



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMOS DE RESISTENCIA Y  
ACUMULACIÓN DE CROMO EN EL  
PROTISTA EUGLENA GRACILIS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :  
GARCÍA GARCÍA JORGE DONATO

Tutor: DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.

Septiembre 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# MECANISMOS DE RESISTENCIA Y ACUMULACIÓN DE CROMO EN EL PROTISTA EUGLENA GRACILIS

## 2. RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Rafael Moreno Sánchez	Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dr. Carlos Cervantes Vega	IIQB, UM

El proyecto fue apoyado por el CONACyT (60517). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Carlos Cervantes Vega	IIQB, UM
Secretario	Dr. Rafael Vásquez Duhalt	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	IIB, UNAM
Suplente	Dr. Wilhelm Hansberg Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

### **3. Dedicatoria:**

Este trabajo esta dedicado a la persona que ha dado a mi vida soporte, estabilidad y sentido desde el momento en que la conocí en la Facultad de Química y muy especialmente durante mi maestría. A mi amiga, mi compañera y mi esposa . . .

Paulina A. Ramos Espinosa.

Pau:

Agradezco tu paciencia, tu comprensión, tu apoyo, tu entusiasmo, tu valentía, tu confianza, tu cariño y tu sonrisa cada mañana que salimos a nuestros respectivos laboratorios, cada día que compartimos aventuras nuevas y cada momento en que compartimos una idea y un sueño.

#### 4. Agradecimientos:

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por permitirme crecer bajo su tutoría tanto en el ámbito académico como en el personal.

Al Dr. José Salud Rodríguez Zavala por su orientación atenta en cada ocasión que me acerqué a él con una duda.

A todos y todas mis compañer@s investigadores que laboran en el departamento de Bioquímica del INC ya que me han permitido tener una relación laboral y amistosa muy fructífera y placentera.

A mis padres (Lidia y Donato) de quien no termino de estar agradecido por la educación que me han dado, así como el respeto y apoyo que siempre han mostrado a mi vida y a mis ideales. Los quiero y los respeto, taxa vi ni, ni ku ta vi ndo.

A mis hermanos (Ana Patricia, Laura Elena y César Emilio) por escucharme y criticarme con las palabras adecuadas que solamente un hermano puede expresar a su semejante.

A mi gran familia Ñu Davi, por ser una familia unida, fuerte y con ganas de aprender y de ser mejores día a día. Esa energía positiva es muy importante para mí.

A mis suegros (Celso y Rafaela) por sus consejos y orientación en el área de la investigación. Agradezco su interés en mi vida académica y personal.

A mi *alma mater*, la UNAM, a quién siempre le estaré agradecido por darme cobijo académico y formación profesional. Especialmente a la Facultad de Química, quién me recibió como un alumno de preparatoria y que hoy me permite llegar a ser Maestro en Ciencias.

## 5. Índice:

	página
1. Carátula	1
2. Reconocimientos	2
3. Dedicatoria	3
4. Agradecimientos	4
5. Índice	5
6. Abreviaturas	6
7. Introducción	7
7.1.- Contaminación ambiental por metales pesados	7
7.2.- Aspectos generales del cromo hexavalente	11
7.3.- Mecanismos de citotoxicidad del Cr (VI)	13
7.4.- Resistencia y acumulación del Cr (VI) en las bacterias, los hongos, las levaduras y las bacterias	14
7.5.- <i>E. gracilis</i> como modelo para la biorremediación del Hg, el Cd, el Pb y el Zn	16
7.6.- Exposiciones de <i>Euglena gracilis</i> a Cr(VI)	20
I.G.- Vía de asimilación del sulfato	22
8. Justificación de hipótesis	25
9. Hipótesis	26
10. Objetivos	26
11. Metodología	
11.1.- Cultivo de <i>Euglena gracilis</i> fotosintética	27
11.2.- Medición de la clorofila	28
11.3.- Medición de la proteína	28
11.4.- Medición de transporte de $\text{CrO}_4^{2-}$	29
11.5.- Protocolo de exposición de <i>E. gracilis</i> a $\text{K}_2\text{CrO}_4$ para determinar Cromo <sub>total</sub> y tioles en condición de alta densidad celular	
11.6.- Medición de Cromo <sub>total</sub>	31
11.7.- Determinación de tioles	32
11.8.- Determinación de cromo hexavalente con DFC.	33
11.9.- Protocolo para determinar el consumo y producción de oxígeno en <i>Euglena gracilis</i> .	34
11.10.- Medición de consumo y producción de oxígeno	35
12.- Resultados.	
12.1.- Susceptibilidad	36
12.2.- Transporte celular de $\text{CrO}_4^{2-}$ .	42
12.3.- Remoción	46
12.4.- Compartimentación	58
12.5.- Quelación	61
13.- Discusión.	68
14.- Conclusiones.	87
15.- Perspectivas.	88
16.- Bibliografía.	90

