldrian P** y **Gabriel J** (2002). Intraespecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*, 94(3):428-36.
3. **Canstein HV**, Kelly S, Li Y and Wagner-Döbler I (2002). Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Environmental Conditons. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6):2829-37.
4. **Ceribasi H** and **Yetis U**, (2001). Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system-Kinetics. *Water SA* , Vol. 27, No. 1:15-20.
5. **Cervantes C**, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R (2001). Interactions of Chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25:335-47.
6. **Ranjard L**, Poly F, Lata JC, Mougel C, Thioulouse J & Nazaret S (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10):4479-87.
7. **Williams RH**, Ward E and Alastair MacCartney H (2001). Methods for Integrated Air Sampling and DNA Analysis for Detection for Airborne Fungal Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6):2453-59.
8. **Boon N**, Goris J (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gpf. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2906-13.

9. **Borneman** J, Hartin RJ (2000). PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes From Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4356-60.
10. **Cervantes** C, Alvarez H, Ramírez MI, Vargas E (2000). Expulsión de Arsenito y Cromato en bacterias. *Boletín de Educación Bioquímica*, 19(2):103-9.
11. **Dirk Jan van Elsas**, Frois Duarte Gabriela, (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 43:2:133-51
12. **Gadd** GM (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:271-79.
13. **González** J, Moreno AM, Pérez L, Larrea MT, Prieto P, De la Rosa C, Masso A (2000). Nivel de Contaminación en suelos por elementos tóxicos traza. Impacto sobre las comunidades microbianas. *Edafología*, 7(3):47-54.
14. **Gross** S & Robins EI (2000). Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hidrobiología* 433:91-109.
15. **Hill** GT, Mitkowski AN, Aldrich-Wolfe L, Ernele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramírez S, Lynch ST, Nelson EB (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15:25-36.
16. **Hobman** JL, Wilson JR, Brown NL (2000). Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 8:177-197.
17. **Hobman** JL, Wilson JR, Brown NL (2000). Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 10:235-55.
18. **Hobman** JL, Wilson JR, Brown NL (2000). Microbial Mercury Reduction. *Environmental Microbe.Metal Interactions*. 11:237-56.

19. Yetis U, Dolek A, Dilek FB and Ozcengiz G (2000). The removal of Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium*. Water. Res. 34 (16) 4090-100.
20. Del Val C, Barea JM (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated Soils. Applied and Environmental Microbiology 65(2):718-23.
21. Konopka A, Zakharova T, Bischoff M, Oliver L, Nakatsu C and Turco RF (1999). Microbial Biomass and Activity in Lead-Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology, 65(5):2256-59.
22. Smit Eric, Leeflang Paula, Glandorf Boet, (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA by Temperature Gradient Gel Electrophoresis, 65(6):2614-21.
23. Yu Q and Kaewsarn P (1999). Binary adsorption of copper (II) and cadmium (II) from aqueous solutions by biomass of marine alga *Durvillacea potatorum*. Sep. Sci. Technol. 34(8):1595-1605.
24. Zhao M, Duncan JR and Van Hille RP (1999). Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluent using *Azolla filiculoides*. Water Res. 33(6):1516-22.
25. Sarret G, Manceau A, Sapdini L, Claude Roux J, Lous Hazemann J, Soldo Y, Eybert-Berard L, Jacques Menthonnex J (1998). Structural Determination of Zn and Pb Binding Sites in *Penicillium chrysogenum* Cell Walls by EXAFS Spectroscopy. Environ Sci Technol 32:1648-55.
26. Wasay SA, Barrington SF, Tokunaga S (1998). Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. Environ. Technol. 19:369-80.
27. Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biological Procedures Online, 1:140-46

28. **Brus** R, Kostrzewa RM, Felinska W, Plech A, Szkilnik R, Frydrych JC (1997). Ethanol inhibits cadmium accumulation in brains of offspring of pregnant rats that consume cadmium. *Toxicol. Lett.* 76:57-62.
29. **D.K.** van Elsas, Trevors J.T., (1997). Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *Modern Soil Microbiology*. 13:375-439.
30. **Galicia-García** V, Rojas-López M, Rojas R, Olaiz G, Ríos C (1997). Cadmium levels in maternal cord and newborn blood in México City. *Toxicol. Lett.* 91:57-61.
31. **Pufahl** RA, singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta CV, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Abcl. *Science* 278:853-56.
32. **Valentine** JS, Gralla Be (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* 278:817-18.
33. **Calderón-Salinas** V, Valdez-Anaya B, Zúñiga-Charles MA, Albores-Medina A (1996a). Lead exposure in a population of mexican children. *Human Exp. Toxicol.* 15:305-311.
34. **Calderón-Salinas** V, Hernández Luna C, Valdez Anaya B, Maldonado-Vega M, López Miranda A (1996b). Evolution of lead toxicity in a population of children. *Human Exp. Toxicol.* 15:376-382.
35. **Cervantes** C & Silver S (1996). Sistemas de Resistencia a Metales en *Pseudomonas*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 38:45-64.
36. **Krauter** P, Martinelli R, Williamns K and Martins S (1996). Removal of Cr(VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7:277-86.

