

Artículo de revision crítica

Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances

**Cintia Elizabeth Paisio^{*}, Paola Solange González, Melina Andrea Talano
y Elizabeth Agostini**

Departamento de Biología Molecular, FCEFQN, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601.
C.P. 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Teléfono: 54-358-4676537; Fax: 54-358-4676232.

^{*}Autor de correspondencia (cpaisio@exa.unrc.edu.ar)

Resumen

El mercurio (Hg) es un metal pesado altamente tóxico, que amenaza a la salud humana y al medioambiente. Se encuentra en la naturaleza en formas inorgánicas y orgánicas siendo todas tóxicas, especialmente la última debido a su alta liposolubilidad, lo que facilita su biomagnificación en la cadena trófica. Debido al alto riesgo que representan los ambientes contaminados con Hg, surge la necesidad de tratarlos de manera efectiva, lo cual se puede realizar utilizando estrategias de saneamiento ambiental tales como la remediación biológica, que comprende a la bio-, fico-, fito- y rizorremediación. Así, el objetivo del presente trabajo fue revisar los principales aspectos concernientes a la remediación biológica de Hg, poniendo énfasis en los avances más recientes, con el fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en la misma y los aspectos que aún necesitan ser investigados. De este modo, en esta revisión se describen los diferentes mecanismos y la capacidad de remoción de Hg y metilmercurio (MeHg) por bacterias, hongos, algas, plantas y microorganismos rizosféricos. También se describen los resultados logrados con plantas transgénicas obtenidas para mejorar el proceso de remoción de este metal. Desde hace décadas se han desarrollado numerosas investigaciones que involucran a la biorremediación bacteriana y a la fitorremediación de Hg. Sin embargo, la aplicación de hongos y algas para este fin constituyen áreas menos exploradas. Más recientemente, se están estudiando nuevas áreas dentro de la remediación biológica de Hg, como la rizorremediación y el uso de plantas transgénicas, las cuales necesitan ser más estudiadas con el objetivo de explotar aún más su potencial biotecnológico. Por otra parte, se sugiere profundizar los aspectos de aplicación de estos sistemas al tratamiento de efluentes industriales y/o ambientes contaminados con Hg.

Palabras clave: *Mercurio, Metilmercurio, Biorremediación, Ficorremediación, Fitorremediación, Rizorremediación*

Biological remediation of Mercury: Recent advances

Abstract

Mercury (Hg) is a highly toxic heavy metal that threatens human health and environment. It is found naturally as inorganic and organic forms and all are toxic, especially the latter, due to its high lipid solubility, which facilitates their biomagnification in the food chain. Due to the high risks that represent the Hg-contaminated environments, there is a need to efficiently treat them. Among environmental restoration strategies, the biological remediation is a promising technology, which comprises the bio-, phyco-, phyto- and rhizoremediation. Thus, the purpose of this review was to compile the main aspects concerning to biological remediation of Hg, emphasizing the most recent developments, in order to

contribute to the understanding of the mechanisms involved in it and the aspects that still need to be investigated. Thereby, in this review we describe the different mechanisms implicated and the capacity for Hg and methylmercury removal by bacteria, fungi, algae, plants and rhizospheric microorganisms. In addition, it describes the results using transgenic plants, which have been obtained to improve the removal process of this metal. For decades, numerous investigation involving bacterial bioremediation and phytoremediation of Hg have been developed. However, the use of fungi and algae for this purpose are less explored areas. More recently, new areas into the Hg-biological remediation are being studied, such as the rhizoremediation and the use of transgenic plants, which need to be further studied in order to elucidate its biotechnological potential. The application of these systems to treat industrial effluents and/or environments contaminated with Hg is also discussed.

Keywords: *Mercury, Methylmercury, Bioremediation, Phycoremediation, Phytoremediation, Rhizoremediation*

1. Introducción

Los metales pesados, tales como el cadmio (Cd), plomo (Pb), cromo (Cr) y mercurio (Hg), entre otros, son liberados por las actividades industriales y tecnológicas, generando un alto impacto en el medioambiente. En particular, el Hg es un contaminante altamente tóxico y su dispersión en suelo y agua amenaza la salud humana y ambiental (Baldi *et al.*, 2012; Hutchison y Atwood, 2003; Parkash Dhankher *et al.*, 2012).

El Hg se encuentra en la naturaleza en sus formas inorgánicas: elemental (Hg(0)) o iónicas (Hg I y II) y orgánicas: metilmercurio (CH₃Hg) (MeHg), dimetilmercurio [(CH₃)₂Hg] y fenilmercurio (C₆H₅Hg). El Hg(II) tiende a unirse fuertemente a los componentes del suelo, lo cual reduce su biodisponibilidad. Las formas orgánicas de este metal pesado, principalmente el MeHg, son altamente tóxicas y se acumulan en membranas biológicas. Este compuesto es el más peligroso para los humanos y otros organismos, debido a su alto poder de biomagnificación. Una vez en el medioambiente, el Hg(0) se oxida a Hg iónico, el cual se deposita eficientemente en el suelo y/o agua y es convertido en MeHg por bacterias anaeróbicas reductoras de sulfuro. En ambientes acuáticos, estas bacterias contaminadas con MeHg son consumidas por protozoos y a su vez éstos por pequeños invertebrados; los invertebrados por peces y

finalmente éstos son consumidos por aves acuáticas y los humanos en el mayor nivel de la cadena alimenticia. Así, el consumo de peces y otros alimentos de origen marino constituye la principal fuente de Hg para la dieta humana (Le Jeune *et al.*, 2012; Parkash Dhankher *et al.*, 2012).

El Hg puede ser encontrado en el medioambiente a partir de diversas fuentes de procedencia, incluyendo fuentes naturales y antropogénicas. Su deposición natural en suelos puede provenir de la meteorización de rocas, de eventos volcánicos y actividad geotérmica, encontrándose en ellos en concentraciones entre 0.03 y 0.1 mg/Kg (Wang *et al.*, 2012). Respecto de las fuentes de procedencia antropogénicas, las actividades mineras son una de las principales vías de ingreso directo de Hg dentro del ambiente, particularmente las de explotación de oro, plata y Hg. En estos sitios, el suelo puede llegar a estar muy contaminado. Ejemplos de esto lo constituyen la región del río Amazonas, la Guayana Francesa y el distrito minero de Almadén (España), entre otros (Fréry *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2006). Si bien el Hg y sus compuestos derivados han sido usados históricamente con propósitos industriales, medicinales y cosméticos, en la actualidad se han añadido otros usos, que incluyen la producción de cloro-álcali, cables e interruptores eléctricos, en iluminación y en odontología. Por lo tanto, estas actividades también son responsables de la presencia de

grandes cantidades de Hg en el medioambiente (Rodríguez *et al.*, 2012).

Una vez que el Hg se ha depositado en el ambiente se incrementa el riesgo de exposición e intoxicación de seres vivos. En este sentido, se han registrado varios eventos de envenenamiento de personas e inclusive la muerte de las mismas. Por ejemplo, el incidente de la bahía de Minimata en 1956, que se produjo como consecuencia del consumo de peces contaminados con Hg debido a vertidos de efluentes conteniendo MeHg de industrias químicas. Otro ejemplo de la vulnerabilidad que posee la población humana ante la exposición a Hg, es el consumo de granos o plantas contaminadas con este metal. Las plantas pueden tomar el Hg del suelo y acumularlo en sus tejidos, lo que implica un riesgo debido a su posible transmisión a los animales y seres humanos a través de la cadena alimentaria (Hutchison y Atwood, 2003; Peralta-Videla *et al.*, 2009). Al respecto, algunos autores han demostrado la presencia de Hg en plantas cultivables que crecen en suelos contaminados con este metal (Cheng *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2009).

Diversos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de conocer en profundidad los efectos tóxicos que produce el Hg y sus derivados en los seres vivos. Así, Jan *et al.* (2009) realizaron una revisión extensa sobre la toxicidad del Hg, en la cual describen que sus efectos adversos en un organismo dependen del estado químico del Hg, del tiempo y tipo de exposición. La toxicidad del Hg orgánico se debe a su liposolubilidad, que le permite atravesar membranas tales como las placentarias y la hematoencefálica con facilidad, mientras que el Hg inorgánico se transporta a través de las membranas utilizando ciertas proteínas. Ambas formas del Hg tienen afinidad por los grupos tiol (-SH) de las enzimas y proteínas, resultando en su inactivación y la consecuente interrupción de las actividades celulares normales. Producen daño bioquímico a los tejidos y al ADN mediante la alteración de la homeostasis del calcio intracelular, el potencial de membrana,

modificando los procesos de síntesis e interrumpiendo las vías excitatorias del sistema nervioso central. Todos estos daños resultan en irritabilidad, pérdida de la sensibilidad en las extremidades, dificultades en la visión y la audición, temblores, daño renal y, eventualmente, la muerte. Del mismo modo, Wang *et al.* (2012) resumieron los efectos tóxicos del Hg sobre las plantas, indicando que éstos incluyen la alteración del sistema antioxidante y de la fotosíntesis e inhibición del crecimiento, consumo de nutrientes, homeostasis en general y disminución del rendimiento de las plantas.

De lo anteriormente expuesto surge la necesidad de tratar los sitios contaminados con Hg para evitar riesgos en el ambiente y en la salud de los seres vivos. En este sentido, el desarrollo de nuevas tecnologías de remediación ambiental es, en la actualidad, un campo de investigación de gran interés.

Existen métodos físico-químicos y biológicos de remoción de Hg de los efluentes industriales y de suelos y aguas contaminadas. Entre los primeros se incluye principalmente a la amalgamación, formación de sulfuros, desorción térmica, vitrificación, lavado de suelos, procesos de encapsulación, estabilización, solidificación, nanotecnología y electro-remediación. Estas estrategias permiten la obtención de buenos resultados si la elección de la tecnología aplicada se realiza de manera adecuada, en función de las características físico-químicas de cada efluente y/o ambiente contaminado (Rodríguez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, estos métodos poseen algunas desventajas, tales como sus altos costos, utilización de grandes cantidades de reactivos y sus efectos adversos sobre los ecosistemas, entre otros. De allí la necesidad de aplicar tecnologías de remediación más eficientes y ambientalmente “amigables”, como los métodos de remediación biológica, los cuales utilizan organismos vivos para reducir, eliminar, contener o transformar los contaminantes en suelo, agua y aire (Gerhardt *et al.*, 2009). Los organismos utilizados en esta

tecnología pueden ser bacterias y hongos (biorremediación), algas (ficorremediación) o plantas (fitorremediación). Más recientemente, ha emergido la rizorremediación como una tecnología alternativa que implica la acción conjunta de microorganismos rizosféricos y plantas. La Figura 1 muestra un esquema de las mencionadas estrategias y las más recientes y/o destacadas investigaciones que contribuyen al

desarrollo y conocimiento del metabolismo y remoción de Hg.

Así, el objetivo del presente trabajo fue revisar los principales aspectos concernientes a la remediación biológica de Hg, enfatizando los avances más recientes, con el fin de contribuir a profundizar el conocimiento de los mecanismos implicados en la misma y poner en evidencia los aspectos que aún necesitan ser investigados.