## 6. Abreviaturas:

Cys.....	Cisteína
GSH.....	Glutati3n
$\gamma$ -EC.....	Gama glutamil-cisteína
FQ.....	Fitoquelatinas
SAP.....	Sulfur Assimilation Pathway
IC <sub>50</sub> .....	Inhibitory concentration 50
H.....	Medio de cultivo Hutner con 2.82 mM de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
H1.....	Medio de cultivo Hutner con 0.8 mM de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Fosfato de potasio
EGTA.....	Ethylene glycol tetra-acetic acid
DTT.....	Dithiothreitol
ASS.....	Atomic absorption spectroscopy
HPLC.....	High performance liquid chromatography
TFA.....	Trifluoroacetic acid
DTNB.....	Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid
PCA.....	Perchloric acid
DFC.....	Diphenilcarbazide
KCl.....	Cloruro de potasio
MOPS.....	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid
$K_m$ .....	Constante de afinidad de la enzima por su sustrato
$K_i$ .....	Constante de afinidad de la enzima por un inhibidor
$V_{max}$ .....	Velocidad máxima de la enzima

## 7. Introducción:

### 7.1.- Contaminación ambiental por metales pesados

En el medio ambiente se encuentran presentes metales pesados como el  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ , entre otros que al tener contacto con los seres vivos les causan efectos tóxicos. El cromo hexavalente (Cr (VI)) es uno de ellos y es considerado cancerígeno para los humanos (Valko et al, 2005). Hay otros metales pesados que se consideran esenciales, sin embargo, cuando se encuentran en los organismos en concentraciones mas altas a las normales, tienen efectos tóxicos, algunos de ellos son el  $Cu^{2+}$ , el  $Zn^{2+}$ , el  $Ni^{2+}$  y el  $Co^{2+}$  (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). El como trivalente (Cr (III)) esta considerado dentro de este grupo ya que es menos tóxico respecto al Cr (VI) debido que no puede atravesar las membranas biológicas. El Cr (III) en forma de cromo-tris-picolinato es recomendado para el el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos. La USNAS (United States National Academy of Science) establece como requerimiento un intervalo de 50-200  $\mu g$  de Cr (III) diarios en la dieta de una persona adulta (Gaggelli et al, 2002).

Se calcula que la contaminación mundial anual por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos (Nriagu, Pacyna, 1998). En la TABLA 1 se puede ver el aporte de cada industria a la contaminación ambiental. Es interesante observar que la industria textil, curtidora y galvanoplástica generan una mayor cantidad de metales pesados que otras actividades industriales consideradas más contaminantes, como la petroquímica y la hulera. Sin embargo, no son las únicas fuentes de contaminación, hay una contribución de origen residencial, la cual está dada principalmente por el uso de productos de lavandería. En los detergentes se encuentran presentes metales pesados como el As (< 20 ppm), el Zn (< 7.8 ppm), el Cr (< 1 ppm), el



Cd (< 1 ppm) y el Cu (< 0.5 ppm) (Armienta-Hernández y Rodríguez-Castillo, 1995; Moreno-Sánchez, Devars, 1999).

TABLA 1. Concentraciones de los metales pesados en las aguas residuales de industrias y en algunos cuerpos de agua de México ( $\mu\text{g/L}$ ). \* Valores permisibles NOM-127-SSA1-1994

Industria/Sistema	As 0.05*	Cd 0.005*	Cr <sub>Total</sub> 0.05*	Cu 2*	Hg 0.001*	Fe 0.3*	Ni	Pb 0.025*	Zn 5*
León, Guanajuato <sup>a</sup>			50,000						
Laguna San Andrés, Tamps <sup>b</sup>		0.33		1.82		23.4	1.08	1.38	5.12
Valle Zimapan <sup>c</sup>	400								
Matamoros, Tamps <sup>d</sup>				50- 340			210- 1450	50- 400	
Textil <sup>e</sup>			300	300		5,600			100
Curtidora <sup>e</sup>			260- 780						
Río Blanco <sup>e</sup>	2-18		50-400	10-50	2-8		40- 120	35	20- 120
Metal mecánica <sup>e</sup>			280	600		1,500		120	
Galvanoplastia <sup>e</sup>		4	73,000	6,400		12,500	74	220	1,260
Polímeros sintéticos <sup>e</sup>		20	40		89			16	
Petroquímica secundaria <sup>e</sup>			120	70	157				

<sup>a</sup>Armienta et al, 2001; <sup>b</sup>Vazquez et al, 1995; <sup>c</sup>Ongley et al, 2007; <sup>d</sup>Owens, Niemeyer,

2006; <sup>e</sup>Moreno-Sánchez, Devars, 1999

Los metales pesados contenidos en cuerpos de agua pueden concentrarse en organismos que tengan contacto con ella (Ver Tabla 2). La retención de metales en los suelos depende de condiciones fisico-químicas tales como: salinidad, temperatura, tamaño de partícula y pH.

