



Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

TRABAJO FIN DE GRADO
“BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS
RADIOACTIVOS”

Autor: Adrián Peño Redondo

Tutor: Federico Navarro García

Convocatorio: Junio 2018

Índice.

Resumen.....

1. Introducción.
2. Objetivos.
3. Materiales y Métodos.
4. Discusión y Resultados:
 - a. Proceso químico:
 - i. Biotransformación.
 - b. Procesos celulares:
 - i. Biosorción y bioacumulación.
 - c. Procesos físicos:
 - i. Quelación:
 1. Sideróforos.
 - d. Bioacumulación en simbiosis de planta – hongo.
 - e. Análisis genómico.
 - f. Análisis proteómico.
5. Conclusiones.
6. Bibliografía.

RESUMEN

Una gran cantidad de residuos radiactivos son generados como subproducto de la energía atómica en todo el mundo. Los residuos radiactivos se acumulan en vertederos que, de exponerse a la población y al medio ambiente, pueden causar trastornos graves que amenazan la vida. Las bacterias y arqueas han demostrado constantemente su capacidad de sobrevivir en ambientes extremos, incluso radiaciones extremas y, por lo tanto, son ideales para este tipo de eliminación. Actualmente, se está investigando en distintos tipos de biorremediación para eliminar estos residuos de forma segura. A través de la biotransformación, biosorción, bioacumulación, o la quelación, utilizando bien microorganismos silvestres o bien modificados genéticamente podemos mejorar la gestión de estos residuos. Sin embargo, todavía existe mucha información por desvelar del metabolismo microbiano en cuanto a la detoxificación de radionucleidos para poder llevar a cabo esta tarea de manera eficaz.

A large quantity of radioactive waste is being generated as the byproduct of atomic energy around the world. There are many radioactive waste dumping sites that, if exposed to the general population and the environment, may cause serious life-threatening disorders. Bacteria and archaea have consistently proven their ability to survive in extreme environments, even in the presence of extreme ionizing radiations. Therefore, these microbes are ideal for bioremediation. Currently, research on different bioremediation processes to eliminate this radioactive waste is underway. For example, biotransformation, biosorption, bioaccumulation or chelation using wild type or genetically modified microorganisms can improve the management of this waste. However, we still lack information about microbial metabolism in terms of the detoxification of radionuclides to accomplish this task appropriately.

1 - Introducción:

Los niveles elevados de elementos radiactivos en el medio ambiente resultantes de las actividades industriales o geológicas pueden ser un problema significativo para el bienestar de los ecosistemas y pueden poner en peligro la salud humana, en particular si se acumulan en la cadena alimentaria (Davies, Cox, Robinson, & Pittman, 2015). Una gran cantidad de residuos radiactivos son producidos por plantas de energía nuclear constituyendo el 95% de la radiactividad generada a partir de todas las fuentes. La Agencia Internacional de Energía Atómica estima que de 100.000 a 200.000 mujeres en Europa occidental tuvieron abortos debido a secuelas de la catástrofe de Chernóbil, ya que las reacciones ionizantes afectan al feto. A pesar de los riesgos potenciales para la salud humana, la demanda de la energía nuclear está aumentando continuamente (Kumar, Singh, & Singh, 2007).

La palabra “nucleido” se refiere a todas las agrupaciones posibles de nucleones (protones y neutrones) caracterizados por un número másico A (protones + neutrones), un número atómico Z (protones), y un número de neutrones N ($A - Z$). En lo que se refiere a nuestro texto, nos interesa el número atómico, ya que uno superior a 83 nos indicará que este nucleido es inestable (más pesado que el ^{83}Bi) con exceso de energía en su núcleo. Este tipo de nucleidos con potencial para someterse a las desintegraciones radiactivas se llama radionucleido. La manera en que el radionucleido vuelve a un estado de menos energía, y por lo tanto estable, es emitiendo radiación ionizante. Esto ocurre de manera natural, aunque el ser humano ha sido capaz de controlarlo y utilizarlo para distintas funciones. La radiación ionizante es capaz de generar iones mediante el desplazamiento de los electrones en la materia viva (como en el ADN) y de ese modo alterar su función. Los radionucleidos están presentes en la naturaleza y la exposición a ellos de los seres humanos es mínima. El problema surge cuando son liberados de forma artificial por el ser humano en grandes cantidades debido a los desechos de industrias nucleares o a catástrofes nucleares (Gupta, Chatterjee, Datta, Voronina, & Walther, 2016). Los radionucleidos más estudiados son el uranio (U), el radio (Ra), el plutonio (Pu), el tecnecio (Tc) junto con sus isótopos y diversos isótopos del cromo (Prakash, Gabani, Anuj, Ronen, & Singh, 2013).