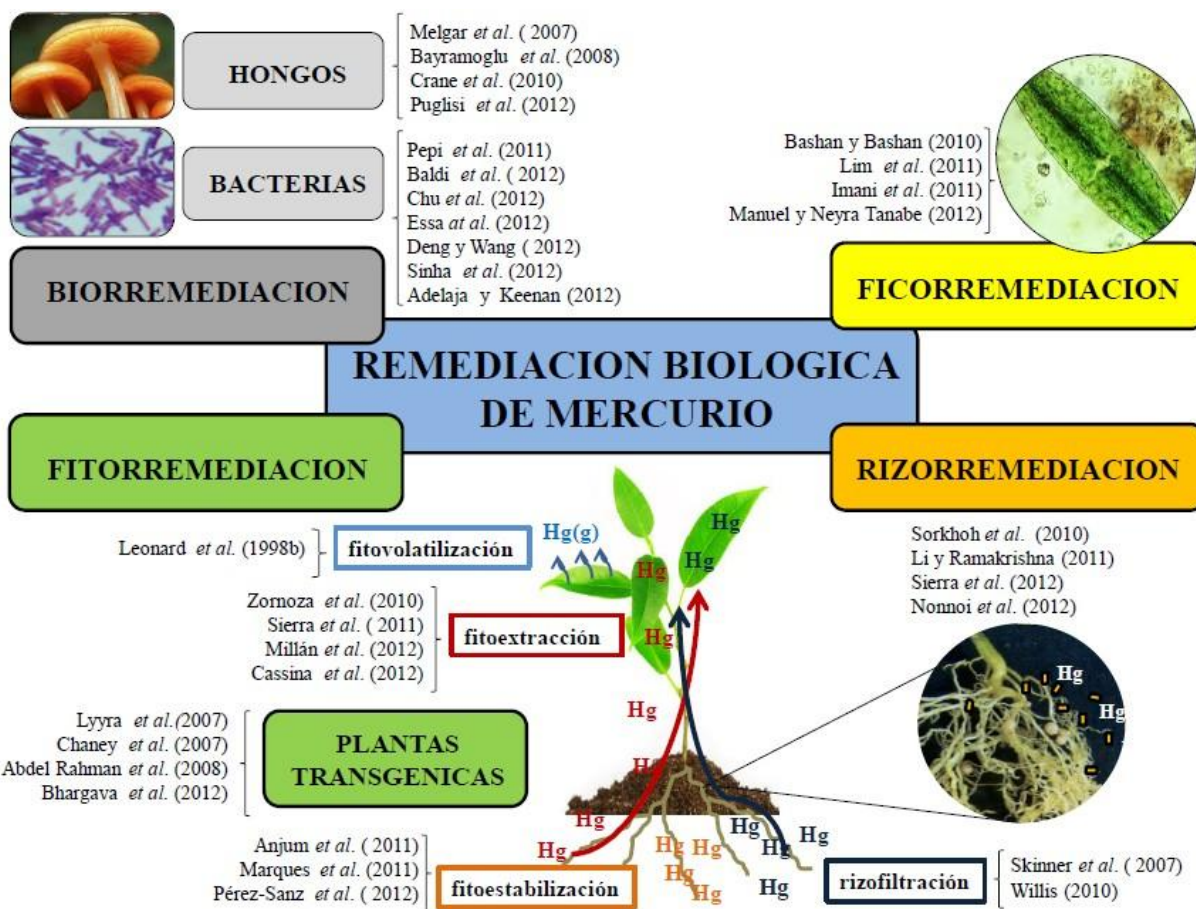


Figura 1. Esquema de las estrategias de remediación biológica de Hg y las más recientes y/o destacadas investigaciones que contribuyen al desarrollo y conocimiento del metabolismo y remoción del metal.

2. Biorremediación de mercurio

2.1 Utilización de bacterias para la remediación de mercurio

2.1.1 Reducción enzimática de mercurio

La presión selectiva ejercida por los ambientes contaminados con metales ha llevado al desarrollo de sistemas de resistencia

microbianos, hipotéticamente, para todos los metales tóxicos, entre ellos el Hg (Rouch *et al.*, 1995). El mecanismo de resistencia más ampliamente descrito para este metal se basa en la presencia de grupos de genes organizados en un único operón, denominado “operón *mer*”, que permite la detoxificación enzimática del

metal. Estos mecanismos han sido estudiados en profundidad desde la década del '60. Desde entonces, se publicaron una gran cantidad de trabajos en los que se describe la organización y la expresión de este operón (Novick y Roth, 1968; Schaefer *et al.*, 2002; Nascimento y Chartone-Souza, 2003; Barkay *et al.*, 2003).

La estructura del operón *mer* varía entre las distintas especies bacterianas, encontrándose dos tipos de operones: de espectro reducido (confiere resistencia a Hg inorgánico) y de espectro amplio (confiere resistencia a Hg inorgánico y orgánico). En conjunto, estos genes codifican para una serie de enzimas que pueden demetilar el Hg orgánico a Hg

inorgánico, y reducir el Hg inorgánico a Hg(0), el cual es menos tóxico y se puede liberar al medioambiente debido a su alta volatilidad.

El operón *mer* está constituido por genes que codifican para proteínas asociadas con varias funciones, tales como regulación, transporte y reducción. La mayoría de los operones de resistencia a Hg son inducibles y se hallan bajo un control regulatorio a nivel transcripcional, tanto positiva como negativamente (Hutchison y Atwood, 2003; Jan *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2011). La Figura 2 muestra un esquema de la organización general de un operón *mer* de amplio espectro en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

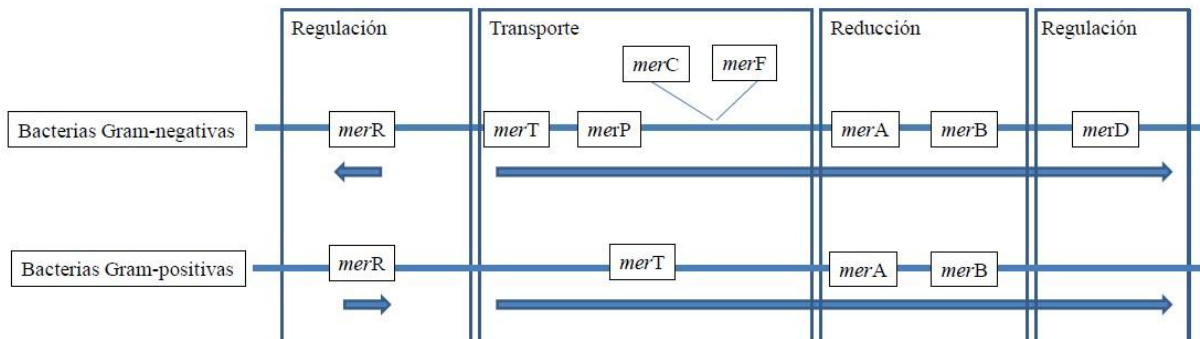


Figura 2. Organización general de un operón *mer* de amplio espectro en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las flechas indican el sentido de transcripción.

La región más estudiada del operón *mer*, consiste en el gen *mer R*, que codifica para una proteína metalo-regulatoria, la cual se une a la región del operador/promotor del operón, regulando la expresión de los genes estructurales (Parkhill y Brown, 1990; Iohara *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2010). El gen *merR* se transcribe por separado y en dirección opuesta con respecto a otros genes estructurales del operón (Lund y Brown, 1989). La excepción a esta circuito regulador común del operón *mer* es proporcionado por el gen *merR* del plásmido pI258 de *Staphylococcus aureus* y RC607 de *Bacillus* sp., ambas bacterias Gram-positivas, donde éste se transcribe en la misma dirección que otros genes estructurales (Wang *et al.* 1989). La proteína Mer R activa la transcripción de los genes estructurales en

presencia de Hg y la reprime en ausencia del mismo. Por otra parte, el gen *mer D* codifica para una proteína regulatoria secundaria que se co-transcribe junto con los genes estructurales. La proteína Mer D regula al operón *mer* uniéndose a la misma región del operador/promotor que Mer R y parece ser un antagonista de la función de Mer R (Mukhopadhyay *et al.*, 1991).

El ingreso de Hg (II) hacia el interior de la célula, se considera un paso limitante de los mecanismos de resistencia a este contaminante. Los genes estructurales implicados en el transporte del Hg iónico se encuentran detrás del sitio operador/promotor. Todos los operones *mer* descritos hasta el momento poseen los genes *mer T* y *mer P*, los cuales son estrictamente necesarios para la expresión

completa del operón *mer*. La proteína Mer P se localiza en el periplasma celular y posee residuos cisteína a los cuales se une el Hg (II), luego éste se transfiere a los residuos cisteína de la proteína Mer T, localizada en la membrana celular. Finalmente, el Hg (II) es transferido a grupos -SH de la enzima mercurio reductasa codificada por el gen *mer A*. Mer C y Mer F son proteínas de unión a membrana y actúan como proteínas transportadoras de Hg (II), colaborando con el transporte de este ión hacia la enzima mercurio reductasa. Sin embargo, la vía de ingreso Mer P-Mer T es más eficiente que la Mer C-Mer F (Hamlett *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 2000).

El gen *mer A*, codifica para la enzima mercurio reductasa, y *mer B*, codifica para una enzima organomercurial liasa. La proteína Mer A es una flavoproteína con dos residuos de cisteínas adicionales, que cataliza la reducción de Hg(II) a Hg(0) a expensas de NADPH. La detoxificación de Hg orgánico requiere la separación del Hg del residuo orgánico de la molécula, lo cual es producido por la enzima organomercurial liasa. El producto de la acción de esta enzima es un aducto tiolato-mercurio, el cual es sustrato luego para la enzima mercurio reductasa (Robinson y Tuovinen, 1984; Boyd y Barkay, 2012; Essa, 2012). Otros genes que codifican para resistencia a organomercuriales han sido identificados y designados como *mer G* y *mer E*, determinándose que se hallan implicados en el transporte hacia el interior celular (Kiyono y Pan-Hou, 1999; Kiyono *et al.*, 2009; Sone *et al.*, 2010).

El operón *mer* de bacterias Gram-negativas ha sido más estudiado en comparación con el de bacterias Gram-positivas, aunque se conoce que ambos tienen un conjunto similar de genes *mer* y están dispuestos en orden similar (Fig. 2). Existen pocas diferencias entre ambos tipos de operones *mer*, sin embargo, el gen *merB* es más común en bacterias Gram-negativas que en Gram-positivas (Barkay *et al.*, 2003). Ambos tipos de bacterias poseen dos o más operones *mer*, un locus de espectro amplio y uno de espectro reducido, algunas veces localizados en el mismo plásmido. Además, el operón es altamente conservado entre estas bacterias, sugiriendo así un origen evolutivo común (Barkay *et al.*, 2003; Boyd y Barkay, 2012). Sin embargo, Freedman *et al.* (2012) demostraron que la expresión del operón *mer* en bacterias acuíficas, cuyo hábitat natural son ambientes geotermales ricos en este metal, fue independiente de la presencia de Hg(II), por lo que indicaron que la expresión regulada de *mer* fue probablemente una innovación posterior en ambientes donde los microorganismos se expusieron de forma intermitente a concentraciones tóxicas de Hg.

En función de lo anteriormente expuesto, se puede inferir que las bacterias reductoras de Hg y MeHg, representan una herramienta valiosa para la remediación de sitios contaminados con este metal. En la literatura se encuentran disponibles una diversidad de trabajos sobre bacterias con capacidad de reducir enzimáticamente el Hg inorgánico, que avalan esta hipótesis (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes microorganismos (bacterias, hongos y algas) implicados en la remoción de Hg y compuestos derivados.