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados en organismos animales y vegetales (mg/Kg peso seco)

Organismo	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Ostión <i>Crassostrea virginica</i> <sup>a</sup>	2.51		48.3	3.39	5.81	
Pejerrey <i>Odontesthes bonariensis</i> <sup>b</sup>	0.2	0.05	0.024			
Sorgo (hojas) <sup>c</sup>		1.75				
Maíz (hojas) <sup>c</sup>		1.8				
Trigo (raíz/hojas) <sup>c</sup>		5.5/7.5				
Espinaca <sup>d</sup>	0.65		21	50	16	130
Lechuga <sup>d</sup>	0.6		45	110	15	100
Zanahoria <sup>d</sup>	0.5		25	160	15	140
Asparagus bean <i>Vigna unguiculata</i> <sup>e</sup>	1.2				486	1114

<sup>a</sup>Vazquez et al, 1995; <sup>b</sup>Carriquiriborde, Ronco, 2008; <sup>c</sup>Armienta et al, 2001;

<sup>d</sup>Fytianos et al, 2001; <sup>e</sup>Zhu et al, 2007

En plantas, la acumulación depende de la etapa de desarrollo, de la disponibilidad del metal y de la distribución del metal en las partes de la planta (raíz, tallo, hojas), siguiendo procesos similares a los que llevan a cabo cuando toman micronutrientes de la tierra de cultivo (Vazquez et al, 1995; Fytianos et al, 2001).

Se calcula que en la ciudad de León, Guanajuato el 80% del cromo en las aguas de desecho provienen de aproximadamente 600 industrias curtidoras. Esta agua contaminada se desecha directamente al sistema de drenaje municipal, el cual desemboca en el río Mastrazo. Finalmente, esta agua es usada para irrigar los campos de cultivo. A esta contaminación se tiene que sumar la generada por las fuentes antropogénicas, naturales y de otras industrias (Armienta et al, 2001).

Ante este problema se han adoptado diversas estrategias para eliminar al cromo y otros metales pesados de aguas residuales. Las metodologías que dependen de procesos químicos, como extracciones, precipitaciones o afinidad con resinas, requieren un gasto elevado tanto en tecnología como en energía. Esto ha llevado a buscar soluciones alternativas al problema de contaminación por metales (Maine et al, 2004; Choo, et al, 2006).

La biorremediación ha sido una propuesta ampliamente estudiada para descontaminar suelos y aguas. Se ha reportado que la fitorremediación cumple con la característica de concentrar a los metales pesados en la estructura de la planta, a lo que le sigue retirar a la planta y confinarla en un sitio adecuado (Atlas, Unterman, 1999).

El planteamiento de la biorremediación se ha extendido a muchos microorganismos con el fin de proponer nuevos modelos. Esto implica que el modelo biológico en estudio debe tener la capacidad de disminuir la concentración de los metales pesados contaminantes del medio terrestre o acuoso. Por lo tanto, la capacidad de biorremediar

esta relacionada con los mecanismos de resistencia que el organismo utilice para vivir en dichas condiciones.

Los mecanismos de resistencia a los metales pesados que se han descrito para las plantas, las levaduras, las algas, los hongos, los protistas fotosintéticos y las bacterias son: 1) la unión del metal a la pared celular o a la cara externa de la membrana plasmática, con lo cual se impide el paso de éste hacia el interior celular, 2) la reducción del transporte a través de la membrana celular, 3) la expulsión activa, en donde la velocidad de salida del metal es mayor que la de entrada a la célula, 4) la compartimentación, en la que el metal queda almacenado en un organelo, 5) por la unión a metabolitos como proteínas, péptidos, metalotioneínas o fitoquelatinas, citrato, malato, oxalacetato, aspartato entre otros, 6) la biotransformación, ya sea por reducción u oxidación del metal a una especie menos tóxica y 7) por la precipitación o atrapamiento del metal con secreciones celulares (Rodríguez-Zavala et al, 2007).

Al estudiar los mecanismos de resistencia responsables de que un organismo pueda crecer en ambientes contaminados con metales pesados se puede obtener información de valiosa para evaluar el potencial de biorremediación de un microorganismo.

## **7.2.- Aspectos generales del cromo**

El cromo es un metal pesado con número atómico 24 y clasificado en la familia VI-B. Debido a su configuración electrónica ( $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^4$ ) es considerado un elemento de transición ya que tiene su orbital  $3d$  incompleto, esto le confiere características químicas como variabilidad de estados de oxidación, propiedades magnéticas, color de los compuestos, reactividad y capacidad de formación de complejos. Sus valencias más estables son Cr (VI) y Cr (III), esta última puede formar 6 enlaces

coordinados. Las especies Cr (V) y Cr (IV) tienen una vida media corta por lo que se consideran altamente reactivas (Steel, 1971).

El Cr (VI) es un oxidante fuerte, y puede formar enlaces coordinados con el oxígeno, como el trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ), el cloruro de cromilo ( $\text{CrO}_2\text{Cl}_2$ ), el dicromato y el cromato de potasio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ), entre otros. Dependiendo del pH y de la concentración del metal en solución, el Cr (VI) puede existir como cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), hidrocromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ) o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) (Fig. 1).