La biorremediación es un proceso que incluye el uso de agentes biológicos tales como bacterias, hongos y plantas, para eliminar, degradar, o desintoxicar lugares contaminados. Debido a los altos costos y perturbaciones ambientales asociadas con las tecnologías actuales de limpieza, basadas en la acumulación de residuos en toneles o barriles, y su posterior enterramiento por cientos de años, la tecnología de biorremediación tiene el potencial para ser implementado en la gestión de desechos radiactivos. Los organismos más estudiados para la detoxificación de residuos radiactivos son *Deinococcus radiodurans*, *Shewanella oneidensis*, y *Geobacter sulfurreducens*. Los microorganismos tienen la capacidad de reducir los metales radiactivos a forma reducida y/o a precipitados insolubles en solución acuosa. Mecánicamente, los microorganismos son responsables de extraer electrones de compuestos orgánicos y transferirlos a un metal radiactivo como aceptor final. Este proceso disminuye su biodisponibilidad (Kumar et al., 2007).

Existen limitaciones como la inhibición del crecimiento a temperatura más alta, los requisitos específicos de sustrato y los procesos metabólicos que limitan la capacidad de adaptación microbiana a la remediación del sitio. Tales restricciones reducen considerablemente la eficacia de los microorganismos para desintoxicar los radionucleidos, aunque para sobrepasar estas limitaciones se están desarrollando microorganismos genéticamente modificados (Kumar et al., 2007).

Aun así, existen varias ventajas que hacen a los microorganismos ideales para la eliminación de residuos como su facilidad de cultivar, su adaptabilidad a diferentes ambientes y su supervivencia en ambientes extremos (Shukla, Parmar, & Saraf, 2017).

En esta revisión estudiaremos los distintos tipos de biorremediación existentes y la repercusión que pueden tener en la eliminación de desechos radiactivos.

2 - Objetivos:

El objetivo del siguiente trabajo es dar a conocer y poder explicar las técnicas existentes en el campo de la biorremediación, recalcando la importancia que puede llegar a tener la comprensión y el dominio de ellas en una época donde cada vez se generan más residuos radiactivos, y la eliminación de estos será muy necesaria.

3 - Materiales y métodos:

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica a partir de bases de datos científicas tales como **PubMed**, **Sciencedirect** y **Medline**. La búsqueda de información se ha llevado a cabo a través de artículos y revisiones en revistas como “*Journal of Basic Microbiology*” o “*Journal of Environmental Radioactivity*”. Además, se han elaborado tablas o gráficos explicativos del texto utilizando los programas informáticos Microsoft Word y Paint. A su vez, se ha utilizado el programa Mendeley para el manejo de la bibliografía.

4 - Resultados y Discusión:

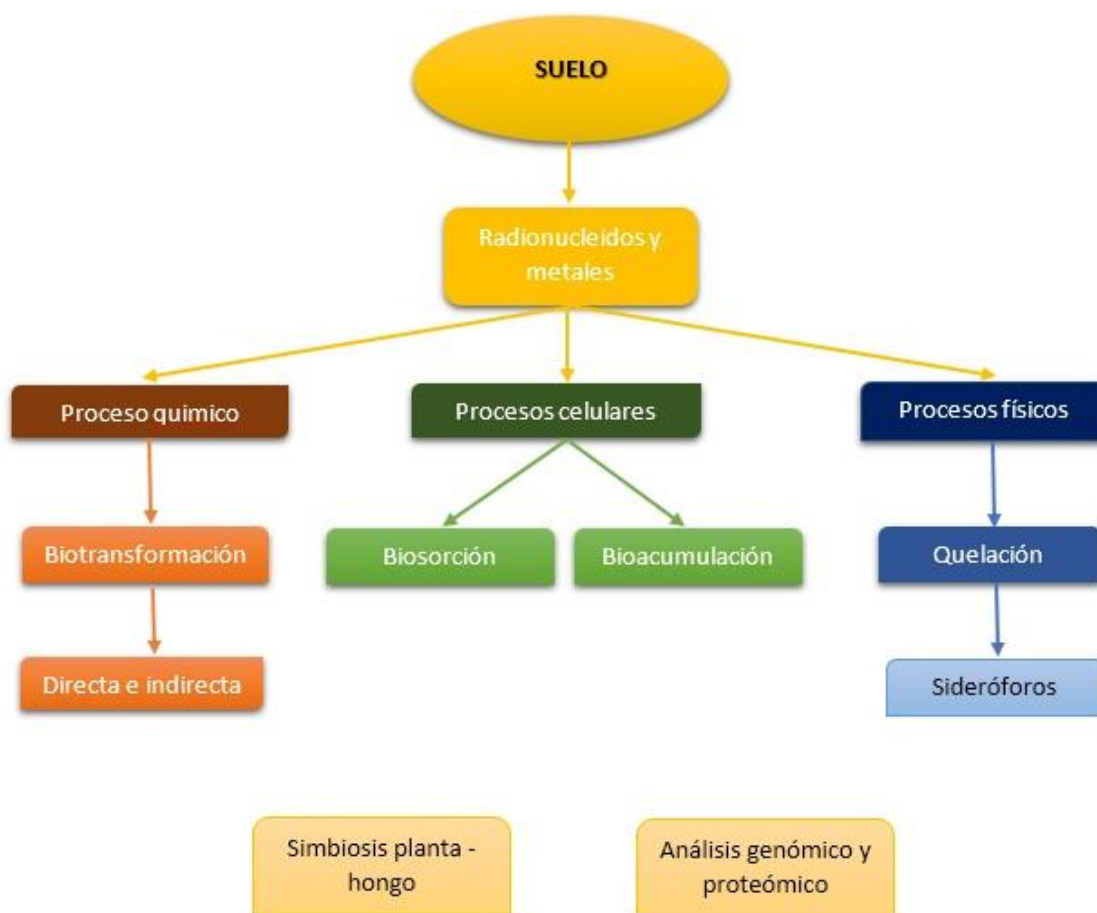


Fig.1. Distintos tipos de interacción entre microorganismos y radionucleidos.

Con el fin de hacer más comprensible este trabajo hemos procedido a presentar las distintas alternativas existentes en los procesos de biorremediación.

a. Proceso químico:

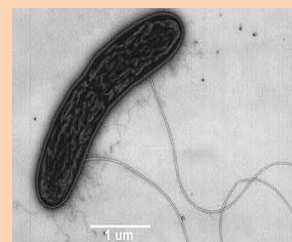
El proceso químico capaz de convertir radionucleidos como el uranio (U), el tecnecio (Tc), y el cromo (Cr) de su forma oxidada (soluble y móvil) a su forma reducida (insoluble e inmóvil, y, por lo tanto, precipitable) llevado a cabo por organismos se denomina *biotransformación*. (Humphries & Macaskie, 2002). La forma del metal (óxido, sulfuro, iónico, complejo inorgánico), la disponibilidad de donantes de electrones y nutrientes, la presencia de aceptores de electrones (Fe^{3+} , Mn^{4+} , NO_3^- o SO_4^{2-}) y los factores ambientales (pH, temperatura, humedad) afectan al tipo y al alcance de la actividad microbiana (Taylor, 2015).

Hay dos tipos de biotransformaciones: directa e indirecta.

- Directa: La acción directa incluye el metabolismo de la bacteria que, con la ayuda de electrones procedentes de componentes orgánicos no peligrosos como acetato o lactato, es capaz de reducir metales y radionucleidos que posteriormente precipitarán disminuyendo su biodisponibilidad.
- Indirecta: En este caso, el microorganismo no intervendrá directamente y será a través de una serie de reducciones y oxidaciones por medio del hierro, manganeso y sulfato como podrá transformar el uranio, tecnecio y cromo en compuestos menos biodisponibles. En una primera etapa se reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} , Mn^{4+} a Mn^{2+} y sulfato a H_2S , y, estos compuestos transformados, reducirán el uranio, el cromo y el tecnecio a formas inmóviles. (Taylor, 2015).

Ejemplo de biotransformación directa

En la especie *Geobacter sulfurreducens* se ha demostrado "in vitro" la intervención de un mecanismo citocromo c periplasmático para la reducción de uranio, mientras que el tecnecio se ha podido comprobar su reducción por otro mecanismo basado en una hidrogenasa periplasmática Ni/Fe que utiliza hidrógeno como donador de electrones (McCullough et al., 2003).