Microorganismos	Compuesto	Referencia
<i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i>	Hg orgánico e inorgánico	Pepi <i>et al.</i> (2011)
<i>P. balearica</i>	MeHg	Lee <i>et al.</i> (2012)
<i>P. putida</i> V1	MeHg	Cabral <i>et al.</i> (2012)
<i>P. fluorescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter braakii</i> y <i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i>	MeHg	Adelaja y Keenan (2012)
<i>Pseudomonas</i>	Hg(II)	Wagner-Döbler (2003)

<i>P. putida</i> spi3	Tiomersal	Fortunato <i>et al.</i> (2005)
<i>Enterobacter</i> sp.	Hg(II)	Sinha y Khare (2012)
Conjunto de bacterias y algas	Hg(II)	Malakahmad <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus cereus</i>	Hg(II)	Sinha <i>et al.</i> (2012)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hg(II), MeHg y etilmercurio	Saglam <i>et al.</i> (1999)
<i>Agaricus macrosporus</i>	Hg(II)	Melgar <i>et al.</i> (2007)
<i>Lentinus edodes</i>	Hg(II)	Bayramoglu <i>et al.</i> (2008)
Hongos micorrízicos	Hg	Crane <i>et al.</i> (2010)
<i>Trichoderma</i>	Hg	Raspanti <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Oscillatoria</i>	Hg	Manuel y Neyra Tanabe (2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella emersonii</i>	Hg(II)	Bayramoğlu <i>et al.</i> (2006)
<i>Dunaliella</i>	Hg(II)	Imani <i>et al.</i> (2011)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Hg	Lim <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 2AMT-2, transgénica	Hg(II)	He <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella</i> sp. DT transgénica	Hg(II)	Huang <i>et al.</i> (2006)

Fundamentalmente, estos trabajos se han desarrollado con el objetivo de remover Hg de medios de cultivos sintéticos líquidos con alta eficiencia, utilizando diversas especies bacterianas (Chang *et al.*, 1998; Fantozzi *et al.*, 2009; Sánchez Dávila y Hurtado Custodio, 2009; Baldi *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2012; Essa, 2012). En este sentido, Pepi *et al.* (2011) publicaron un trabajo innovador en el que utilizaron bacterias con capacidad de producir biofilms, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Psychrobacter*, tanto libres como inmovilizadas en una matriz de piedra pómez, para volatilizar Hg orgánico e inorgánico con alta eficiencia (hasta 190 ng/mL en 5 min). Respecto de la remoción de MeHg, la mayoría de los trabajos disponibles se centran en los mecanismos enzimáticos anteriormente descritos. Al respecto, Lee *et al.* (2012) describieron que *Pseudomonas balearica* redujo un 97% de MeHg (20 µg/L) en 3 h mientras que Cabral *et al.* (2012) indicaron que *Pseudomonas putida* V1 volatilizó un 77% de MeHg (2,5 µM), en sólo 24 h. Un aporte reciente al conocimiento de los mecanismos de detoxificación bacteriana de MeHg fue realizado por Adelaja y Keenan (2012), quienes informaron por primera vez que cepas de

Pseudomonas fluorescens, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii* y *Alcaligenes faecalis* utilizan MeHg como única fuente de carbono y energía.

2.1.2 Otros mecanismos de tolerancia/resistencia bacteriana a mercurio

Además de la conversión enzimática de los metales a formas menos tóxicas o volátiles, se han descrito otros mecanismos de tolerancia a diversos metales pesados, entre los que se incluyen la precipitación de los mismos con fosfatos, carbonatos y/o sulfuros; la exclusión física de los componentes electronegativos en membranas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS); sistemas de eflujo de metal dependientes de energía; y el secuestro intracelular con proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína (Silver, 1996; Mathema *et al.*, 2011). Sin embargo, respecto del Hg, no se conocen claramente los mecanismos de resistencia bacterianos, exceptuando a los determinados por el operón *mer*. Aunque es posible hallar en la bibliografía algunas referencias al respecto (Tabla 1). Debido al riesgo que implica que el Hg se recicle e ingrese de nuevo al medioambiente después de su volatilización enzimática,

algunos investigadores han manifestado que la acumulación o secuestro intracelular del mismo sería un proceso de remoción más adecuado. En este sentido, Sinha y Khare (2010) notificaron un novedoso mecanismo de secuestro intracelular de Hg en algunas cepas de *Enterobacter* sp., las cuales bioacumularon el metal en forma de nanopartículas de 2-5 nm.

Respecto de la adsorción de Hg a EPS bacterianos y la precipitación como mecanismos de biorremediación, se han publicado diversos trabajos (Hiltemann *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2010; Baldi *et al.*, 2012). En este sentido, François *et al.* (2012), determinaron que la producción de EPS, en mayor medida, como así también la precipitación de Hg(II) con compuestos sulfurados u organosulfurados, serían los principales mecanismos de secuestro de Hg iónico, en algunas bacterias aisladas de ambientes contaminados con metales, las cuales no poseen/expresan el operón *mer*. Asimismo, De *et al.* (2008) aislaron varias cepas bacterianas marinas con habilidad de remover Hg mediante reducción enzimática y adsorción a EPS.

En las últimas décadas, se han llevado a cabo numerosos estudios respecto de la utilización de biomasa bacteriana, viva o muerta, como bioadsorbente de diversos metales. Esta estrategia ha emergido como una de las alternativas más promisorias para la remoción de Hg de soluciones acuosas (Chan y Hong, 1994; Green-Ruiz, 2006; Deng y Wang, 2012). En este sentido, Sinha *et al.* (2012), inmovilizaron una cepa de *Bacillus cereus* en alginato de calcio, con la cual obtuvieron elevadas eficiencias de remoción de Hg(II) a través de bioadsorción a la biomasa bacteriana (80% de remoción de 20 mg/L iniciales de Hg(II), en 120 h), tanto en ensayos en batch como en sistemas continuos.

Otros mecanismos de tolerancia a Hg han sido descritos por Janssen *et al.* (2010) y Rojas *et al.* (2011), quienes manifestaron que cepas de *Cupriavidus metallidurans* contuvieron gránulos de polihidroxibutirato (PHB) después

de la exposición a Hg, indicando que las mismas contienen genes para la síntesis de PHB, los cuales se expresan para tolerar el estrés generado por el metal. De modo similar, algunas funciones celulares normales, tal es el caso de la actividad del glutatión reducido y las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, pueden conferir resistencia a los microorganismos ante Hg (Gachhui *et al.*, 1991; Lenártová *et al.*, 1998). Asimismo, otro mecanismo fue descrito por Baldi *et al.* (1993), quienes indicaron que cepas de *Desulfovibrio desulfuricans* fueron resistentes a altas concentraciones de MeHg a través de la producción de sulfuro de dimetilmercurio, el cual se volatiliza finalmente como dimetilmercurio y metano.

2.1.3 Biorremediación bacteriana de aguas residuales contaminadas con mercurio

Aunque las investigaciones referidas al uso de bacterias para remediar soluciones sintéticas son abundantes, como se demostró anteriormente, el tratamiento biológico de aguas residuales industriales contaminadas con Hg se ha probado en un número limitado de investigaciones (Tabla 1). Wagner-Döbler (2003), resume los resultados obtenidos después de dos años de trabajo en una planta piloto construida para tratar efluentes de una industria de electrólisis de cloro-álcali de la República Checa. En este trabajo se utilizó un biorreactor de lecho empacado con una capacidad para tratar 100 m³ de efluente por día (conteniendo entre 2 y 10 mg/L de Hg), que operó de manera continua durante 8 meses con excelentes resultados. Este biorreactor se inoculó con un biofilm bacteriano, conformado por siete cepas de *Pseudomonas* inmovilizadas en piedra pómez, que posee la capacidad de reducir Hg(II). La optimización de este sistema implicó el ensayo de diversas condiciones de cultivo, matrices de inmovilización, tipos de biofilms y condiciones de operación del biorreactor (Wagner-Döbler, 2003, y citas en este trabajo).

Por otra parte, Fortunato *et al.* (2005), evaluaron la capacidad de *Pseudomonas putida* spi3 para remover tiomersal (compuesto organomercurial) de un efluente de una industria de producción de vacunas pudiendo observar que los microorganismos removieron un elevado porcentaje del compuesto. Por su parte, Sinha y Khare (2012) inmovilizaron una cepa de *Enterobacter* con capacidad de acumular Hg, para remediar un efluente industrial recolectado en la India, el cual se suplementó con 7,3 mg/L del metal, obteniéndose 100% de remoción después de 72 h de cultivo. Esta bacteria fue capaz de bioacumular Hg(II), el cual se mantuvo confinado dentro de las células sin observarse volatilización del mismo, lo que aportó la posibilidad de recuperar el mismo después del proceso de biorremediación. Malakahmad *et al.* (2011) utilizaron un biorreactor para tratar un efluente sintético de la industria petroquímica, que se inoculó con lodos activados conformados por una mezcla de bacterias y algas, obteniéndose una eficiencia de remoción del 93% para una concentración inicial de 9 mg/L de Hg(II), después de 100 días de cultivo. Los autores sugirieron que esta remoción se produjo no sólo por procesos bioquímicos sino también por procesos de bioadsorción a los lodos.

2.2 Utilización de hongos para la remediación de mercurio

Se ha descrito que los hongos y levaduras también pueden captar metales pesados. Gracias a esta propiedad, los mismos pueden ser usados como métodos alternativos para la remoción de estos compuestos (Price *et al.*, 2001) (Tabla 1). En particular, se ha mencionado que la captura de metales por la biomasa de hongos parece ser un proceso que involucra la acumulación y/o la bioadsorción. Por ejemplo, la superficie celular de las levaduras puede actuar como una resina de intercambio iónico, mientras que las paredes celulares de los hongos tienen un rol principal en la bioadsorción (Hafez *et al.*, 1997). Saglam

et al. (1999) estudiaron la capacidad de bioadsorción de 250 mg/L cloruro de mercurio (Hg(II)), MeHg y etilmercurio de soluciones acuosas, sobre la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium*. Los resultados obtenidos demostraron que la máxima capacidad de bioadsorción varió entre 79 y 61 mg/g peso seco, para los diferentes compuestos. Estos valores fueron superiores a los reportados para otros microorganismos (3-58 mg Hg/g peso seco) (Gadd, 1988). Otros autores estudiaron la remoción de 100 mg/L Hg(II) por células vivas y muertas de *Agaricus macrosporus* a diferentes valores de pH, observando que en todos los casos los porcentajes de remoción utilizando células vivas fue mayor que usando células muertas. Estos autores atribuyen la máxima capacidad de adsorción a las células vivas, al medio de cultivo ácido suplementado con K y P (Melgar *et al.*, 2007). Ya previamente, otros autores habían establecido que la captación de metales pesados por hongos y levaduras, podría estar asociada con la captación y acumulación de fósforo (Kurnst y Roomans, 1985). De manera contraria, Bayramoğlu y Arica (2008) analizaron la remoción de 500 mg/L Hg(II) por células vivas e inactivadas del hongo *Lentinus edodes*. Ellos observaron que las células inactivadas fueron capaces de adsorber mayor concentración de Hg(II) comparadas con las células vivas. La bioadsorción en células vivas podría ser atribuida a ciertos mecanismos externos de acomplejamiento de metales, llevados a cabo por proteínas como las metalotioneínas o fitoquelatinas o bien por el bombeo eficiente de metales por la célula viva.

Por otra parte, Crane *et al.* (2010) estudiaron la acumulación de Hg en diferentes especies de hongos micorrízicos, observando que éstos fueron capaces de incrementar la acumulación del metal mientras mayor fue la concentración y el tiempo de exposición.

Además, se ha establecido que varias especies de *Trichoderma* aislados de zonas contaminadas, fueron capaces de tolerar y acumular diferentes metales pesados, entre ellos

el Hg (Raspanti *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos de tolerancia en hongos todavía no están del todo establecidos. En este sentido, Puglisi *et al.* (2012) han identificado en la cepa *Trichoderma harzianum* IMI 393899, ocho genes expresados diferencialmente en presencia de Hg(II) o Hg(I). Entre los genes identificados, un posible rol en el mecanismo de tolerancia podría deberse a aquellos codificantes para hidrofobinas (proteínas presentes en hongos filamentosos), las que podrían estar implicadas en la captura de Hg en la pared celular, fuera de la célula.

3. Fitorremediación de mercurio

La biotecnología basada en la aplicación de algas para control de contaminación ha sido usada entre otras cosas para la remoción de compuestos inorgánicos, siendo la eliminación de metales pesados de efluentes industriales y aguas residuales domésticas, uno de los principales focos (Oswald, 1988).

Respecto de los mecanismos implicados en este proceso, varios autores han descrito que dicha remediación podría ser llevada a cabo por procesos físico-químicos de adsorción sobre la pared celular (mecanismos de remoción extracelulares) o bien por mecanismos de transporte y precipitación, en los cuales podrían contribuir algunos compuestos secretados, tales como metabolitos celulares y EPS o bien proteínas acomplejantes de iones (Martins *et al.*, 2006) (mecanismos de remoción intracelulares).

Diversos investigadores han estudiado algas con mecanismos de remoción de Hg extracelulares (Tabla 1). Así, Manuel y Neyra Tanabe (2012) observaron que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Oscillatoria* fueron capaces de adsorber Hg (entre un 10-40% de 100 mg/L). Algunos investigadores han estudiado la eliminación de Hg(II) en solución por un sistema de algas inmovilizadas en alginato, tanto en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* como en *Chlorella emersonii*. En

ambas algas inmovilizadas la acumulación de Hg(II) fue mayor que en células libres (Bayramoğlu *et al.*, 2006; Bashan y Bashan, 2010, y citas en este trabajo). Recientemente, Imani *et al.* (2011) estudiaron la capacidad de *Dunaliella*, para tolerar y remover Hg(II), demostrando por primera vez que esta alga toleró y adsorbió 67% de 30 mg/L Hg(II) en una hora.