A pH neutro, la forma química más abundante del Cr (VI) es  $\text{CrO}_4^{2-}$  (75%), conforme el pH baja a 6, se protona el  $\text{CrO}_4^{2-}$  y forma el  $\text{HCrO}_4^-$ . En soluciones ácidas y a concentraciones mayores a 10 mM, el  $\text{HCrO}_4^-$  se dimeriza a  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .

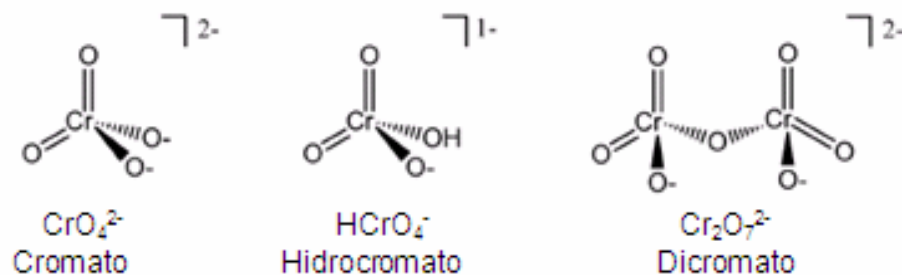


Figura 1. Principales formas solubles del Cr (VI). Tomado de Zhitkovich, 2005

El  $\text{CrO}_4^{2-}$  adopta una estructura tetraédrica con las moléculas de oxígeno semejante a los oxianiones sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). La diferencia en las estructuras formadas por estos oxianiones radica en el tamaño y para poder hacer una comparación de los tamaños de las estructuras de estos oxianiones se tomó en cuenta el valor de radio iónico de cada metal pesado. El radio iónico del Cr (VI) es 0.26 Å, el del  $\text{S}^{6+}$  es 0.12 Å, el del  $\text{P}^{5+}$  es 0.17 y el del  $\text{O}^{2-}$  es 1.21 Å, por lo tanto, el tamaño de las estructuras tetraédricas formadas entre estos elementos y el oxígeno sería  $\text{CrO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$ . Por lo tanto, en referencia al tamaño de la estructura, el  $\text{CrO}_4^{2-}$  es más parecido al  $\text{HPO}_4^{2-}$ , sin

embargo, a pH cercano a 7 el  $\text{HPO}_4^{2-}$  tiene unido un protón, lo cual lo diferencia de la estructura química del  $\text{CrO}_4^{2-}$  y esta diferencia es mayor a pH menores. Por otro lado, la constante dieléctrica de el  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , el  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  es 7.3, 6.4 y 9.05 respectivamente, lo cual indica que en medio acuoso ( $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 80.4$ ), la solvatación de los oxianiones al ionizarse es del mismo orden, presentando patrones semejantes el  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (Alexander, Hazte, 1995; McMurry, 2001; Lide, 2003; Zhitkovich, 2005). Debido a esto se explica que el  $\text{CrO}_4^{2-}$  pueda mimetizar al  $\text{SO}_4^{2-}$  y entrar a las células mediante sus transportadores.

Finalmente es preciso indicar que el potencial del sistema Cr (VI)/Cr (III) depende del pH del medio. En medios suficientemente ácidos las sales de Cr (VI) se comportan como oxidantes fuertes y a medida que el pH aumenta el Cr (VI) se hace menos oxidante (Burriel et al, 2001). Por lo tanto, si el Cr (VI) se mantiene en un medio reductor y pH bajo, la concentración de la especie hexavalente se verá disminuida.

### **7.3.- Mecanismos de citotoxicidad del Cr (VI)**

Los efectos tóxicos del cromo dependen de su estado de oxidación. El Cr (VI) es considerado más tóxico debido a que es soluble y puede entrar a la célula a través de transportadores de sulfato, mientras que se considera que el Cr(III) es relativamente inocuo ya que es insoluble y no puede atravesar membranas (De Flora et al, 2000). El Cr (VI) es considerado cancerígeno debido a que puede formar aductos con el DNA. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, al aislar al DNA y exponerlo a Cr (VI) no se observa la formación de aductos. Por lo tanto, es necesario que se lleve a cabo la reducción intracelular del Cr (VI) a especies de menor valencia para poder unirse al DNA (Zhitkovich, 2005).

El Cr (V) y Cr (III) son las especies de que tienen más importancia dentro de la reducción intracelular del Cr (VI). El Cr (VI) se ha propuesto como la especie más reactiva debido a su vida media corta, sin embargo el Cr (III) también puede reaccionar con macromoléculas a pesar de ser la especie más estable en la reducción del Cr (VI) (Sugden, Martin, 2002). Además, durante la reducción intracelular del Cr (VI) se generan ROS (Reactive oxygen species), principalmente radicales HO<sup>•</sup>. En las reacciones redox no enzimáticas del Cr (VI) se ha propuesto que participan metabolitos como glutatión (GSH), ascorbato, cisteína (Cys), NAD(P)H, entre otros (Valko et al, 2005), sin embargo, debido a las concentraciones fisiológicas tanto el GSH y el ascorbato, estos metabolitos tienen mayor probabilidad de reaccionar con el Cr (VI) (Standeven and Wetterhahn, 1992).