37. **Ramírez-Salgado** P, Caracheo-Aguilar S, Obregón Herrera A, Sosa-Luna L, Amézquita-López F, Mendoza-Díaz G, Gutiérrez-Corona F (1996). Copper resistance and accumulation in the zygomycete *Mucor rouxii*. *Curr. Microbiol.* 33:163-6.
38. **Stoll** A, Duncan JK (1996). Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* 18:1209-12.
39. **Batres** L, Carrizales L, Calderón J, Díaz-Barriga F (1995). Participación del barro vidriado en la exposición infantil al plomo en una comunidad industrial expuesta ambientalmente a este metal. En: Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control (Hernández M y E Palazuelos, Eds) Instituto Nacional de Salud Pública y Departamento del Distrito Federal. p:175-85.
40. **Díaz-Barriga** F, Carrizales L, Calderón J, Batres L, Yáñez L, Tabor MUU, Castelo J (1995). Measurement of placental levels of arsenic, lead and cadmium as a biomarker of exposure to mixtures. E: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A book (Butterworth FM, Corkum LD y Guzmán-Rincón J, Eds.) Plenum Pub. Co. p:139-48.
41. **Girardi** G, Elias M (1995). Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Rad. Biol. Med.* 18:61-6.
42. **Jiménez** C, Ramírez I, Palazuelos E, Muñoz I, C Munawar M, Munawar IF, Weisse T, Leppard GG, Legner M (1995). The significance and future potential of using microbes for assessing ecosystems health; The Great Lakes example. *J. Aquatic Ecosys. Health* 3:295-310.
43. **Munawar** M, Munawar IF, Weisse T, Leppard GG, Legner M (1995). The significance and future potential of using microbes for assessing ecosystems health; The Great Lakes example. *Aquatic Ecosys. Health* 3:295-310 .

44. **Palazuelos E**, (1995). En: Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control (Avila MH y Palazuelos, eds) México, D.F. p:257-88.
45. **Salt DE**, Rauser WE (1995). Mg ATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant physiol* 107:1293-1301.
46. **Cervantes C**, Gutiérrez-Corona F (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:121-38.
47. **Coblenz A**, Wolf K (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *FEMS Microbiol. Rev.* 14:303-8.
48. **Cortés-Penagos C**, Gradueñas-Piña C, Caracheo-Aguilar S, Obregón-Herrera A, Ramírez-Salgado P, Amézquita-López F, Hernández-Hernández M, Cano-Canchola C, Sosa-Luna L, Gutiérrez-Corona F (1994). Tolerancia a metales en hongos: mecanismos y aplicaciones. En: la Importancia Biológica de los Iones Inorgánicos. Cervantes C, Saavedra-Molina A y Farías Rodríguez R. (Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p:118-32.
49. **De Filippis LF**, Pallaghy CK (1994). Heavy metals: Sources and biological effects. En: Rai LC, Gaur JP, Soeder CJ, (Eds.). *Advances in Limnology Series Algae and Water Pollution*, Cap. 2, p. 31-77. Schweizerbarts'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
50. **Romieu I**, Palazuelos E, Hernández-Avila M, Ríos C, Muñoz I, Jiménez C, Cahero G, (1994). Sources of lead exposure in México City. *Environ. Health Perspect.* 102:384-89.
51. **Yazgan A**, Ozcengiz G (1994). Subcellular distribution of accumulated heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett* 16:871-74.