Entre los mecanismos intracelulares de remoción de metales, se ha descrito la actividad de las metalotioneínas (clase III) (Mt III), las cuales están presentes en más de 11 algas pertenecientes a 6 géneros. La biosíntesis de Mt III puede ser inducida por diferentes metales, entre ellos Hg(II). Sin embargo, en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, el Hg no fue quelado por Mt III pero sí por glutatión, lo cual provee evidencias de la participación de esta molécula en la detoxificación (Howe y Merchant, 1992). Por otro lado, Lim *et al.* (2011) demostraron la capacidad de *Kappaphycus alvarezii* para remediar Hg en ambientes marinos. Después de 5 días de contacto con agua de mar suplementada con 10 mg/L de Hg se observó la acumulación de Hg intracelular, y remoción del contaminante en el medio acuoso, posiblemente debida a mecanismos de intercambio iónico.

La aplicación de organismos genéticamente modificados en la remediación de contaminantes ha recibido una gran atención debido a que éstos poseen mayor capacidad de remoción de una gama de contaminantes, que incluye compuestos clorados, hidrocarburos aromáticos, metales pesados, y sustancias tóxicas no polares, etc (Urgun-Demirtas *et al.*, 2006). En particular, existen antecedentes de algas modificadas genéticamente para la remoción de Hg. He *et al.* (2011) utilizaron el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* 2AMT-2, transgénica para una metalotioneína, combinada con ultrasonido para recuperar efectivamente Hg(II) a partir de sedimentos contaminados. De modo similar, Huang *et al.* (2006) utilizaron la microalga *Chlorella* sp. DT, transformada con el gen *merA* de *Bacillus*

megaterium MB1, para eliminar Hg(II). Las cepas transgénicas mostraron una mayor capacidad de eliminar el contaminante, mayor tasa de crecimiento y actividad fotosintética y menor expresión de la enzima superóxido dismutasa, que el tipo salvaje.

4. Fitorremediación de mercurio

La fitorremediación involucra el uso de plantas, naturales o modificadas genéticamente, para remover diversos contaminantes del suelo y/o aguas. Esta estrategia de remediación consiste en cuatro diferentes tecnologías para la remediación de suelos, sedimentos o agua contaminados con metales, cada una con un mecanismo de acción diferente (Vara Prasad y

Oliveira Freitas, 2003). Estas incluyen: a) Rizofiltración, que implica el uso de plantas para remediar diversos ambientes acuáticos; b) Fitoestabilización, donde las plantas se utilizan para estabilizar los contaminantes en el suelo más que para removerlos; c) Fitovolatilización, que implica el uso de plantas para extraer ciertos metales del suelo y luego liberarlos en la atmósfera por volatilización; d) Fitoextracción, donde las plantas absorben los metales del suelo y los translocan a los tejidos aéreos, donde éstos se acumulan (fitoacumulación). La Tabla 2 presenta las principales especies de plantas conocidas capaces de remediar Hg y el mecanismo implicado en la remoción del mismo.

Tabla 2. Diferentes especies de plantas y mecanismos involucrados en la remoción de Hg.

Planta	Mecanismo Involucrado	Referencia
<i>Panicum hemitomon</i> , <i>Typha latifolia</i>	Rizofiltración	Willis (2010)
<i>Eichornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> , <i>Scirpus tabernaemontani</i> , <i>Colocasia esculenta</i>	Rizofiltración	Skinner <i>et al.</i> (2007)
<i>Salix viminalis</i>	Fitoestabilización	Sas-Nowosielska <i>et al.</i> (2008)
<i>Juncus maritimus</i>	Fitoestabilización	Anjum <i>et al.</i> (2011)
<i>Scirpus maritimus</i>	Fitoestabilización	Marques <i>et al.</i> (2011)
<i>Silene vulgaris</i>	Fitoestabilización	Pérez-Sanz <i>et al.</i> (2012)
<i>Lepidium latifolium</i> , <i>Artemisia douglasiana</i> , <i>Caulanthus</i> sp., <i>Fragaria vesca</i> , <i>Eucalyptus globulus</i>	Fitovolatilización	Leonard <i>et al.</i> (1998b)
<i>Rumex induratus</i> , <i>Marrubium vulgare</i>	Fitoextracción	Moreno-Jiménez <i>et al.</i> (2006)
<i>Nerium oleander</i>	Fitoacumulación	Millán <i>et al.</i> (2012)
<i>Lupinus albus</i>	Fitoacumulación	Zornoza <i>et al.</i> (2010)
<i>Solanum melongena</i>	Fitoacumulación	Sierra <i>et al.</i> (2008b)
<i>Hordeum vulgare</i>	Fitoacumulación	Sierra <i>et al.</i> (2011)
<i>Pistia stratiotes</i> , <i>Azolla pinnata</i>	Fitoacumulación	Mishra <i>et al.</i> (2009)

4.1 Rizofiltración

La rizofiltración representa una alternativa prometedora para la eliminación de metales en ambientes acuáticos. El proceso implica el cultivo de plantas en hidroponía y su trasplante a aguas contaminadas con metales, a partir de las cuales las plantas absorben y concentran los metales en sus raíces y brotes. Después de un

cierto tiempo las plantas se cosechan y se disponen para su uso final. Las plantas empleadas con estos fines deben ser capaces de acumular y tolerar cantidades significativas del metal, además de ser fácilmente manipulables, poseer un bajo costo de mantenimiento, y una baja necesidad de eliminación de residuos secundarios. También es deseable que las

plantas tengan un significativo sistema radicular (Dushenkov *et al.*, 1995).

En las últimas décadas, se han realizado algunas investigaciones sobre plantas rizofiltradoras de Hg, particularmente para su aplicación en diversos ambientes de humedales, cuyos resultados han indicado que la fitorremediación sustancial de aguas contaminadas con este metal puede ser posible (Breteler *et al.*, 1981; Kamal *et al.*, 2004; Skinner *et al.*, 2007; Sundberg-Jones y Hassan, 2007). Las especies que parecen ser prometedoras en este sentido incluyen *Azolla Carolinia* (Bennicelli *et al.*, 2004), *Myriophyllum spicatum*, *Ludwigia peploides* y *Mentha aquatica* (Kamal *et al.*, 2004), *Eichornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Scirpus tabernaemontani*, y *Colocasia esculenta* (Skinner *et al.*, 2007).

En estos estudios, la reducción en la concentración de Hg fue mayor al 90%. Recientemente, Willis (2010) determinó que *Panicum hemitomon* y *Typha latifolia* acumularon alta concentración de Hg en los tejidos y, además, su biomasa fue similar a los controles no expuestos al contaminante, por lo que sugirió que estas especies son adecuadas para su aplicación en fitorremediación de humedales contaminados con Hg.

4.2 Fitoestabilización

La fitoestabilización comprende el uso de plantas para prevenir el movimiento de metales en el suelo y/o aguas a través de la adsorción sobre las raíces o precipitación dentro de la rizósfera, para evitar su migración (Tangahu *et al.*, 2011). Esta tecnología tiene como ventajas, sobre otros métodos de remediación de suelos, que es de menor costo, fácil de aplicar y estéticamente agradable. Las plantas adecuadas para fitoestabilización no deben realizar una elevada translocación de los contaminantes a los tejidos aéreos de la planta, evitando así el riesgo de ser consumidos por herbívoros e ingresar en la cadena trófica. Esto además, elimina la necesidad de cosechar y tratar como residuos peligrosos a los tejidos contaminados.

Las plantas seleccionadas también deben ser fáciles de establecer, crecer rápidamente, tener follajes y sistemas radiculares densos, y ser tolerantes a altas concentraciones de los contaminantes metálicos y otras condiciones del sitio que pueden limitar el crecimiento de plantas (Flathman y Lanza, 1998; Vara Prasad y Oliveira Freitas, 2003).

Son varios los trabajos que proponen diferentes especies vegetales tales como *Salix viminalis* (Sas-Nowosielska *et al.*, 2008), *Juncus maritimus* y *Scirpus maritimus* (Anjum *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2011), para la fitoestabilización de este metal tóxico. También plantas de *Silene vulgaris* han demostrado ser buenas candidatas para la fitoestabilización de Hg de suelos artificialmente contaminados, ya que las mismas no mostraron cambios significativos en la biomasa frente al tratamiento, además de contener mayor concentración de Hg en las raíces que en los tallos (Pérez-Sanz *et al.*, 2012).

4.3 Fitovolatilización

En los últimos años, los investigadores han buscado plantas naturales o modificadas genéticamente que sean capaces de absorber las formas elementales de algunos metales del suelo, convertirlas a especies gaseosas dentro de la planta, y liberarlas a la atmósfera. Este proceso es denominado fitovolatilización, el cual es posible sólo para un reducido tipo de metales y metaloides, incluyendo el Hg, debido a su alta volatilidad. Este método de remediación tiene algunos beneficios tales como una mínima perturbación del ambiente, menos erosión, y además elimina la necesidad de disponer del material vegetal contaminado (Heaton *et al.*, 1998; Rugh *et al.*, 2000).

Muy pocos estudios han descrito la emisión de Hg de tejidos vegetales debido a que es un proceso fuertemente afectado por las condiciones del ambiente, como la intensidad de luz y temperatura del aire (Leonard *et al.*, 1998a). Sin embargo, *Lepidium latifolium*, *Artemisia douglasiana*, *Caulanthus* sp., *Fragaria vesca*, *Eucalyptus globulus*

demonstraron capacidad para volatilizar Hg, siendo *Caulanthus* sp. la especie que mostró mayor potencial (Leonard *et al.*, 1998b).

Actualmente existe un esfuerzo considerable para insertar en plantas genes bacterianos que codifican para enzimas reductoras de Hg, con el propósito de lograr una mayor volatilización de este metal (lo que se discutirá posteriormente). Algunos investigadores discrepan con esta tendencia debido a la contaminación secundaria del medioambiente con Hg(0), por lo que la fitovolatilización es la estrategia de fitorremediación menos aceptada ya que presenta ciertas controversias.

4.4 Fitoextracción

La fitoextracción, también llamada fitoacumulación, comprende como ya hemos mencionado, la incorporación y transporte de los contaminantes a los tejidos aéreos de la planta, donde son acumulados. Luego, estos tejidos pueden ser extraídos y destruidos o reciclados, por ejemplo mediante incineración. El éxito de la fitoextracción es inherentemente dependiente de varias características de la planta, siendo la capacidad para producir grandes cantidades de biomasa de forma rápida y la capacidad de acumular grandes cantidades de metales en los tejidos de las mismas los dos caracteres más importantes (Kumar *et al.*, 1995; Vara Prasad y Oliveira Freitas, 2003). Si bien actualmente se han descrito un gran número de plantas que hiperacumulan diferentes metales, aún no se hallan referencias sobre plantas hiperacumuladoras de Hg. A pesar de esto, se han descrito diferentes plantas como buenas acumuladoras de este metal. Al respecto, Moreno-Jiménez *et al.* (2006) evaluaron la capacidad de *Rumex induratus* y *Marrubium vulgare* para extraer el Hg de un suelo contaminado con concentraciones que oscilaban entre 122 y 550 mg/kg. Los resultados mostraron que los rendimientos fueron bajos como para justificar la aplicación de esta técnica como sistema viable de remediación. En cambio, una especie de arbusto natural, *Nerium oleander*, que se desarrolla en la rivera del río

Valdeazogues en la zona minera del Almadén (España), podría constituir un candidato para una fitorremediación eficiente de Hg, dado que este arbusto acumuló Hg en hojas en concentraciones que variaron de 0.28 a 0.94 mg/kg, en tallos de 0.07 a 0.48 mg/kg y en frutos de 0.03 a 0.08 mg/kg cuando las plantas estuvieron expuestas a concentraciones de Hg entre 117 y 350 mg/kg (Millán *et al.*, 2012). Resultados similares fueron encontrados en otras especies vegetales tales como *Lupinus albus* (Zornoza *et al.*, 2010), *Solanum melongena* (Sierra *et al.*, 2008b) y *Hordeum vulgare* (Sierra *et al.*, 2011). También se ha estudiado la capacidad de remoción de Hg por macrófitas acuáticas (*Pistia stratiotes* y *Azolla pinnata*) (Mishra *et al.*, 2009). Para estos ensayos se utilizaron efluentes de las minas de carbón conteniendo 10 µg/L de Hg, alcanzándose tasas de remoción del 80 y 68% para *P. stratiotes* y *A. pinnata*, respectivamente, después de 21 días. *P. stratiotes* mostró una elevada acumulación de Hg en raíces y en hojas, por lo que esta macrófita acuática podría ser recomendada para el tratamiento de aguas residuales conteniendo Hg.