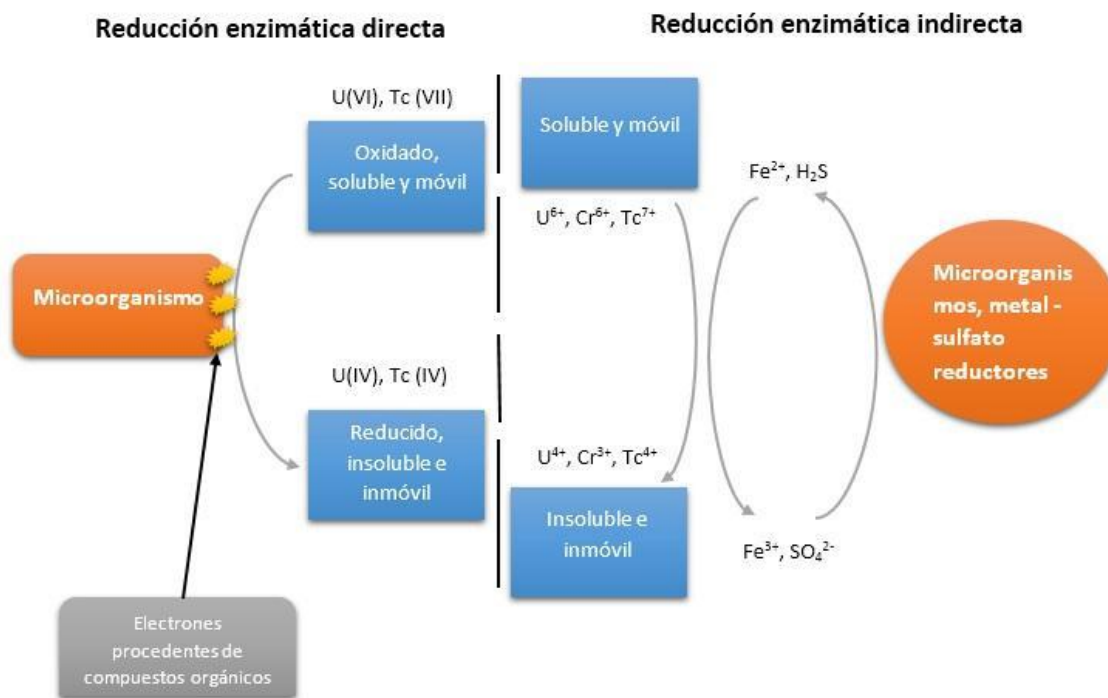


Fig.2. Reducción enzimática directa e indirecta.

b. Procesos celulares:

Dentro de los procesos celulares que pueden llevar a cabo los microorganismos vamos a encontrar dos tipos que son: *biosorción* y *bioacumulación*.

La *biosorción* consiste en el secuestro de iones metálicos cargados positivamente por la pared celular o por el glucocálix, conjunto de exopolisacáridos y proteínas que se acumulan en el exterior de la pared (Prakash, Gabani, Anuj, Ronen, & Singh, 2013).

Por lo tanto, la estructura más importante en este mecanismo es la pared celular, la cual en bacterias Gram positivas está formada por una proporción de peptidoglicano superior a la de bacterias Gram negativas. La importancia del peptidoglicano reside en la gran cantidad de grupos ionizables que contiene (como grupos amino y carboxilo, ver figura 3). En el caso de las Gram negativas los grupos ionizables fosfato y carboxilo procederán del lipopolisacárido (Mejía, 2006).

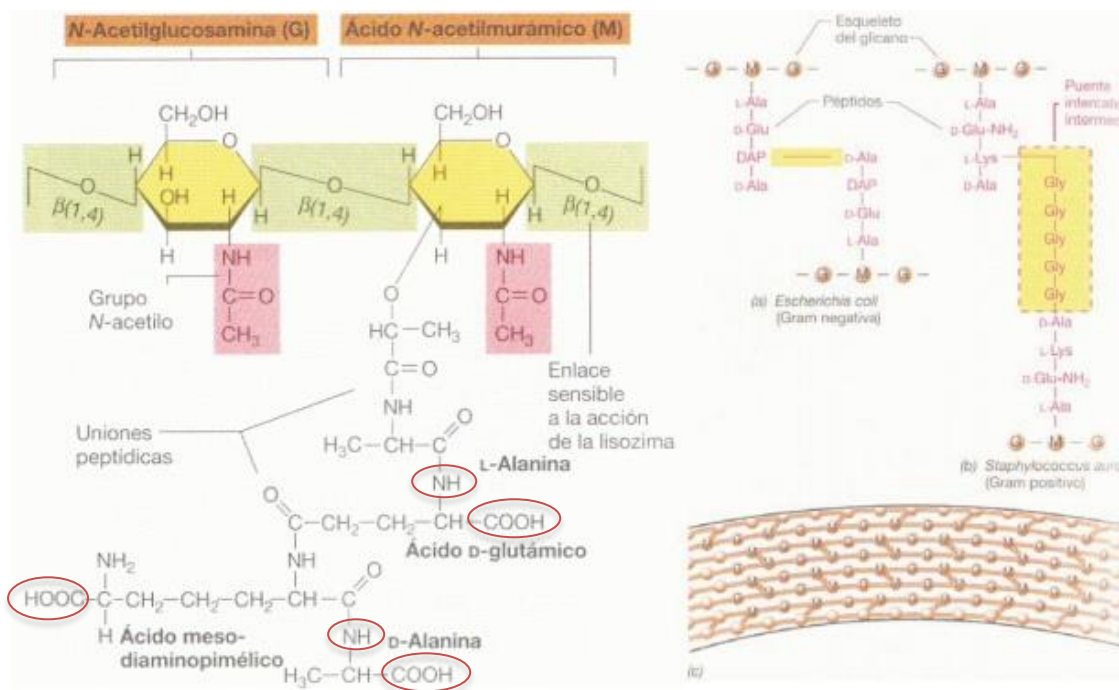


Fig.3. Estructura del peptidoglicano (Mejía, 2006).

Por otro lado, en el glucocálix sucede igual que en la pared celular, las glicoproteínas y polisacáridos que lo forman contienen grupos funcionales como amino, alcohol, o hidroxilo capaces de ionizarse.

Las cargas de los grupos ionizables mencionados conducirán a la adsorción de los radionucleidos sobre la superficie celular (Shukla, Parmar, & Saraf, 2017).