52. **Yu** W, Santhanagopalan V, Sewell AK, Jensen LT, Winge DR (1994). Dominance of metallothionein in metal ion buffering in yeast capable of synthesis of (EC)nG isopeptides. *J. Biol. Chem.* 269:21010-15.
53. **Calderón-Salinas** V, Hernández-Luna C, Maldonado M, Saénz D (1993). Mechanisms of the toxic effect of lead. I. Free lead in erythrocyte. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3: 153-64.
54. **Cortes** M, Rivero A, Catalán J (1993). Factores de exposición ambiental y concentraciones de plomo en sangre en niños de la ciudad de México. *Salud Pública de México* 35:599-606.
55. **Díaz-Barriga** F, Santos MA, Mejía JJ, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Vera E, Del Razo LM, Cebrián ME, (1993), Arsenic and cadmium absorption in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, México. *Environ. Res.* 62:242-50.
56. **Burgastaller** W, Strasser H, Wobking H, Schinner F (1992). Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*. Bioreactor leaching and stoichiometry. *Environ. Sci. Tech.* 26:340-46.
57. **Cairs** J, Niederlehner R, Orvos DR (1992). Predicting risk in the ecosystems. Princeton Scientific Pub. Co. Princeton, N.J. p. 347.
58. **Couillard** D, Zhu S (1992). Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge for agricultural application. *Water Air Soil Pollut.* 63:67-80.
59. **Juste** C, Mench M (1992). Long-term application of sewage sludge and its effects on metal uptake by crops. En: *Biogeochemistry of trace metals: Advances in trace substances Research*, Lewis, Boca Ratón, FL. P. 159-193 Karniski LP (1992). Hg^{2+} and Cu^+ are ionophores, mediating Cl^-/OH^- exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 26:19218-25.

60. **Karniski** LP (1992). Hg⁺² and Cu⁺ are ionophores, mediating Cl⁻/OH⁻ exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 26:19218-25.
61. **Kneer** R, Kutcheon TM, Hochberger A, Zenk MH (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157:305-10.
62. **Kneer** R, Kutchan TM, Hochberger A, Zenk MH (1992). *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157:305-10.
63. **Mullen** MD, Wolf DC, Beveridge TJ, Bailey, GW (1992). Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24:129-35.
64. **Winkelmann** G (1992). Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycol. Res.* 96:529-34.
65. **Atal** N, Sradhi PP, Monhanty L (1991). Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium. Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Physiol.* 32:943-51.
66. **Brunzl** K, Schimmack W (1991). Kinetics of the sorption of ¹³⁷Cs, ⁸⁵Sr, ³⁷Co, ⁶⁵Zn and ¹⁰⁹Cd by the organic horizons of a forest soil. *Radiochimica Acta* 54:97-102.
67. **Dameron** CT, Winge DR, George GN, Sansone M, Hu S, Hamer D (1991). A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:6127-131.
68. **Díaz-Barriga** F (1991). Principios de la toxicidad del cadmio. *Ciencia y Desarrollo.* 17:61-8.
69. **Jeyaprakash** A, Welch JW, Fogel S (1991). Multicopy CUP1 plasmids enhance cadmium and copper resistance levels in yeast. *Mol. Gen Genet.* 225:368-8.

70. **Menhra** RK, Winge DR (1991). Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their related expression. *J. Cell. Biochem.* 45:30-40.
71. **Wakatsuki** T, Hayakawa S, Hatayama T, Kitamura T, Imahara H (1991a). Solubilization and properties of copper reducing enzyme systems from the yeast cell surface in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72:79-86.
72. **Wakatsuki** T, Kayakawa S, Hatayama T, Kitamura T, Imahara H (1991b). Purification and some properties of copper reductase from cell surface of *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72:158:61.
73. **Yannai** S, Berdicevski Y, Duek LL (1991). Transformations of inorganic mercury by *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.* 57:245-47.
74. **Zhou** P, Thiele DJ (1991). Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6112-16.
75. **Ehrlich** HL (1990). Geomicrobiology. 2a. Edición. Marcel Dekker, Nueva York.
76. **Kone** BC, Brenner RM, Gullans SR (1990). Sulphydryl/reactive heavy metals increase cell membrane K⁺ and Ca²⁺ transport in renal proximal tubule. *J. Membrane Biol.* 113:1-12.
77. **Peberdy** JF (1990). Fungal cell walls a review. En: *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (Kuhn Pj, Trici APJ, Jung MJ, coosey MUU, Copper LE, Eds.) Springer-Verlag, Berlin, p:5-30.
78. **Rausch** EW (1990). Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:61-86.
79. **Steffens** JC (1990). The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 41:553-75.
80. **Singlenton** Y, Wainwright M, Edyvean RGT (1990). Some factors influencing the adsorption of particulates by fungal mycelium. *Biorecovery* 1:271-89.