La fitoextracción de Hg suele promoverse con el agregado de compuestos químicos como ioduro de potasio (KI), tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃), ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y ureasa, entre otros, que contribuyen aumentando la solubilidad y, en consecuencia, favorecen la mayor captación de este metal por las plantas (Cassina *et al.*, 2012, y citas en este trabajo). Por otra parte, también se ha logrado un incremento en la captación y translocación de Hg en plantas de *Brassica juncea* y *Helianthus annuus* con el agregado combinado de una fitohormona (citoquinina) y tiosulfato de amonio, ya que la hormona incrementó la biomasa y la tasa de evapotranspiración de las plantas mientras que el tioligando promovió la mayor solubilidad y biodisponibilidad del Hg presente en el suelo (Cassina *et al.*, 2012).

4.5 Incorporación, translocación y metabolismo del Hg en la planta

Desde hace décadas se han desarrollado estudios que evalúan los mecanismos de incorporación en la raíz y translocación y metabolismo del Hg en las partes aéreas de la planta.

Si bien la información acerca del mecanismo de incorporación del Hg es escasa, está generalmente aceptado que la captación de metales tóxicos como el Hg(II) puede ocurrir a través de los canales transportadores de micronutrientes esenciales (Patra y Sharma, 2000). Dada la similitud química entre el Hg y varios nutrientes esenciales como el Zn, Cu o Fe, los transportadores de estos elementos podrían ser posibles candidatos para favorecer el ingreso de Hg a las células vegetales. También se ha informado que Hg(II) preferentemente se une a ligandos ricos en S y N, tales como los aminoácidos (Nieboer y Richardson, 1980). Por otra parte, Esteban *et al.* (2008) encontraron un sistema activo de baja afinidad para la incorporación de Hg en plantas de lupino blanco (*Lupinus albus* L.). Estos autores sugieren que los transportadores de metales como Zn, Cu, Fe y Ca y/o acuaporinas podrían contribuir parcialmente a la alta capacidad de lupino de captar Hg. También se han encontrado que algunos factores del suelo afectan la captación de Hg por las plantas, entre ellas, la presencia de otros metales y metaloides. Por ejemplo, el arsenato promovió significativamente la adsorción de Hg(II) sobre la superficie de las raíces de arroz (Du *et al.*, 2005), ya que la absorción de arsenato incrementó las cargas negativas sobre la raíz. Asimismo, Zhang *et al.* (2012) sugieren que el selenio puede jugar un rol importante limitando la biodisponibilidad de Hg en el suelo y la absorción y translocación/bioacumulación de formas inorgánicas y orgánicas, como el MeHg, hacia la parte aérea de plantas de arroz. Esto podría estar relacionado con la formación de complejos insolubles Hg-Se tanto en la rizósfera como en la raíz.

La mayor parte del Hg acumulado en plantas permanece en la raíz, encontrándose aproximadamente el 80% unido a la pared

celular, mientras que sólo una pequeña proporción se transloca a los tallos, a través de la transferencia al xilema (Wang, 2004; Wang y Greger, 2004), y a las hojas (Millhollen *et al.*, 2006a; Fay y Gustin, 2007). Por otra parte, el Hg(0) también puede ingresar a las hojas a través de los estomas durante el proceso de intercambio de gases (Niu *et al.*, 2011; Rutter *et al.*, 2011; Chen y Yang, 2012).

En cuanto a la detoxificación de este metal, un mecanismo general comprende su unión a fitoquelatinas y/o metalotioneínas y la posterior incorporación del complejo a vacuola. Velasco Alinsug *et al.* (2005) encontraron que el Hg se hallaba principalmente asociado a un péptido conteniendo varios residuos de S en raíces y tallos de plantas de *Chromolaena odorata* expuestas a Hg(NO₃)₂. También, Park *et al.* (2012) describieron que dos transportadores tipo ABCC, AtABCC1 y AtABCC2 de vacuolas, resultarían importantes en el mecanismo de detoxificación de Cd y Hg dependiente de fitoquelatinas.

5. Risorremediación de mercurio

Existen diversas metodologías para limpiar suelos contaminados con Hg, sin embargo, como ya se mencionó, uno de los métodos más comunes de remediación biológica de suelos contaminados es la fitorremediación, en la que no solamente se implica la actividad de la planta sino también la de su rizósfera asociada. La rizósfera es la zona en la cual los metales entran en contacto con las raíces de las plantas, constituyendo una interface suelo-planta de gran importancia en el proceso de fitorremediación. Las plantas ayudan a crear su propia rizósfera por la secreción de diferentes enzimas y moléculas pequeñas, y mediante el ajuste de pH del suelo. Estas actividades, a su vez, mejoran la absorción de nutrientes y elementos tóxicos por parte de la planta pero también se puede ver favorecido el desarrollo de comunidades bacterianas con capacidad inherente de remediar Hg. De este modo surge el concepto de "risorremediación". Ésta implica

la actividad de remoción o inmovilización de contaminantes de manera conjunta entre plantas y microorganismos que habitan en su rizósfera. Esta tecnología depende de múltiples factores, entre ellos, de las especies de plantas utilizadas, la biodisponibilidad de los metales en el suelo y de la interacción entre plantas y microorganismos resistentes a metales (Kamaludeen y Ramasamy, 2008; Vara Prasad y Oliveira Freitas, 2003; Wenzel, 2009).

En relación a la capacidad de rizorremediación de sitios contaminados con Hg, existen antecedentes en la literatura que indican que se han detectado poblaciones bacterianas, en la rizósfera de diversas especies de plantas, con capacidad de tolerar/remover Hg. Entre estos, Sorkhoh *et al.* (2010) observaron que en la rizósfera de cultivos de leguminosas creciendo en suelos contaminados con petróleo y Hg, crecieron una considerable cantidad de bacterias resistentes al metal, las cuales contribuyeron al proceso de remediación de Hg(II) equitativamente a la remoción producida por las plantas. Además, estas bacterias mostraron la capacidad de fijar nitrógeno y biodegradar petróleo, procesos en los que las plantas huésped no pueden participar, lo cual demuestra el rol valioso desempeñado por las rizobacterias en la remediación de suelos contaminados. De manera similar, Sierra *et al.* (2012) demostraron que las interacciones de la rizósfera permiten incrementar la disponibilidad de Hg para las plantas de *Lavándula stoechas* L., de manera que aumentan el contenido efectivo y disponible de metal para las plantas y por lo tanto incrementan su translocación. Un trabajo aún más innovador fue realizado por Nonnoi *et al.* (2012), quienes establecieron que cepas de *Ensifer medicae* y *Rhizobium*

leguminosarum bv. *Trifolii*, aisladas de nódulos de plantas de *Medicago* spp. y *Trifolium* spp. creciendo en suelos contaminados con Hg, podrían ser utilizadas para inocular leguminosas con el objetivo de remediar suelos contaminados con este metal, debido a que mostraron alta tolerancia al mismo. Sin embargo, son necesarios más estudios para definir el patrón de simbiosis leguminosa-*Rhizobium* para la remediación *in situ*.

De los ejemplos descritos precedentemente puede concluirse que si bien la rizorremediación es un área relativamente nueva dentro de la remediación biológica, varios grupos de trabajo están explorándola paulatinamente debido al alto potencial que ésta posee, aún con la desventaja de la complejidad de los diseños experimentales utilizados (Li y Ramakrishna, 2011; Jean-Philippe *et al.*, 2011).

6. Plantas transgénicas para remediar mercurio

Si bien se ha mencionado anteriormente la capacidad de algunas plantas para remover Hg, éstas frecuentemente no presentan una alta eficiencia en este proceso, comparado con los microorganismos. En consecuencia, para mejorar dicha capacidad, se han desarrollado plantas transgénicas a través de la transferencia de genes desde otros organismos que presentan la habilidad para remediar contaminantes a plantas “candidatas”, susceptibles de ser transformadas. De esta manera, recientemente varios genes bacterianos involucrados en procesos de remoción de Hg han sido clonados y expresados en plantas exitosamente, permitiendo la metabolización de este metal (Tabla 3).

Tabla 3. Plantas transgénicas que expresan diferentes genes de resistencia bacterianos a Hg y MeHg.

Planta modificada	Gen bacteriano	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>merA</i>	Rugh <i>et al.</i> (1996)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>merA</i>	Heaton <i>et al.</i> (2005)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	<i>merA</i>	Rugh <i>et al.</i> (1998)

<i>Populus deltoides</i>	<i>merA</i>	Che <i>et al.</i> (2003)
<i>Oryza sativa</i>	<i>merA</i>	Heaton <i>et al.</i> (2003)
<i>A. thaliana</i>	<i>merB</i>	Bizily <i>et al.</i> (1999)
<i>A. thaliana</i>	<i>merA-merB</i>	Bizily <i>et al.</i> (2000)
<i>Populus deltoides</i>	<i>merA-merB</i>	Lyyra <i>et al.</i> (2007)
<i>Spartina alternifolia</i>	<i>merA-merB</i>	Czakó <i>et al.</i> (2006)
<i>N. tabacum</i>	<i>merA-merB</i>	Abdel Rahman <i>et al.</i> (2008)
<i>A. thaliana</i>	<i>merA-merB</i>	Bizily <i>et al.</i> (2003)
<i>N. tabacum</i>	<i>ppK</i>	Nagata <i>et al.</i> (2006)
<i>N. tabacum</i>	<i>ppK-merT</i>	Nagata <i>et al.</i> (2009)
<i>N. tabacum</i>	<i>ppK-merT-merB</i>	Nagata <i>et al.</i> (2010)
<i>A. thaliana-N.tabacum</i>	<i>merC</i>	Sasaki <i>et al.</i> (2006)
<i>A. thaliana</i>	<i>merC</i>	Kiyono <i>et al.</i> (2013)
<i>A. thaliana</i>	<i>merP</i>	Hsieh <i>et al.</i> (2009)

Los primeros trabajos que generaron plantas transgénicas con la finalidad de aumentar la tolerancia a Hg surgieron a principios de los 90, cuando Meagher y sus colaboradores utilizaron los genes *mer A* y *B*, correspondientes al operón *mer*, previamente citado, para transformar plantas. Los genes bacterianos fueron modificados para lograr su expresión adecuada en plantas de *Arabidopsis* (Rugh *et al.*, 1996). A partir de este trabajo, diferentes especies vegetales, tales como tabaco (Heaton *et al.*, 2005), álamo (Rugh *et al.*, 1998), algodón (Che *et al.*, 2003) y arroz (Heaton *et al.*, 2003) fueron transformadas con el gen *mer A*, cuya expresión constitutiva les permitió tolerar al menos concentraciones 10 veces mayores de Hg(II) que las plantas controles y fueron capaces de fitovolatilizar Hg(0). Entre estas plantas se destacaron el álamo y el algodón, ya que por poseer raíces más profundas serían adecuadas candidatas para la remediación de Hg.