#### **7.4.- Resistencia y acumulación del Cr (VI) en las plantas, los hongos, las levaduras y las bacterias**

En las plantas la exposición al Cr (VI) genera clorosis. En *Nymphaea alba* L se reporta disminución en los niveles de la clorofila cuando se expone a 20 – 200 μM de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, así mismo se observa la reducción en la actividad de la enzima ácido δ-aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD) y se ha propuesto que esta reducción es la responsable de afectar la biosíntesis de la clorofila. Se ha observado que la acumulación del cromo en la estructura de *N. alba* se da en el siguiente orden: raíces>hojas>rizomas (Vajpayee et al, 1999). En la cebada, el Cr (VI) induce la síntesis de poliaminas, como la putrescina y poco tiempo después de la inducción de la síntesis de putrescina, se observa un decremento en el crecimiento, clorosis, inducción de la quitinasa en hojas y posteriormente una reducción en el crecimiento y número de hojas (Hauschild, 1993). Si bien no se propuso un mecanismo de resistencia en estos trabajos, los efectos tóxicos

medidos están relacionados con la acumulación del metal en toda la planta, la cual se da de manera preferencial en las raíces.

Marluzuf (1970) caracterizó el primer hongo resistente a Cr (VI) de una mutante de *Neurospora crassa*. La resistencia en este modelo biológico se relacionó con una parcial o total deficiencia en el transporte de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Las cepas resistentes a Cr (VI) de *Candida sp.* y de *Rhodosporium toruloides* se han caracterizado a detalle y se ha correlacionado el fenotipo resistente a Cr (VI) con una reducción en la internalización del metal (Baldi et al, 1990; Pepi et al, 1995). La disminución en la internalización de  $\text{CrO}_4^{2-}$  debido a mutaciones en los mecanismos de transporte de  $\text{SO}_4^{2-}$  también es un mecanismo de resistencia descrito en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Cervantes et al, 2001)

En bacterias, los mecanismos de resistencia se han relacionado con la presencia de plásmidos que les confieren dicho fenotipo. Así, uno de los mecanismos descritos es el que se ha asociado con la reducción del Cr (VI), por ejemplo, el plásmido pAR1180 de *Pseudomonas mendocina* es responsable de dar la resistencia a la bacteria mediante la reducción del  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Dhakephalkar et al, 1996). Otro mecanismo presente en bacterias es la expulsión activa del  $\text{CrO}_4^{2-}$ , el cual está relacionado con proteínas de membrana. Un ejemplo es la proteína ChrA, la cual se ha identificado en cepas de *Pseudomonas* y *Alcaligenes* resistentes a cromo. Esta proteína membranal está codificada por los plásmidos pUM505 y pMOL28, tienen 10-13 segmentos transmembranales, 6 dominios periplásmicos, 5 citoplásmicos y es de un tamaño de 416 – 401 aminoácidos, respectivamente. Esta proteína se ha asociado al mecanismo de expulsión del  $\text{CrO}_4^{2-}$ , el cual le confiere resistencia a dichas bacterias, una actividad similar a la observada con la



proteína ArsB para el caso de la expulsión del arsénico en bacterias resistentes (Cervantes et al, 2001).

### **7.5.- *E. gracilis* como modelo para la biorremediación del Hg, el Cd, el Pb y el Zn.**

Hargreaves (1975) realizó determinaciones en algunos cuerpos de agua que recibían el drenaje ácido de la actividad minera así como de efluentes industriales. En el estudio se aislaron 24-76 microorganismos, siendo *Euglena mutabilis* y *Euglena gracilis* las especies más abundantes en los efluentes mineros e industriales respectivamente.

Se han estudiado los efectos tóxicos de las exposiciones de *E. gracilis* a metales pesados, y esto a dado mucha información que ha sido aplicada bajo un enfoque definido como biomonitorio. El biomonitorio se basa en medir la respuesta de un organismos vivo a la presencia de sustancias tóxicas en cuerpos de agua, de tal manera que se evalúa el potencial tóxico de esas aguas en base a los efectos sobre los organismos modelo (Streb et al, 2002). Para este fin se determina la morfología del microorganismo, el crecimiento celular, el peso húmedo o seco, la clorofila, la fotosíntesis etc. En el caso de *E. gracilis*, estudios con  $\text{Cu}^{2+}$  han ayudado a construir un programa computacional (ECOTOX) basado en el análisis de imágenes de la motilidad, la velocidad de movimiento y la orientación del flajelo de células expuestas al metal (Millán de Kuhn et al, 2006).