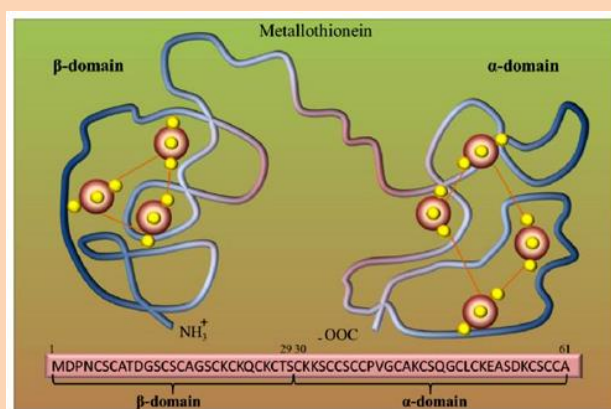
Las mayores limitaciones de la biosorción son la desorción debido a competencia con otros cationes o la saturación de los sistemas de biosorción. Por lo tanto, la biosorción está destinada principalmente a eliminar radionucleidos en baja concentración. (Merroun & Selenska-Pobell, 2008).

Tras la biosorción de los radionucleidos, los microorganismos pueden llevar a cabo la *bioacumulación* de los mismos, que consiste en la concentración del radionucleido dentro del organismo. No existe mucha información acerca de lo que ocurre una vez el radionucleido entra dentro de la célula más allá de la conocida existencia de transportadores específicos que dirigen al radionucleidos al interior celular (Merroun & Selenska-Pobell, 2008), y en el caso de las especies como

Citrobacter y *Halomonas*, la acumulación de U^{6+} en el interior celular a través del enlace con fosfato formando hidrofosfato o polifosfato.

Una mirada al futuro

También cabe mencionar la presencia de una serie de proteínas de bajo peso molecular localizadas en el interior de las células bacterianas llamadas metalotioneínas capaces de activarse en exposición a metales pesados como mecanismo de defensa frente a esta toxicidad. Estas proteínas están formadas por un alto contenido del aminoácido cisteína, el cual contiene grupos ionizables amino y carboxilo mencionados anteriormente, lo que favorecería la unión a metales pesados. No se ha demostrado hasta la fecha la capacidad de estas proteínas en la unión a radionucleidos, pero es una línea a investigación a destacar en el futuro (Acharya, 2016) (Mejía, 2006) .



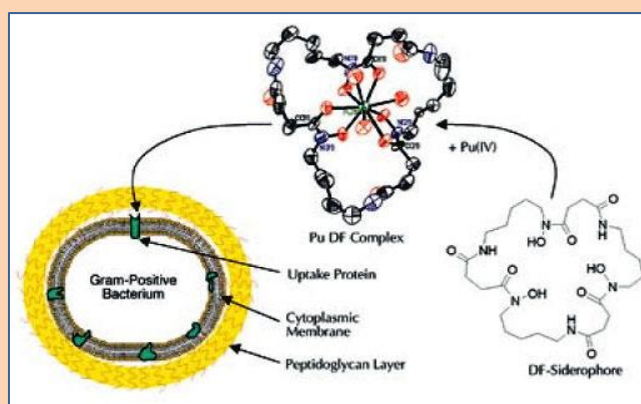
c. Procesos físicos:

Existe un único proceso físico en la biorremediación, la quelación. Un agente quelante es un compuesto orgánico que forma complejos a través de dos o más enlaces de coordinación con un ion metálico central. El producto es un anillo heterocíclico con el átomo de metal central como parte del anillo. La quelación más habitual es a través de sideróforos.

Los sideróforos son moléculas peptídicas de bajo peso molecular quelantes del hierro secretadas por microorganismos. Su función es captar hierro y transportarlo al interior de la célula en un proceso dependiente de energía. Son importantes en suelos aeróbicos, ya que en este tipo de suelos predomina el hierro en estado férrico (Fe^{3+}) frente al estado ferroso (Fe^{2+}), y presenta una baja solubilidad en agua por lo que no puede ser adquirido como ion libre por los microorganismos del suelo, y es ahí cuando actúan los sideróforos. Diversos estudios han demostrado que se forman complejos entre sideróforos y radionucleidos, cuya absorción es importante en la interacción entre microorganismos y radionucleidos (McCullough et al., 2003).

Ejemplo de sideróforos

Se ha podido comprobar que *Microbacterium flavescens* es capaz de captar plutonio por el mismo mecanismo que utiliza para conseguir hierro. Las bacterias fueron incubadas con el sideróforo desferrioxamina, además de Pu^{4+} , Fe^{3+} y U^{6+} . Usando proteínas transportadoras, las células captan el complejo sideróforo-plutonio, aunque mucho más despacio que cuando captan el complejo sideróforo-hierro; sin embargo, no llega a conseguir captar el complejo sideróforo-uranio. Los complejos de hierro y plutonio compiten por los mismos sitios de unión o por los mecanismos de transporte del microorganismo ya que inhiben mutuamente su absorción. Esto no es sorprendente, debido a que las estructuras de los complejos son similares, lo que sugiere que posiblemente podrían ser reconocidos por el mismo sistema de captación bacteriana (McCullough et al., 2003).



d. Bioacumulación en simbiosis hongo – planta:

Las micorrizas arbusculares (AM) es un tipo de interacción hongo-planta formado por hongos simbióticos del *phylum Glomeromycota*. Suelen colonizar raíces desarrollando hifas inter e intracelularmente denominadas arbusculos y, en algunas especies, vesículas. El arbusculo es una estructura altamente ramificada producida por hongos dentro de las células de la raíz de la planta huésped y constituye el sitio principal de intercambio de sustancias entre plantas y hongos (Balestrini & Lumini, 2017).