Además, se debe tener en cuenta que las plantas no pueden detoxificar MeHg, por lo tanto lo acumulan y éste puede resultar tóxico, tanto para ellas como para los organismos que las consumen. Por esta razón, las investigaciones se enfocaron en transformar plantas utilizando también al gen *mer B*, de manera tal que las mismas fueran capaces de detoxificar MeHg,

como es el caso de *A. thaliana* (Bizily *et al.*, 1999). En esta planta transgénica se demostró que la sola expresión del gen *mer B* confería tolerancia a MeHg, sin embargo el Hg(II) se acumuló en las mismas. Esto llevó a proponer la co-expresión de ambos genes (*mer A* y *mer B*), obteniéndose plantas que fueron 50 veces más tolerantes a MeHg que las plantas control y 5 veces más tolerantes que aquellas que sólo expresaban el gen *mer B* (Bizily *et al.*, 2000). Cabe aclarar que para estudiar la expresión simultánea de ambos genes se obtuvieron plantas dobles transgénicas por técnicas convencionales de cruzamiento. Esta estrategia también se utilizó para transformar árboles, como el álamo negro (*Populus deltoides*), que mostró una elevada tolerancia a MeHg (Lyyra *et al.*, 2007), así como plantas acuáticas, como *Spartina alterniflora*, entre otras (Czakó *et al.*, 2006). Más recientemente, la co-expresión de los genes *mer A* y *mer B* se logró mediante el uso de secuencias IRES (internal ribosomal entry site), que permitió obtener plantas transgénicas de tabaco con elevada eficiencia para detoxificar acetato de fenilmercurio y HgCl₂ (Abdel Rahman *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que los cloroplastos y el retículo endoplásmico serían sitios blanco de los efectos tóxicos del Hg (Bizily *et al.*, 2003). En consecuencia, se han propuesto estrategias

para generar plantas transgénicas que integren los genes *mer A* y *mer B* al genoma del cloroplasto (Ruiz *et al.*, 2003) o bien plantas donde la enzima codificada por el gen *mer B* fue direccionada a retículo endoplásmico (Bizily *et al.*, 2003). Éstos y otros ejemplos descritos en la literatura demuestran que la detoxificación de Hg y su transformación a una forma volátil constituye una alternativa cuando se requiere una remoción inmediata de este contaminante. Sin embargo, como se describió previamente, existe una cierta resistencia a la aplicación de esta tecnología, que ha recibido numerosas críticas principalmente de aquellos que indican que si bien el Hg(0) es menos tóxico, se liberaría eventualmente a la superficie terrestre y podría re-depositarse en suelo y aguas superficiales (Bhargava *et al.*, 2012). Esto derivó en la necesidad de diseñar otras metodologías que permitieran, por ejemplo, acumular este contaminante en las partes cosechables de las plantas, previniendo la formación de Hg(0) y su disipación en el ambiente. Esto se logró mediante el diseño de plantas transgénicas que expresan el gen *mer B* y algún gen relacionado con la síntesis de fitoquelatinas que eventualmente favorecerían el secuestro del Hg. Otra estrategia, propuesta por Nagata *et al.* (2006) consistió en generar plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen bacteriano *ppK*, que codifica para una polifosfato quinasa (PPK) bajo el control de un promotor de plantas. Dicho gen se integró de manera estable y además se detectó la expresión de la proteína PPK en hojas. Las plantas obtenidas mostraron una significativa resistencia a Hg(II) y acumularon entre 2 y 5 veces más Hg que las plantas salvajes. Los autores sugirieron que las plantas transgénicas obtenidas podrían tolerar eficientemente al Hg mediante un mecanismo de quelación que les permitiría acumular al metal. Posteriormente, los mismos investigadores expresaron también el gen *merT* y *merB* en las plantas de tabaco transgénicas que expresan el gen *ppK*, lo cual le confirió a las plantas mayor velocidad de transporte de Hg y reducción de MeHg,

respectivamente. Las plantas transgénicas de tabaco resultantes que expresan los genes *ppK-merT-merB*, reducen el MeHg incorporado a Hg(II), el cual se acumula en las células como un complejo Hg-PoliP menos tóxico (Nagata *et al.* 2009; Nagata *et al.*, 2010).

A su vez, algunos investigadores han transformado plantas con otros genes bacterianos del operón *mer*. Así, Sasaki *et al.* (2006) transformaron plantas de *A. thaliana* y tabaco con el gen *merC* de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, logrando la expresión del gen y por ende plantas hipersensibles a Hg(II), que acumularon aproximadamente el doble del metal que las plantas de tipo salvaje. Resultados similares fueron obtenidos por Kiyono *et al.* (2013) en plantas de *A. thaliana* expresando el gen *merC*. Por su parte, Hsieh *et al.* (2009) expresaron el gen *merP* del transposon TnMER11 de *Bacillus megaterium* MB1 en *Arabidopsis*. Las plantas transgénicas resultantes mostraron una mayor tolerancia y capacidad de acumulación de Hg. Además, mediante microscopía confocal observaron que la proteína MerP se localizó en la membrana celular y en las vesículas de las células vegetales.

En base a estos antecedentes, resulta evidente que las plantas transgénicas podrían reducir el riesgo causado por la presencia de Hg en el ambiente. No obstante, la aplicación comercial de esta tecnología requiere la aprobación y el monitoreo de Organismos Regulatorios, que aseguren la inocuidad de su empleo, entre ellas el posible riesgo de la volatilización de contaminantes en el ambiente. Actualmente, ninguna de las plantas transgénicas desarrolladas con fines de fitorremediación de contaminantes ha sido explotada comercialmente. La mayoría de los resultados obtenidos se basan en observaciones realizadas en condiciones controladas de experimentación (a escala de laboratorio) pero no en el campo.

7. Conclusiones y futuras perspectivas

El Hg es reconocido como uno de los metales pesados más tóxicos para los seres vivos y que, además, ha generado algunos de los estragos más grandes de intoxicación e, inclusive, muerte de seres humanos. En consecuencia, la remoción de este metal es prioritaria. Por lo cual se han desarrollado muchas tecnologías de remoción de Hg de ambientes contaminados siendo algunas de ellas muy promisorias, tal es el caso de la remediación biológica, entre las que se encuentran la bio-, fico-, fito y rizorremediación.

Respecto de la bio- y ficorremediación de Hg, en esta revisión se mostraron los diversos mecanismos de resistencia y remoción de este metal por diferentes géneros de bacterias, hongos y algas. Estos incluyen procesos físico-químicos como la adsorción, precipitación, quelación, procesos metabólicos (glutación y metalotioneínas) y enzimáticos (expresión del operón *mer*). La estructura de éste último ha sido estudiada desde hace décadas, lo que ha llevado a un conocimiento en profundidad de su organización y función. La alta capacidad de volatilización que poseen las bacterias, conferida por la presencia de este sistema codificado genéticamente, ha permitido a estos organismos la colonización de ambientes con altos niveles de Hg, tales como sitios de explotación minera. La diversidad de microorganismos que poseen la capacidad de remediar Hg es extensa, sin embargo entre ellos, las bacterias son las más estudiadas históricamente y, por ende, las más conocidas. Aunque paulatinamente se ha incrementado el número de investigaciones que describen a hongos y algas con tales propiedades. En este sentido, resulta importante destacar la posible utilización de la biomasa de hongos y algas como material adsorbente, que provee un alto potencial para aplicaciones a gran escala, debido a su naturaleza, abundancia y economía del proceso. Las eficiencias de remoción de Hg obtenidas por los diversos microorganismos en estudio, tanto en medios de cultivo sintéticos

como en efluentes, demuestran el potencial que poseen los mismos para su aplicación en biorremediación.

Con respecto a la fitorremediación, es evidente que existe una gran diversidad de especies de plantas que han sido propuestas para remediar suelos, sedimentos o agua contaminados con Hg, mediante diferentes mecanismos como la rizofiltración, fitoestabilización, fitovolatilización y fitoextracción. A pesar de ello existen ciertas limitaciones para su implementación, tales como las características geomorfológicas del sitio contaminado, el grado y tipo de contaminación, el establecimiento y cosecha de las plantas, como así también el potencial riesgo del ingreso de Hg en la cadena alimentaria. Estas limitaciones como así también la elección de las especies adecuadas para fitorremediar Hg deben ser minuciosamente evaluadas. Las especies con mayor potencial para fitorremediar Hg, serían aquellas que poseen alta capacidad de extraer grandes cantidades del metal y acumularlo en su biomasa. Sin embargo, no se conocen especies de plantas hiperacumuladoras de Hg, por lo que la fitoextracción natural de este metal de suelos contaminados es limitada. Por otra parte, esto también implicaría un riesgo ecológico, ya que se incrementa la posibilidad del ingreso del contaminante en la cadena trófica por consumo de las plantas contaminadas. Este riesgo se reduciría si la acumulación del contaminante se realiza en la raíz de las plantas, por lo que la fitoestabilización de Hg es una estrategia recomendable y que debería ser estudiada con más énfasis. De allí que se han generado otras estrategias para mejorar la fitorremediación de Hg, entre ellas, la rizorremediación. Ésta ha emergido como una estrategia alternativa que involucra el uso combinado de microorganismos rizosféricos y plantas, lo cual puede mejorar la capacidad de extracción de Hg por parte de la planta o el desarrollo de poblaciones bacterianas rizosféricas con capacidad de remover el contaminante, sin embargo, la bibliografía disponible en la

actualidad referida específicamente a la rizorremediación de Hg, es escasa. Por lo tanto, ésta es un área que aún necesita ser estudiada con el objetivo de explotar más su potencial. Otra alternativa para mejorar la fitorremediación de Hg, es la obtención de plantas transgénicas. Diversas especies de plantas han sido transformadas con genes bacterianos que le confieren la capacidad de volatilizar y acumular el Hg. Si bien se ha demostrado que estas plantas muestran una alta capacidad de remoción de Hg, estos estudios se han realizado sólo a nivel laboratorio. Se debe considerar que las pruebas de campo y los análisis de riesgo son parámetros importantes a tener en cuenta cuando se desarrollan plantas transgénicas, ya que si bien se reconocen las ventajas asociadas con su aplicación en fitorremediación, aún se han efectuado pocos estudios referidos a bioseguridad. Por lo que se requiere de un análisis caso por caso, determinando los beneficios y riesgos en comparación con otras tecnologías.

Un aspecto a destacar es que si bien los sistemas biológicos descritos han sido eficientes para remediar Hg, la mayoría se han estudiado en medios acuosos sintéticos. Por lo tanto, resulta necesario ampliar los estudios concernientes a la aplicación de estos sistemas para remover Hg de efluentes industriales, fuentes de agua, suelos y sedimentos, lo cual contribuiría a reducir la contaminación de ambientes naturales.

8. Referencias

- Abdel Rahman, R.A., Abou-Shanab, R.A., Moawad, H. 2008. Mercury detoxification using genetic engineered *Nicotiana tabacum*. *Global NEST J* 10(3):432-438.
- Adelaja, O.A., Keenan, H.E. 2012. Tolerance of TBT-resistant bacteria isolates to methylmercury. *Res J Environ Sci* 6(1):1-13.
- Anjum, N.A., Ahmad, I., Valega, M., Pacheco, M., Figueira, E., Duarte, A.C., Pereira, E. 2011. Impact of seasonal fluctuations on the sediment-mercury, its accumulation and partitioning in *Halimione portulacoides* and *Juncus maritimus* collected from Ria de Aveiro Coastal Lagoon (Portugal). *Water Air Soil Pollut* 222:1-15.
- Baldi, F., Gallo, M., Marchetto, D., Fani, R., Maida, I., Horvat, M., Fajon, V., Zizek, S., Hines, M. 2012. Seasonal mercury transformation and surficial sediment detoxification by bacteria of Marano and Grado lagoons. *Estuarine Coastal Shelf Sci* doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.008, *In press*.
- Baldi, F., Pepi, M., Filippelli, M. 1993. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation. *Appl Environ Microbiol* 59(8):2479-2485.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3):355-384.
- Bashan, L.E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Biores Technol* 10:1611-1627.
- Bayramoğlu, G., Arıca, M.Y. 2008. Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. *Chem Eng Journal* 143:133-140.
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., Arıca, M.Y. 2006. Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Int J Miner Process* 81:85-43.