En nuestro laboratorio los estudios de *E. gracilis* frente a metales como el mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), el cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), el plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ) y el zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) se han enfocado a definir la capacidad de acumulación y de biorremediación. Se ha observado que al exponer a *E. gracilis* heterotrófica (cultivada en la oscuridad y con lactato como fuente de carbono) con  $1.5 \mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  por más de 60 generaciones, la población resultante era más resistente a exposiciones con  $\text{Cd}^{2+}$ , lo cual también aumentó la capacidad de almacenar  $\text{Cd}^{2+}$  en

comparación con células que no fueron expuestas con  $\text{Hg}^{2+}$ . Cuando se usó como fuente de carbono al glutamato y al malato los resultados no fueron los mismos. El fenotipo de esta cepa resistente a  $\text{Cd}^{2+}$  se conservó después de quitar al  $\text{Hg}^{2+}$  del medio de cultivo. Este estudio demostró que la cepa de *E. gracilis* expuesta por varias generaciones con  $\text{Hg}^{2+}$  fue mejor modelo acumulador de  $\text{Cd}^{2+}$  que la planta *Thlaspi caerulescens*, considerada uno de los mejores modelos biológicos acumuladores de  $\text{Cd}^{2+}$  (*E. gracilis* 24.5 mg  $\text{Cd}^{2+}$ /g peso seco versus 10.6 mg  $\text{Cd}^{2+}$ /g peso seco de *T. caerulescens*) (Avilés et al, 2003).

Cultivando a *E. gracilis* en condiciones fotoheterótroficas (en luz y con glutamato - malato como fuente de carbono) y al exponerla a 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , ocurrió una disminución del 80% en la densidad celular en la fase estacionaria. Además, la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  inhibió la actividad de fotosíntesis, lo cual se asocia con la acumulación del 62% de este metal en el cloroplasto. En estas condiciones se observó un aumento de siete veces en la concentración de GSH y Cys, además de un incremento en los niveles de sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) (Mendoza-Cózatl et al, 2002). En nuestro laboratorio se caracterizó el transporte de  $\text{Cd}^{2+}$  en el cloroplasto de *E. gracilis* y se identificaron dos componentes cinéticos, uno hiperbólico y saturable ( $V_{\text{max}} = 11 \text{ nmol Cd}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ ;  $K_m = 13 \mu\text{M}$ ) y otro lineal no saturable. Por lo tanto, este protista al ser expuesto a  $\text{Cd}^{2+}$  tiene la facilitada la llegada del metal hasta dicho organelo.

Uno de los mecanismos que *E. gracilis* utiliza para tener el fenotipo hiperacumulador es la compartimentación en las mitocondrias y los cloroplastos. La cepa heterótrofica acumula hasta 79% de  $\text{Cd}^{2+}$  en las mitocondrias, y la cepa fotosintética acumula 62% de  $\text{Cd}^{2+}$  en los cloroplastos; esto indica que la compartimentación es un mecanismo clave en la tolerancia de *Euglena* al metal (Mendoza-Cózatl et al, 2002, Avilés

et al, 2003). Estos datos correlacionan con lo reportado por Watanabe et al, (2003) quienes observaron la fragmentación del DNA mitocondrial en *E. gracilis* tanto en la cepa Z (fotosintética) como en la cepa mutante SMZ (no fotosintética) al exponer a ambas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . En este trabajo se propone que la fragmentación observada se debe a las ROS generadas por la presencia del  $\text{Cd}^{2+}$  en dicho organelo.

Otro mecanismo descrito para *E. gracilis* que favorece la acumulación del  $\text{Cd}^{2+}$  es el atrapamiento o quelación mediada por metabolitos. Las fitoquelatinas (FQ) son polímeros de GSH con capacidad de quelar metales pesados y han sido identificadas en microalgas y protistas, tales como *Chlorella*, *Navicula*, *Scenedesmus* y *Euglena* (Gekeler et al, 1988). En plantas y en algunas levaduras como *S. pombe* las FQ son sintetizadas en el citosol y transportadas a la vacuola (Salt et al, 1995).

En exposiciones de *Euglena* heterotrófica con  $\text{Cd}^{2+}$ , se ha observado el aumento del GSH, la Cys y el citrato, sin embargo los niveles de las FQ no aportaron información relevante. Caso contrario sucede en la cepa fotosintética. En ella se ha observado un aumento de los monotioles (la Cys, el GSH y la  $\gamma\text{-EC}$ ), el  $\text{S}^{2-}$  y las FQ. De tal forma que se ha descrito en la cepa fotosintética la formación de HMWC (High Molecular Weight Complex) como parte del mecanismo de almacenamiento (secuestro y compartimentación) de  $\text{Cd}^{2+}$ . La composición del complejo es de 57-75% de monotioles y de 25-43% de las FQ (Mendoza-Cózatl et al, 2006). Por lo tanto, estos antecedentes indican que la compartimentación y la quelación son mecanismos importantes en la resistencia y acumulación de *E. gracilis* a  $\text{Cd}^{2+}$ .