81. **Tobin JM**, Cooper DG, Neufeld RJ (1990). Investigation of the mechanism of metal uptake by denatured *Rhizopus arrhizus* biomass. Enzyme Microb. Technol. 12:591-95.
82. **Verkleij JAC**, Schat H (1990). Mechanisms of metal tolerance in higher plants. En: Shaw AT, Ed. Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 8:105-18.
83. **Diaz-Barriga F**, Carrazales L, Yáñez L, Hernández JM, Domínguez MC, Palmer E, Saborío JL, (1989). Interaction of cadmium with actin microfilaments in vitro. Toxicol, Vitro 3:277-84.
84. **Gekeler W**, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989). Survey of the plant kingdom for the ability.
85. **Sczypka M**, Thiele DJ (1989). A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. Mol. Cell. Biol. 9:421-9.
86. **Venkateswerly G**, Yoder MJ, Stotzky G (1989). Morphological, ultrastructural and chemical changes induced in *Cunninghamella blakesleeana* by copper and cobalt. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:204-10.
87. **Welch J**, Fogels S, Buchman C, Karin M (1989). The *CUP2* gene, coding for yeast metallothionein. EMBOJ.8:255-60.
88. **Brock TD**, Madigan MT (1988). Biology of microorganisms: 59 Edición p: 641-44. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
89. **Gekeler W**, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988). Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150:197-202.
90. **Kögi JHR**, Schäffer A (1988). Biochemistry of metallothionein. Biochemistry 27:8509-15.

91. **Nriagu JOO**, Pacyna JM (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-39.
92. **Ono B-I**, Ohue H, Ishihara F (1988). Role of cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Hg^{2+} . *J. Bacteriol.* 170:5877-82.
93. **Tomsett AB**, Thurman DA (1988). Molecular biology of metal tolerance of plants. *Plant Cell Environ.* 11:383-94.
94. **Wakatsuki T**, Iba A, Imahara H (1998). Copper reduction by yeast cell wall materials and its role o copper uptake in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Technol.* 66:257-65.
95. **Adjimani JP**, Emery T (1987). Iron uptake in *Mycelia sterilia* EP-76. *J. Bacteriol.* 169:3664-8.
96. **Galvao LAC**, Corey G (1987a). Cadmio. Serie Vigilancia No.4 Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Estado de México.
97. **Galvao LAC**, Corey G (1987b). Cromo Serie Vigilancia No. 5.
98. **Galvao LAC**, Corey G (1987c). Mercurio. Serie Vigilancia No. 7.
99. **Germann UA**, Lerch K (1987). Copper accumulation in the cell-wall-deficient slime variant of *Neurospora crassa*. Comparison with a wild-type strain. *Biochem. J.* 245:479-84.
100. **Miura K**, Imura N. (1987). Mechanisms of methyl mercury cytotoxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 18:161-89.
101. **Sauerbeck DR** (1987). Effects of agricultural practices on the physical, chemical and biological properties of soils: Part II. Use of sewage sludge and agricultural wastes. En: *Scientific Basis for Soil protection in the European Community*. Elsevier Applied Science, Londres. p:181-210.
102. **White C**, Gadd GM (1987a). The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:727-37.

103. **Gaad** GM and Edwards SW (1986). Heavy-metal-induced flavin production by *Debaromyces hansenii* and possible connections with iron metabolism. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87:533-42.
104. **Gaad** GM (1986a). The responses of fungi towards heavy metals. En: *Microbes in Extreme Environments*. Academica Press, Londres. p:83-110.
105. **Gaad** GM (1986b). The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. En: *Immobilization of Ions by Biosorption*. Chichester: Ellis Horwood Ltd, p:135-147.
106. **Gorman** JA, Clark PE, Lee MC, Debouck C, Rosenberg M (1986). Regulation of the yeast metallothionein gene. *Gene* 48:13-22.
107. **Grill** E, Gekeler W, Winnacker EL, Zenk MH (1986). Homophytocochelin are heavy metal-binding peptides of homoglutathione. *FEBS Lett.* 205:47-50.
108. **Schönborn** W (1986), Historical development and ecological fundamentals. P. 23. En: W. Schönborn (Ed). *Microbial Degradations. Biotechnology*. Vol. 8. VCH. Weinheim, Alemania.
109. **Thiele** DJ, Walling MJ, Hamer DH (1986). Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science* 231:854-6.
110. **Trevors** JT, Stratton GW, Gadd GM (1986). Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-64.
111. **Ventakeswarly** G, Stotzky G (1986). Copper and cobalt alter the cell wall-composition of *Cunninghamella blakesleeana*. *Can. J. Microbiol.* 32:654-62.
112. **Wainwright** Y, Grayston SJ, De Jong PM (1986). Adsorption of insoluble compounds by mycelium of the fungus *Mucor flavus*. *Enzyme Microb. Technol.* 8:597-600.
113. **Karin** M (1985). Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* 41:9-10.