- Bennicelli, R., Banach, A., Szajnocha, K., Ostrowski, J. 2004. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal wastewater. *Chemosphere* 55:141-146.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J Environ Manag* 105:103-120.
- Bizily, S.P., Kim, T., Kandasamy, M.K., Meagher, R.B. 2003. Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants. *Plant Physiol* 131:463-471.
- Bizily, S.P., Pugh, C.L., Meagher, R.B. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat Biotechnol* 18:213-217.
- Bizily, S.P., Pugh, C.L., Summers, A.O., Meagher, R.B. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6808-6813.
- Boyd, E.S., Barkay, T. 2012. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front Microbio* 1-12.
- Breteler, R.J., Valiela, I., Teal, J.M. 1981. Bioavailability of mercury in several north-eastern U.S. *Spartina* ecosystems. *Est Coast Shelf Sci* 12:155-166.
- Cabral, L., Giovanella, P., Gianello, C., Bento, F.M., Andrezza, R., Camargo, F.A. 2012. Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegradation* doi 10.1007/s10532-012-9588-z, *In press*.
- Cassina, L., Tassia, E., Pedrona, F., Petruzzelli, G., Ambrosinib, P., Barbaferia, M. 2012. Using a plant hormone and a thioligand to improve phytoremediation of Hg-contaminated soil from a petrochemical plant. *J Hazard Mat* 231-232:36-42.
- Chang, J., Chao, Y., Law, W. 1998. Repeated fed-batch operations for microbial detoxification of mercury using wild-type and recombinant mercury-resistant bacteria. *J Biotechnol* 64(2-3):219-230.
- Chang, J.S., Hong, J. 1994. Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). *Biotechnol Bioeng* 44(8):999-1006.
- Che, D.S., Meagher, R.B., Heaton, A.C.P., Lima, A., Merkle, S.A. 2003. Expression of mercuric ion reductase in eastern cottonwood confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotechnol* 1:311-319.
- Chen, J., Yang, M.Z. 2012. Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *Biometals* 25:847-857.
- Cheng, J., Yuan, T., Wang, W., Jia, J., Lin, X., Qu, L., Ding, Z. 2006. Mercury pollution in two typical areas in Guizhou province, China and its neurotoxic effects in the brains of rats fed with local polluted rice. *Environ Geochem Health* 28:499-507.
- Chu, T., Murray, S.R., Todd, J., Perez, W., Yarborough, J.R., Okafor, C., Lee, L.H. 2012. Adaption of *Synechococcus* sp. IU 625 to growth in the presence of mercuric chloride. *Acta Histochem* 114(1):6-11.
- Crane, S., Dighton, J., Barkay, T. 2010. Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. *Fungal Biol* 114:873-880.
- Czakó, M., Feng, X., He, Y., Liang, D., Marton, L. 2006. Transgenic *Spartina alterniflora* for phytoremediation. *Environ Geochem Health* 28:103-110.

- De, J., Ramaiah, N., Vardanyan, L. 2008. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnol* 10(4):471-477.
- Deng, X., Wang, P. 2012. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Biores Technol* 121:342-347.
- Du, X., Zhu, Y.G., Liu, W.J., Zhao, X.S. 2005. Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake. *Environ Exp Bot* 54:1-7.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H., Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol* 29:1239-1245.
- Essa, A.M.M. 2012. The effect of a continuous mercury stress on mercury reducing community of some characterized bacterial strains. *African J Microbiol Res* 6:4006-4012.
- Esteban, E., Moreno, E., Peñalosa, J., Cabrero J.I., Millán, R., Zornoza, P. 2008. Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: kinetics and stress indicators. *Environ Exp Bot* 62:316-322.
- Fantozzi, L., Ferrara, R., Frontini, F.P., Dini, F. 2009. Dissolved gaseous mercury production in the dark: Evidence for the fundamental role of bacteria in different types of Mediterranean water bodies. *Sci Total Environ* 407(2):917-924.
- Fay, L., Gustin, M.S. 2007. Assessing the influence of different atmospheric and soil mercury concentrations on foliar mercury concentrations in a controlled environment. *Water Air Soil Pollut* 181:373-384.
- Feng, X., Li, P., Qiu, G., Wang, S., Li, G., Shang, L., Meng, B., Jiang, H., Bai, W., Li, Z. 2007. Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou Province, China. *Environ Sci Technol* 42:326-332.
- Flathman, P.E., Lanza, G.R. 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J Soil Contam* 7(4):415-432.
- Fortunato, R., Crespo, J.G., Reis, M.A. 2005. Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *Water Res* 39:3511-3522.
- François, F., Lombard, C., Guigner, J.M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., Vandervennet, M., Garcia, D., Molinier, A.L., Pignol, D., Peduzzi, J., Zirah, S., Rebuffata, S. 2012. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl Environ Microbiol* 78:1097-1106.
- Freedman, Z., Zhu, C., Barkay, T. 2012. Mercury resistance and mercuric reductase activities and expression among chemotrophic thermophilic Aquificae. *Appl Environ Microbiol* 78(18):6568-6575.
- Fréry, N., Maury-Brachet, R., Maillot, E., Deheeger, M., de Mérona, B., Boudou, A. 2001. Gold-mining activities and mercury contamination of native amerindian communities in French Guiana: key role of fish in dietary uptake. *Environ Health Persp* 109(5):449-456.
- Gachhui, R., Pahan, K.P., Ray, S.R., Chaudhuri, J., Mandal, A. 1991. Cell free glutathione synthesizing activity of mercury resistant bacteria. *Bull Environ Contam Toxicol* 46:336-342.
- Gadd, G.M. 1988. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Rehm HJ, Reed G (Eds). *Biotechnology*, Vol. 6, Weinheim, Germany, pp 401-430.

- Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* 176: 20-30.
- Green-Ruiz, C. 2006. Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary. *Biores Technol* 97(15):1907-1911.
- Hafez, N., Abdel-Razek, A.S., Hafez, M.B. 1997. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus flavus*. *J Chem Tech Biotechnol* 68:19-22.
- Hamlett, N.V., Landale, E.C., Davis, B.H., Summers, A.O. 1992. Roles of the Tn21 *merT*, *merP*, and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding. *J Bacteriol* 174(20):6377-6385.
- He, Z., Siripornadulsil, S., Sayre, R.T., Traina, S.J., Weavers, L.K. 2011. Removal of mercury from sediment by ultrasound combined with biomass (transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*). *Chemosphere* 83(9):1249-1254.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Kim, T., Wang, N.J., Meagher, R.B. 2003. Toward detoxifying mercury-polluted aquatic sediments using rice genetically-engineered for mercury resistance. *Environ Toxicol Chem* 22:2940-2947.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Wang, N., Meagher, R.B. 1998. Phytoremediation of mercury and methylmercury polluted soils using genetically engineered plants. *J Soil Contam* 7(4):497-510.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Wang, N.J., Meagher, R.B. 2005. Physiological responses of transgenic *merA*-tobacco (*Nicotiana tabacum*) to foliar and root mercury exposure. *Water Air Soil Pollut* 161:137-155.
- Hintelmann, H., Ebinghaus, R., Wilken, R. 1993. Accumulation of mercury(II) and methylmercury by microbial biofilms. *Water Res* 27(2):237-242.
- Howe, G., Merchant, S. 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 98:127-136.
- Hsieh, J.L., Chen, C.Y., Chiu, M.H., Chein, M.F., Chang, J.S., Endo, G., Huang, C.C. 2009. Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals. *J Hazard Mater* 161(2-3):920-925.
- Huang, C.C., Chen, M.W., Hsieh, J.L., Lin, W.H., Chen, P.C., Chien, L.F. 2006. Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: an approach for mercury phytoremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(1):197-205.
- Hutchison, A.R., Atwood, D.A. 2003. Mercury pollution and remediation: the chemist's response to a global crisis. *J Chem Crystal* 33:631-645.
- Imani, S., Rezaei-Zarchi, S., Borna, H., Javid, A., Zand, A., Abarghouei, H.B. 2011. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *J Med Plants Res* 5(13):2775-2780.
- Iohara, K., Iiyama, R., Nakamura, K., Silver, S., Sakai, M., Takeshita, M., Furukawa, K. 2001. The *mer* operon of a mercury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan. *Appl microbiol biotechnol* 56(5-6):736-741.
- Jan, A., Murtaza, I., Ali, A., Mohd, A.Q., Haq, R. 2009. Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1529-1537.
- Janssen, P.J., van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N. 2010. The complete genome sequence of

- Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE* 5:e10433.
- Jean-Philippe, S.R., Franklin, J.A., Buckley, D.S., Hughes, K. 2011. The effect of mercury on trees and their mycorrhizal fungi. *Environ Poll* 159:2733-2739.
- Kamal, M., Ghalya, A.E., Mahmouda, N., Cote, R. 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ Int* 29:1029-1039.
- Kamaludeen, S.P.B., Ramasamy, K. 2008. Rhizoremediation of metals: harnessing microbial communities. *Ind J Microbiol* 48:80-88.
- Kiyono, M., Oka, Y., Sone, Y., Nakamura, R., Sato, M.H., Sakabe, K., Pan-Hou, H. 2013. Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Eng J* 71:19-24.
- Kiyono, M., Pan-Hou, H. 1999. The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *J Bacteriol* 181(3):726-730.
- Kiyono, M., Sone, Y., Nakamura, R., Pan-Hou, H., Sakabe, K. 2009. The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 583(7):1127-1131.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* 29(5):1232-1238.
- Kurns, L., Roomans, G.M. 1985. Intracellular localization of heavy metals in yeast by X-ray microanalysis. *Scan Electr Microsc* 1:191-199.
- Le Jeune, A.H., Bourdiol, F., Aldamman, L., Perron, T., Amyot, M., Pinel-Alloul, B. 2012. Factors affecting methylmercury biomagnification by a widespread aquatic invertebrate predator, the phantom midge larvae *Chaoborus*. *Environ Pollut* 165:100-108.
- Lee, S.E., Chung, J.W., Won, H.S., Lee, D.S., Lee, Y.W. 2012. Removal of methylmercury and tributyltin (TBT) using marine microorganisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:239-244.
- Lenártová, V., Holovská, K., Javorský, P. 1998. The influence of mercury on the antioxidant enzyme activity of rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. *FEMS Microbiol Ecol* 27(4):319-325.
- Leonard, T.L., Taylor, G.E. Jr., Gustin, M.S., Fernandez, G.C.J. 1998a. Mercury and plants in contaminated soils: 2. Environmental and physiological factors governing mercury flux to the atmosphere. *Environ Toxicol Chem* 17:2072-2079.
- Leonard, T.L., Taylor, G.E. Jr., Gustin, M.S., Fernandez, G.C.J., 1998b. Mercury and plants in contaminated soils: 1. Uptake, partitioning, and emission to the atmosphere. *Environ Toxicol Chem* 17:2063-2071.
- Li, K., Ramakrishna, W. 2011. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *J Hazard Mat* 189:531-539.
- Lim, N., Micu, C., Serrano, A., Vidal, P.J. 2011. Lead and mercury bioremediation by *Kappaphycus alvarezii* doty in marine environment. Trabajo presentado en 4^{to} Congreso Internacional de la Sociedad para aplicaciones ficológicas. Canadá.
- Lund, P.A., Brown, N.L. 1989. Regulation of transcription in *Escherichia coli* from *mer* promoters in the transposon Tn501. *J Mol Biol* 205:343-353.