Sin embargo, en la literatura se ha descrito otros mecanismos relacionados con la resistencia de *E. gracilis* a  $\text{Cd}^{2+}$ . Uno de ellos tiene que ver con la sobreexpresión de proteínas resistentes al calor (heat-shock, Hsp). Cabe recordar que las Hsp son proteínas

codificadas por una familia de genes que responden a cambios de temperatura; sin embargo, no es el único estímulo que las induce, también lo pueden hacer algunas drogas y agentes oxidantes, así como los metales pesados. Han sido clasificadas en 4 familias de acuerdo a su peso molecular: Hsp90, Hsp70, Hsp60 y Hsp mas pequeñas (Barque et al, 2000; Chang et al, 2008).

Berque et al, (1996) demostró que en *E. gracilis* se presenta la sobre-expresión de la proteína Hsp70 al variar la temperatura de crecimiento de 23 a 35 °C, lo cual también observó en cepas de células resistentes a Cd<sup>2+</sup> (expuestas por resiembras durante 5 años a 2 mM de cadmio) a una temperatura de 23°C. Posteriormente, mediante el uso de anticuerpos monoclonales para las isoformas Hsp72 y Hsp7, pudieron concluir que la isoforma Hsp73 es la que responde a Cd<sup>2+</sup> (Barque et al, 2000). Watanabe et al, (2004) observó mediante Western Blot la inducción de Hsp70 en *E. gracilis*, tanto en la cepa Z (fotosintética) como en la cepa mutante SMZ (no fotosintética). Ambas cepas mostraron la mayor inducción de Hsp70 al exponerse a 50 µM de CdCl<sub>2</sub>, sin embargo la cepa Z mostró respuesta hasta 500 µM de CdCl<sub>2</sub>, mientras que la cepa MSZ sólo hasta 100 µM. Se reporta que la proteína Hsp70 es importante durante los proceso de plegamiento de proteínas sintetizadas de novo, la translocación de proteínas a través de membranas y en el ensamble/desensamble de complejos protéicos (Chang et al, 2008), por lo tanto la sobre-expresión de Hsp70 ante una exposición con Cd<sup>2+</sup> se relaciona con la protección de dichos procesos moleculares esenciales para la célula.

El estudio de diferentes modelos biológicos con fines de ser utilizados en la biorremediación inicia con la caracterización del comportamiento del microorganismo a la exposición con un metal en particular, sin embargo, no se debe olvidar que en una situación real la contaminación de las aguas presenta una mezcla de metales, los cuales

pueden competir por las vías de transporte celular (Williams et al., 2000). En nuestro laboratorio se ha evaluado la capacidad de *E. gracilis* para remover y almacenar  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  de manera simultánea. Cabe indicar que cuando se expone por separado al protista con concentraciones entre 20 – 50  $\mu M$  de  $CdCl_2$ , este puede remover el 80 % del metal, por otro lado, en exposiciones también por separado con concentraciones de 5 – 50  $\mu M$  de  $ZnSO_4$  la remoción también es de 80% de  $Zn^{2+}$  y cuando se expone a *E. gracilis* a la mezcla de  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  el porcentaje de remoción de ambos metales no se afecta, pero al agregar a la mezcla 200  $\mu M$  de  $Pb(NO_3)_2$ , la remoción de  $Cd^{2+}$  disminuye, mientras que la remoción de  $Zn^{2+}$  no se afecta. Estos resultados indican que el  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  pueden estar compartiendo las mismas vías de entrada a la célula. Sin embargo, al medir la concentración de tioles solubles, se reportó un efecto aditivo con la mezcla  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  sobre la producción de monotioles (Mendoza-Cózatl et al, 2006).

Hasta el momento se han estudiado exposiciones con cationes metálicos, sin embargo, con el fin de avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia y de acumulación de *E. gracilis* ante metales pesados, es de suma importancia evaluar el comportamiento del protista ante una exposición con Cr (VI).

#### **7.6.- Exposiciones de *E. gracilis* a Cr (VI)**

Hasta el momento son pocos los estudios enfocados a los mecanismos de resistencia y acumulación de *E. gracilis* frente exposiciones con el Cr (VI), ya que la mayoría de ellos están enfocados a la toxicidad. En nuestro laboratorio se han hecho experimentos de susceptibilidad de *E. gracilis* a  $K_2CrO_4$  y se ha demostrado que la cepa fotosintética es más sensible a  $CrO_4^{2-}$  que la cepa heterotrófica (Figura 2) (Cervantes et al, 2001).

En las cinéticas de crecimiento que se reportaron se observó un alargamiento de la fase *lag* en las células expuestas a Cr (VI). Esto correlaciona con reportes que indican la inhibición en proliferación, aumento en el tamaño celular y detección de células multinucleadas, lo que se interpreta como una alteración en la citocinesis debida a la exposición de *E. gracilis* a  $K_2Cr_2O_7$  (Fasulo et al., 1982). Este mismo grupo reporta que hay inhibición de la fotosíntesis como resultado de la exposición a  $K_2Cr_2O_7$  y se propone que este efecto es resultado de la formación de complejos de cromo con ligandos biológicos como proteínas con residuos SH, así mismo se reporta arresto de las células en fase G-2, lo cual puede ser debido a daños al DNA por interacción del cromo con ácidos nucleicos (Fasulo et al, 1982).