114. **Minney** SF, Quirk AV (1985). Growth and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* at different cadmium concentrations. *Microbios* 42:37-44.
115. **Chao** SH, Suzuki Y, Zysk JR, Cheung WY (1984). Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol. Pharmacol.* 26:75-82.
116. **Gadd** GM (1984). Effect of copper on *Aureobasidium pullulans* in solid medium: adaptation not necessary for tolerant behaviour. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82:546-9.
117. **Motohiro** F, Sunao Y, Soso T (1983). Distribution of copper in the cells of heavy metal tolerant fungus, *Penicillium ochro-chlorom*, cultured in concentrated copper medium. *Agric. Biol. Chem.* 47:1367-69.
118. **Subramanyam** C, Venkateswerlu G, Rao SLN (1983). Cell wall composition of *Neurospora crassa* under conditions of copper toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:585-90.
119. **Babich** H, Schiffenbauer M, Stotzky G (1982). Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28:452-57.
120. **Fogel** S, Welch JW (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:5342-6.
121. **Foulkes** EC (1982). Biological Roles of Metallothionein. Elsevier, Nueva York, N.Y.
122. **De Filippis** LF, Hamp R, Zeigler H (1981b). The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. *Arch. Microbiol.* 128:407-11.
123. **Gómez-Arroyo** S, Altamirano M, Villalobos-Pietrini R (1981). Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 90:425-31.

124. **Gutknecht** J (1981). Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *J. Memb. Biol.* 61:61-6.
125. **Stradberg** GW, Shumate SE, Parrot JR (1981). Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:237-45.
126. **Farrah** H, Pickering WF (1978). The effect of pH and ligands on the sorption of heavy metals ions by cellulose. *Aust. J. Chem.* 31:1501-9.
127. **Gaad** GM, Griffiths AJ (1978). Microorganism and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4:303-17.
128. **Bryan** GW (1976). Heavy metal contamination in the sea. En: Johnston, R (ed.) *Marine Pollution*. Academic Press, Londres. p:185-302.
129. **Goldsmith** CD, Jr Scalon PF, Pirie WR (1976). Lead concentrations in soil and vegetation associated highways of different traffic densities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16:66-70.
130. **Ross** IS (1975). Some effects of heavy metals on fungal cells. *Tras. Brit. Mycol.Soc.* 64:175-193.
131. **Bazzas** MB, Govindjee (1974). Effects of cadmium nitrate an spectral characteristics and light reactions of chloplasts. *Environ. Lett.* 6:1-12.
132. **Bittel** JE, Koeppe DE, Miller JR (1974). Sorption of heavy metal cations by corn mitochondria and the effects on electron ad energy transfer reactions. *Physiol. Plant.* 30:226-30.
133. **Lindegren** CC, Lindegren G (1973). Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. *Mutation Res.* 21:315-21.

134. **Vonk JW**, Sijpesteijn AK (1973). Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 39:505-13.
135. **Valle BL**, Ulmer DD (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128.
136. **Lagerwerff JV**, Specht AW (1970). Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead and zinc. *Environ. Sci. Technol.* 4:583-6.
137. **Bartnicki-Garcías S** (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:64-108.
138. **Fuhrmann R**, Tothstein H (1968). The transplant of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} , into yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 163:325-30.
139. **Emerson S** (1963). 'Slime' a plasmodioid variant of *Neurospora crassa*. *Genética* 34:162-82.
140. **Somers E** (1963). The uptake of copper by fungal cells. *Ann. Appl. Biol.* 51:425-37.
141. **Gläss E** (1956). Untersuchungen über die Einwirkung von schwermetallsalzen auf die Wurzelpitzenmitose von *Vicia faba*. *Bot.* 44:1-58.
142. **Horsfall JG** (1956). Principles of Fungicidal Action. Waltham, Massachusetts: Crónica Botanica.
143. **Brenes-Pomales A**, Lindengren G, Lindengren CC (1955). Gene control of copper sensitivity in *Saccharomyces*. *Nature* 136:841-2.