- Lyyra, S., Meagher, R.B., Kim, T., Heaton, A., Montello, P., Balish, R.S., Merkle, S.A. 2007. Coupling two Hg resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury. *Plant Biotech J* 5:254-262.
- Malakahmad, A., Hasani, A., Eisakhani, M., Hasnain, M. 2011. Sequencing Batch Reactor (SBR) for the removal of Hg²⁺ and Cd²⁺ from synthetic petrochemical factory wastewater. *J Hazard Mater* 191(1-3):118-125.
- Manuel, C.D., Neyra-Tanabe, M.E. 2012. Mercury uptake of microalgae in Kematu River, T'boli, South Cotabato, Philippines. Trabajo presentado en la 2^{da} Conferencia internacional y 12 conferencia científica anual, Filipinas.
- Marques, B., Lilleb, A.I., Pereira, E., Duarte, A.C. 2011. Mercury cycling and sequestration in salt marshes sediments: An ecosystem service provided by *Juncus maritimus* and *Scirpus maritimus*. *Environ Poll* 159(7):1869-1876.
- Martins, B.L. 2006. Sorption and desorption of Pb²⁺ ions by dead *Sargassum* sp. biomass. *Biochem Eng J* 27(3):310-314.
- Mathema, V.B., Thakuri, B.C., Sillanp, M. 2011. Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol* 193:837-844.
- Melgar, M.J., Alonso, J., García, M.A. 2007. Removal of toxic metals from aqueous solutions by mercuric ion reductase in eastern cottonwood confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotechnol* 1:311-319.
- Millán, R., Lominchar, M.A., López-Tejedor, I., Rodríguez-Alonso, J., Schmid, T., Sierra, M.J. 2012. Behavior of mercury in the Valdeazogues riverbank soil and transfer to *Nerium oleander* L. *J Geochem Explor* doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.07.002, *In press*.
- Millhollen, A.G., Gustin, M.S., Obrist, D. 2006a. Foliar mercury accumulation and exchange for three tree species. *Environ Sci Technol* 40:6001-6006.
- Mishra, V.K., Tripathi, B.D., Kim, K. 2009. Removal and accumulation of mercury by aquatic macrophytes from an open cast coal mine effluent. *J Hazard Mater* 172(2-3):749-754.
- Molina, J., Oyarzun, R., Esbrí, J., Higuera, P. 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ Geochem Health* 28:487-498.
- Moreno-Jiménez, E., Gamarra, R., Cárpena-Ruiz, R.O., Millán, R., Pealosa, J.M., Esteban, E. 2006. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almaden area. *Chemosphere* 63:1969-1973.
- Mukhopadhyay, D., Yu, H.R., Nucifora, G., Misra T.K. 1991. Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 266(28):18538-18542.
- Nagata, T., Kiyono, M., Pan-Hou, H. 2006. Engineering expression of bacterial polyphosphate kinase in tobacco for mercury remediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 777-782.
- Nagata, T., Morita, H., Akizawa, T., Pan-Hou, H. 2010. Development of a transgenic tobacco plant for phytoremediation of methylmercury pollution. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):781-786.
- Nagata, T., Nakamura, A., Akizawa, T., Pan-Hou, H. 2009. Genetic engineering of transgenic tobacco for enhanced uptake

- and bioaccumulation of mercury. *Biol Pharm Bull* 32(9):1491-1495.
- Nascimento, A.M., Chartone-Souza, E. 2003. Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* 2(1):92-101.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S. 1980. The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut* 1:3-26.
- Niu, Z., Zhang, X., Wang, Z., Ci, Z. 2011. Field controlled experiments of mercury accumulation in crops from air and soil. *Environ Poll* 159(10):2684-2689.
- Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V.S., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., Pueyo, J.J. 2012. Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *App Soil Ecol* 61:49-59.
- Novick, R.P., Roth, C. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 95(4):1335-1342.
- Oswald, W.J. 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, pp. 305-328.
- Park, J., Song, W., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E., Lee, Y. 2012. The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J* 69(2):278-288.
- Parkash Dhankher, O., Lafferty Doty, S., Meagher, R.B., Pilon-Smits, E. 2012. Biotechnological approaches for phytoremediation. In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. Altman, A., Hasegawa, M.P. (Eds). Oxford: Academic Press. pp.309-328.
- Parkhill, J., Brown, N.L. 1990. Site-specific insertion and deletion mutants in the *mer* promoter-operator region of Tn501; the nineteen base-pair spacer is essential for normal induction of the promoter by MerR. *Nucleic Acids Res* 18(17):5157-5162.
- Patra, M., Sharma, A., 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 66:379-422.
- Pepi M., Gaggi, C., Bernardini, E., Focardi, G., Lobianco, A., Ruta, M., Nicolardi, V., Volterrani, M., Gasperini, S., Trinchera, G., Renzi, P., Gabellini, M., Focardi, S.E. 2011. Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. isolated from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. *Int Biodet Biodeg* 65(1):85-91.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1665-1677.
- Pérez-Sanz, A., Millán, R., Sierra, M.J., Alarcon, R., Garcia, P., Gil-Diaz, M., Vazquez, S., Lobo, M.C. 2012. Mercury uptake by *Silene vulgaris* grown on contaminated spiked soils. *J Environ Man* 95:233-237.
- Price, M., Classen, J., Payne, G. 2001. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Biores Technol* 77(1):41-49.
- Puglisi, I., Faedda, R., Sanzaro, V., Lo Piero, A.R., Petrone, G., Cacciola Santa, O. 2012. Identification of differentially expressed genes in response to mercury I and II stress in *Trichoderma harzianum*. *Gene* 506:325-330.

- Qian, J., Zhang, L., Chen, H., Hou, M., Niu, Y., Xu, Z., Liu, H. 2009. Distribution of mercury pollution and its source in the soils and vegetables in Guilin Area, China. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:920-925.
- Raspanti, E., Cacciola, S.O., Gotor, C., Romero, L.C., García, I. 2009. Implications of cyste-inemetabolism in the heavymetal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere* 76:48-54.
- Robinson, J.B., Tuovinen, O.H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol Rev* 48(2):95-124.
- Rodríguez, O., Padilla, I., Tayibi, H., López-Delgado, A. 2012. Concerns on liquid mercury and mercury-containing wastes: A review of the treatment technologies for the safe storage. *J Environ Man* 101:197-205.
- Rojas, L.A., Yáñez, C., González, M., Lobos, S., Smalla, K. 2011. Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS ONE* 6(3):1-10.
- Rouch, D.A., Lee, B.T.O., Morby, A.P. 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Indust Microbiol Biotech* 14(2): 132-141.
- Rugh, C.L., Bizily, S.P., Meagher, R.B. 2000. Phytoreduction of environmental mercury pollution. In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds). *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean- up the environment*. John Wiley and Sons, New York, pp.151-170.
- Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B., Merkle, S.A. 1998. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnol* 16:925-928.
- Rugh, C.L., Wilde, D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R. B. 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3182-3187.
- Ruiz, O.N., Hussein, H.S., Terry, N., Daniell, H. 2003. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol* 132:1344-1352.
- Rutter, A.P., Schauer, J.J., Shafer, M.M., Creswell, J.E., Olson, M.R., Robinson, M., Collins, R.M., Parman, A.M., Katzman, T.L., Mallek, J.L. 2011. Dry deposition of gaseous elemental mercury to plants and soils using mercury stable isotopes in a controlled environment. *Atmospheric Environ* 45:848-855.
- Saglam, N., Say, R., Denizlib, A., Patir, S., Arica, M.Y. 1999. Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to *Phanerochaete chrysosporium* mycelium. *Process Biochem* 34:725-730.
- Sánchez Dávila, J., Hurtado Custodio, J. 2009. Mercury reduction by bacteria isolated from informal mining zones. *Advanced Mater Res* 71-73:637-640.
- Sasaki, Y., Hayakawa, T., Inoue, C., Miyazaki, A., Silver, S., Kusano, T. 2006. Generation of mercury-hyperaccumulating plants through transgenic expression of the bacterial mercury membrane transport protein MerC. *Transgenic Res* 15(5):615-625.
- Sas-Nowosielska, A., Galimska-Stypa, R., Kucharski, R., Zielonka, U., Malkowski, E., Gray, L. 2008. Remediation aspect of microbial changes of plant rhizosphere in

- mercury contaminated soil. *Environ Monitoring Assess* 137:(1-3)101-109.
- Schaefer, J.K., Letowski, J., Barkay, T. 2002. *mer*-mediated resistance and volatilization of Hg(II) under anaerobic conditions. *Geomicrobiol J* 19(1):87-102.
- Sierra, M.J., Millán, R., Cardona, A.I., Schmid, T., 2011. Potential cultivation of *Hordeum vulgare* L. in soils with high mercury background concentrations. *Internat J Phytorem* 13:765-778.
- Sierra, M.J., Millán, R., Esteban, E. 2008b. Potential use of *Solanum melongena* in agricultural areas with high mercury background concentrations. *Food Chem Toxicol* 46(6):2143-2149.
- Sierra, M.J., Rodríguez-Alonso, J., Millán, R. 2012. Impact of the lavender rhizosphere on the mercury uptake in field conditions. *Chemosphere* doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.017, *In press*.
- Silver, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metals- a review. *Gene* 179:9-19.
- Sinha, A., Khare, S.K. 2010. Mercury bioaccumulation and simultaneous nanoparticle synthesis by *Enterobacter* sp. cells. *Biores Technol* 102:4281-4284.
- Sinha, A., Khare, S.K. 2012. Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation* 23(1):25-34.
- Sinha, A., Pant K.K., Khare, S.K. 2012. Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells. *Int Biodet Biodeg* 71:1-8.
- Skinner, K., Wright, N., Porter-Goff, E. 2007. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. *Environ Poll* 145:234-237.
- Sone, S., Pan-Hou, H., Nakamura, R., Sakabe, K., Kiyono, M. 2010. Roles played by MerE and MerT in the transport of inorganic and organic mercury compounds in Gram-negative bacteria. *J Health Sci* 56:123-127.
- Sorkhoh, N.A., Ali, N., Al-Awadhi, H., Dashti, N., Al-Mailem, D.M., Eliyas, M., Radwan, S.S. 2010. Phytoremediation of mercury in pristine and crude oil contaminated soils: Contribution of rhizobacteria and their host plants to mercury removal. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1998-2003.
- Sundberg-Jones, S., Hassan, S.M. 2007. Macrophyte sorption and bioconcentration of elements in a pilot constructed wetland for flue gas desulfurization wastewater treatment. *Water Air Soil Poll* 183:187-200.
- Tangahu, B.V., Abdullah, S.R.S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M. 2011. A Review on heavyMetals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Internat J Chem Engineering* 1-31.
- Urgun-Demirtas, M., Stark, B., Pagilla, K. 2006. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Crit Rev Biotechnol* 26(3):145-164.
- Vara Prasad, M.N., Oliveira Freitas, H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol* 6(3):285-321.
- Velasco-Alinsug, M.P., Rivero, G.C., Quibuyend, T.A.O. 2005. Isolation of mercury-binding peptides in vegetative parts of *Chromolaena odorata*. *Z Naturforsch* 60:252-259.
- Wagner-Döbler, I. 2003. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing

- industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:124-133.
- Wang, J., Feng, X., Anderson, C.W., Xing, Y., Shang, L. 2012. Remediation of mercury contaminated sites - A review. *J Hazard Mater* 221-222:1-18.
- Wang, Y., Greger, M. 2004. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. *J Environ Qual* 33:1779-1785.
- Wang, Y., Moore, M., Levinson, H.S., Silver, S., Walsh, C.T., Mahler, I. 1989. Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistant determinant from a *Bacillus* sp. with broad spectrum mercury resistance. *J Bacteriol* 171:83-92.
- Wang, Y.D. 2004. Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. PhD. Thesis. Department of Botany, Stockholm University, Sweden.
- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321:385-408.
- Willis, J.M. 2010. Edaphic and vegetative controls on mercury cycling in oligohaline wetlands. Degree thesis of Doctor of Philosophy, Faculty of the Louisiana, Department of Oceanography and Coastal Sciences, Southeastern Louisiana University. US USA. pp.50-53.
- Wilson, J.R., Leang, C., Morby, A.P., Hobman, J.L., Brown, N.L. 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett* 472(1):78-82.
- Zeng, X., Tagn, J., Jiang, P., Liu, H., Dai, Z., Liu, X. 2010. Isolation, characterization and extraction of *mer* gene of Hg²⁺ resisting strain D2. *Trans nonferrous Met Soc China* 20:507-512.
- Zhang, D., Pan, X., Mostofa, K.M.G., Chen, X., Mu, G., Wu, F., Liu, J., Song, W., Yang, J., Liu, Y., Fu, Q. 2010. Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *J Hazard Mat* 175(1-3):359-365.
- Zhang, H., Feng, X., Zhu, J., Sapkota, A., Meng, B., Yao, H., Qin, H., Larssen, T. 2012. Selenium in soil inhibits mercury uptake and translocation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Sci Technol* 46:10040-10046.
- Zornoza, P., Millán, R., Sierra, M.J., Seco, A., Esteban, E. 2010. Efficiency of white lupin in the removal of mercury from contaminated soils: soil and hydroponic experiments. *J Environ Sci* 22(3):421-427.