Existen evidencias de que las AM pueden favorecer la acumulación y tolerancia de radionucleidos, con acumulación preferencial en las hifas fúngicas. Hasta ahora no existen estudios del efecto de AM sobre las plantas en la acumulación de uranio o productos de su desintegración (Davies et al., 2015). Sin embargo, unos pocos estudios han investigado sobre aspectos de la translocación de ^{238}U en AM asociadas a plantas.

Rhizophagus irregularis

Un ejemplo interesante es el del uso de *Rhizophagus irregularis* en la absorción de ^{238}U a través de un sistema de dos compartimentos. En este ensayo se cuantificaba la transferencia de U desde un compartimento donde se encontraban las hifas a un compartimiento en el que se encontraban raíces de zanahorias infectadas por hongos viendo que era mayor en el compartimiento de hifas (Rufyikiri et al., 2004)



¿Cómo se acumula el uranio dentro de la hifa? Al igual que en la bioacumulación ya explicada, el uranio suele acumularse formando complejos con fosfato, carbono o sulfato. Para conocer dónde se acumulan estos complejos o en el caso de que el radionucleido estuviera libre existen técnicas de espectroscopía como

EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*) y la fluorescencia de rayos X (*synchrotron-based X-ray fluorescence, XRF*), que nos permiten conocer el lugar de acumulación dentro del hongo o la planta, incluso el grado de oxidación del radionucleido. La problemática principal de estas técnicas se encuentra en la capacidad de producir y preservar un sistema raíz-AM para poder ser analizado ya que los tejidos y estructuras intracelulares son fácilmente degradables durante la preparación y el análisis de las muestras (Davies et al., 2015).

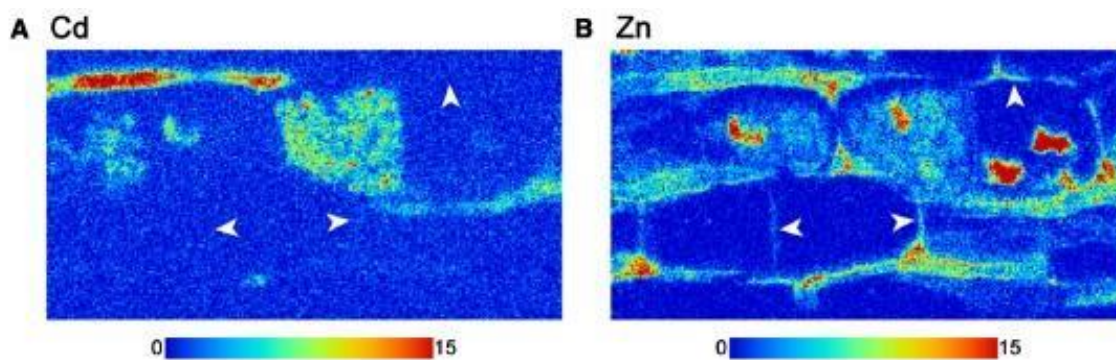


Fig.5. XRF de Cd y Zn dentro de *Lotus japonicus* y *Rhizophagus irregularis* AM (Davies et al., 2015).

Muchos de los estudios disponibles sobre la transferencia de uranio a plantas – hongos carecen de relevancia ecológica debido al uso de cultivo hidropónicos, en los cuales no se pueden estudiar todas las variables existentes sobre el terreno real, como la adsorción de radionucleidos por el suelo. Para poder estudiar todas las variables presentes en un sistema ecológico real es necesario utilizar suelos procedentes de zonas contaminadas (Davies et al., 2015).

Por lo tanto, lo ideal sería poder encontrar la mejor asociación entre hongo y planta para una detoxificación de radionucleidos más efectiva, pero no es tan sencillo debido a problemas como: una planta puede ser colonizada por más de una especie de hongo que puede formar AM o no; por la selectividad existente entre las distintas especies de hongos y las plantas, además de que algunas especies de hongos pueden disminuir los niveles de fosfato afectando directamente a la unión entre fosfato y radionucleido importante para la acumulación del contaminante; y la dificultad de determinar la contribución de hongo y planta por separado, ya que el hongo AM no puede ser cultivado sin la planta simbiote (Davies et al., 2015).

Para poder estudiar la diferencia existente entre la acumulación de radionucleidos en una planta simbiote y una planta sin hongo se podría utilizar el experimento llevado a cabo por Johnson, Leake, & Read, el cual trató de esclarecer la diferencia de acumulación de fosfato entre estas dos situaciones. Este experimento estaba formado por una parcela de suelo que contenía hongos y nutrientes, donde se situaron varios tubos de plástico que contenían, a su vez, una planta cebo. Parte del tubo se eliminó y se cubrió con una malla de nylon para impedir el crecimiento de la raíz fuera de él, pero permitiendo que las hifas penetrarían dentro e infectarán la planta cebo. Varios de esos tubos podían girar, por lo que eran capaces de romper en el giro las hifas, siendo estos tubos control sin colonización de hongo (Johnson, Leake, & Read, 2001).

En el caso de Johnson, Leake, & Read se demostró la mayor capacidad para acumular fosfato por parte de la planta simbiote frente a la planta no simbiote, en nuestro caso, teniendo una parcela de suelo contaminado por radionucleidos, podríamos demostrar qué asociación es más eficaz para la acumulación de radionucleidos (Davies et al., 2015).



Fig.6. Representación del experimento para examinar los efectos de la colonización de AM en acumulación de radionucleidos (Davies et al., 2015).

e. Análisis genómico:

El genoma contiene toda la información sobre las funciones que puede realizar un microorganismo por lo que su secuenciación y posterior registro en bases de datos es de vital importancia para poder saber qué estructura realiza una función determinada, en este caso, para poder conocer todos los mecanismos que actúan en la biorremediación de radionucleidos dentro parte del microorganismo. A continuación, se detallará la importancia de distintos aspectos del genoma de tres microorganismos involucrados en la biorremediación de radionucleidos: *Geobacter sulfurreducens*, *Deinococcus radiodurans* y *Shewanella oneidensis*.

Geobacter sulfurreducens es un representante del *phylum Proteobacteria*, dentro de la familia *Geobacteraceae*, familia caracterizada por ser el grupo dominante de los microorganismos reductores de Fe^{3+} y ser capaz de reducir radionucleidos como U^{6+} y Tc^{7+} , como se hizo referencia en el apartado de biotransformación. Se encuentra principalmente en gran variedad de acuíferos y entornos subterráneos, y por estas razones, es un gran candidato para la biorremediación en ambientes anaeróbicos del subsuelo. Como ya fue explicado en el apartado de biotransformación, *Geobacter sulfurreducens* utiliza un citocromo c periplasmático para la reducción del uranio. A través del análisis de su genoma, se ha podido descubrir la existencia de dos citocromos: GscA y OmcS. El papel de los dos citocromos que se encuentran en el pili de esta bacteria es el de facilitar electrones para la reducción de U^{6+} a U^{4+} . (McCullough et al., 2003) (Yun, Malvankar, Ueki, & Lovley, 2016).

Deinococcus radiodurans pertenece al *phylum Deinococcus-Thermus*, dentro de la familia *Deinococcaceae*, el cual es capaz de sobrevivir a niveles extremadamente altos de radiación (150.000 grays mientras que una dosis de 500 grays es fatal para los humanos) y posee una habilidad inusual para reparar el daño resultante en su ADN. La secuenciación de su genoma reveló la existencia de dos cromosomas, un megaplásmido y un plásmido pequeño que contribuyen a la capacidad del microorganismo para sobrevivir en condiciones de inanición, estrés oxidativo y gran cantidad de daño en su ADN. A su vez, se ha comprobado que la introducción del gen *merA* de *Escherichia coli* le dota de la capacidad para detoxificar mercurio y tolueno (contaminantes radiactivos) (Brim et al., 2000). También se ha demostrado la

capacidad de *D. radiodurans* para detoxificar Cr^{7+} , U^{6+} y Tc^{7+} , por lo que es un candidato óptimo para la biorremediación de desechos radiactivos de alto nivel, así como de residuos radiactivos que contengan componentes orgánicos y metálicos (McCullough et al., 2003).

Asimismo, el estudio del genoma de *Shewanella oneidensis*, una bacteria del phylum *Proteobacteria*, perteneciente a la familia de *Shewanellaceae*, indica la posibilidad de que la bacteria puede crecer aeróbicamente o anaeróbicamente, utilizando diferentes aceptores de electrones, como el nitrito, nitrato, tiosulfato, hierro, manganeso y uranio. También reveló la posibilidad de reducir enzimáticamente radionucleidos y metales como uranio, tecnecio, y cromo, precipitando sus formas solubles (McCullough et al., 2003).

f. Análisis proteómico:

La proteómica es una nueva rama de la ciencia dedicada al estudio de las proteínas expresadas por una célula y cómo estas cambian bajo diferentes condiciones de crecimiento. En este caso, nos interesa conocer que proteínas son sobreexpresadas por los distintos microorganismos en ambientes de alta contaminación. Un ejemplo de su utilidad es el estudio del patrón de expresión de proteínas del organismo *Shewanella oneidensis*, cuya respiración se puede acoplar a la reducción de U^{6+} a U^{4+} . En este microorganismo, las proteínas sobreexpresadas durante la reducción de uranio se encuentran en la membrana externa de la célula. A su vez, a través del estudio del proteoma de este microorganismo se ha podido determinar la existencia de vesículas de membrana, exclusivas de Gram negativas, que contienen varias enzimas y son liberadas constantemente al periplasma celular durante el crecimiento bacteriano. Estas enzimas son utilizadas por el microorganismo para producir daño a otras bacterias o células eucariotas, pero se ha demostrado la capacidad que tienen de degradar metales y radionucleidos, como *merB*, encargada de regular la biodegradación del mercurio, y el citocromo c3 capaz de degradar U^{6+} a U^{4+} (McCullough et al., 2003).

5 - Conclusiones:

Tras la realización de este trabajo hemos extraído las siguientes conclusiones:

- El empleo de la biorremediación en suelos contaminados por radionucleidos es menos perjudicial para el medio ambiente y los seres humanos, por el sólo hecho que son detoxificados por microorganismos existentes en el propio ambiente.
- Los tres procesos existentes en el ámbito de la biorremediación bacteriana, químicos, celulares y físicos, son compatibles entre sí y son llevados a cabo con el mismo objetivo, detoxificar radionucleidos.
- El éxito de la biorremediación en un futuro cercano depende del conocimiento que adquiramos en cuanto a las estructuras que actúan en cada microorganismo durante la detoxificación del radionucleido, y tanto el estudio genómico como el proteómico, nos ayudarán a conocer dichas estructuras.
- No sólo las bacterias actúan en el proceso de biorremediación, también los hongos como las plantas desarrollan un papel importante en la detoxificación de radionucleidos, y se ha comprobado que la asociación de ambas en simbiosis es más eficaz a la hora de detoxificar.

6 - Bibliografía:

1. Acharya C, Blindauer A. (2016). Unexpected Interactions of the Cyanobacterial Metallothionein SmtA with Uranium, *Inorganic Chemistry*, 55(4), 1505-1515. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b023271>.
2. Balestrini, R., & Lumini, E. (2017). Focus on mycorrhizal symbioses. *Applied Soil Ecology*, (November 2016). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.001>
3. Brim, H., McFarlan, S. C., Fredrickson, J. K., Minton, K. W., Zhai, M., Wackett, L. P., & Daly, M. J. (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 18(1), 85-90. <https://doi.org/10.1038/71986>
4. Davies HS, Cox F, Robinson CH and Pittman JK (2015) Radioactivity and the environment: technical approaches to understand the role of arbuscular mycorrhizal plants in radionuclide bioaccumulation. *Front. Plant Sci.* 6:580. <https://doi:10.3389/fpls.2015.00580>
5. Gupta, D. K., Chatterjee, S., Datta, S., Voronina, A. V, & Walther, C. (2016). Radionuclides: Accumulation and Transport in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 241, 139-160. https://doi.org/10.1007/398_2016_7
6. Humphries, A. C., & Macaskie, L. E. (2002). Reduction of Cr (VI) by *Desulfovibrio vulgaris* and *Microbacterium* sp. *Biotechnology Letters*, 24, 1261-1267. <https://doi.org/10.1023/A:1016257908574>.
7. Johnson, D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2001). Novel in-growth core system enables functional studies of grassland mycorrhizal mycelial networks. *New Phytologist*, 152(3), 555-562. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00273.x>
8. Kumar, R. A. J., Singh, S., & Singh, O. M. V. (2007). Bioremediation of Radionuclides: Emerging Technologies. *A Journal of Integrative Biology*, 11(3), 295-304. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0013>
9. McCullough, J & Hazen, Terry. (2003). Bioremediation of Metals and Radionuclides: What It Is and How It Works (2nd Edition). 10.2172/820771

10. Mejía Sandoval, Gregory (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos, *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428096010>
11. Merroun, M. L., & Selenska-Pobell, S. (2008). Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective. *Journal of Contaminant Hydrology*, 102(3-4), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2008.09.019>
12. Prakash, D., Gabani, P., Anuj, K., Ronen, Z., & Singh, O. V. (2013). Minireview Bioremediation: a genuine technology to remediate radionuclides from the environment, *Environmental Contamination and Toxicology*, 6, 349-360. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12059>
13. Rufyikiri, G., Huysmans, L., Wannijn, J., Van Hees, M., Leyval, C., & Jakobsen, I. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. *Environmental Pollution*, 130(3), 427-436. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.12.021>
14. Shukla, A., Parmar, P., & Saraf, M. (2017). Radiation, radionuclides and bacteria: An in-perspective review. *Journal of Environmental Radioactivity*, 180, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.09.013>
15. Taylor, P. A (2015). *Physical, chemical, and biological treatment of groundwater at contaminated nuclear and NORM sites. Environmental Remediation and Restoration of Contaminated Nuclear and Norm Sites*. En: *Environmental Remediation and Restoration of Contaminated Nuclear and NORM Sites*, L van Velzen, 237-255. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-231-0.00010-7>
16. Yun, J., Malvankar, N. S., Ueki, T., & Lovley, D. R. (2016). Functional environmental proteomics: Elucidating the role of a c-type cytochrome abundant during uranium bioremediation. *ISME Journal*, 10(2), 310-320. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.113>