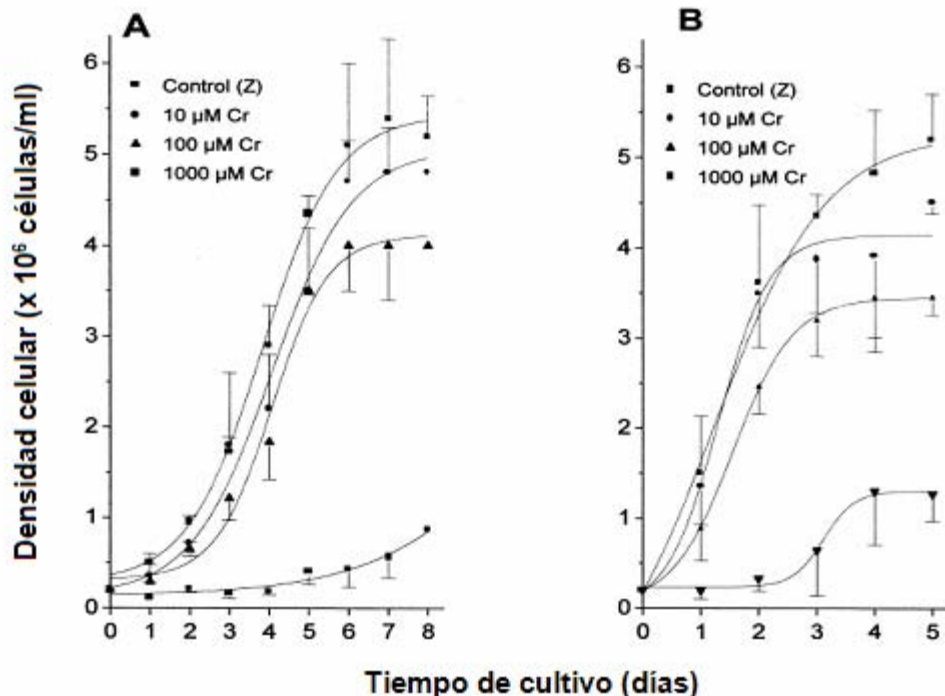


Figura 2. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* fotosintética (a) y heterotrófica (b) expuesta a  $K_2CrO_4$ . Tomado de Cervantes et al, 2001.

En estudios recientes sobre la toxicidad del Cr (VI) en *E. gracilis* se obtuvieron concentraciones de IC<sub>50</sub> de 24.6 μM y de 3.2 μM de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en la cepas MAT (silvestre) y la cepa UTEX 364 (Universidad de Texas) en medio mineral Buetow, además se calcularon otras IC<sub>50</sub> en medio Cramer & Myers, las cuales fueron de 120.5 μM y 90.4 μM de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> para la cepa MAT y UTEX, respectivamente (Rochetta et al, 2003). Además se observó la disminución del crecimiento, la generación de clorosis y la presencia de alteraciones morfológicas en cloroplastos, no así en mitocondrias (Rochetta et al, 2003; Rochetta et al, 2006).

### **7.7.- Vía de asimilación de sulfato**

Como se planteó anterioremente, existe un mimetismo estructural entre CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, y es de mucha ayuda saber este antecedente porque a partir de el es posible predecir los compartimentos celulares a los cuales el metal tendría acceso, que sería en los lugares en donde se localicen los transportadores de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, los cuales son parte de la vía de asimilación de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> o SAP (Sulfur Assimilation Pathway). Esta vía biosintética tiene como principal producto la Cys y es de gran importancia para dar inicio a la síntesis de GSH (Meinster, 1995) (Figura 3).

El SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es co-transportado al interior de la célula con 3H<sup>+</sup>, en un proceso dependiente de energía y catalizado por proteínas de membrana específicas (Mendoza-Cózatl et al, 2005). Los transportadores pueden ser de alta afinidad (HAST = K<sub>m</sub><10 μM) o de baja afinidad (LAST = K<sub>m</sub>>100 μM). En plantas se ha observado que una vez que se ha internalizado el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a la célula, este es distribuido a las hojas para ser asimilado y el proceso de reducción es llevado a cabo en los cloroplastos (Leustek y Saito, 1999). Los transportadores son codificados en familias de multigenes, los cuales, además de

expresar proteínas con diferentes afinidades por  $\text{SO}_4^{2-}$ , tienen distintos mecanismos de regulación (Grossman y Takahashi, 2001).

La expresión genética de los transportadores en plantas se regula por la disponibilidad de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio externo, por los requerimientos intracelulares del oxianión y por el GSH (Takahashi et al., 1997; Vidmar et al., 2000). En *S. cerevisiae* se ha reportado que el transporte de  $\text{SO}_4^{2-}$  es inhibido por intermediarios de la SAP, como: el sulfato adenosina-fosfato (APS) y la Cys (Breton y Surdin-Kerjan, 1977; Ono et al, 1996).

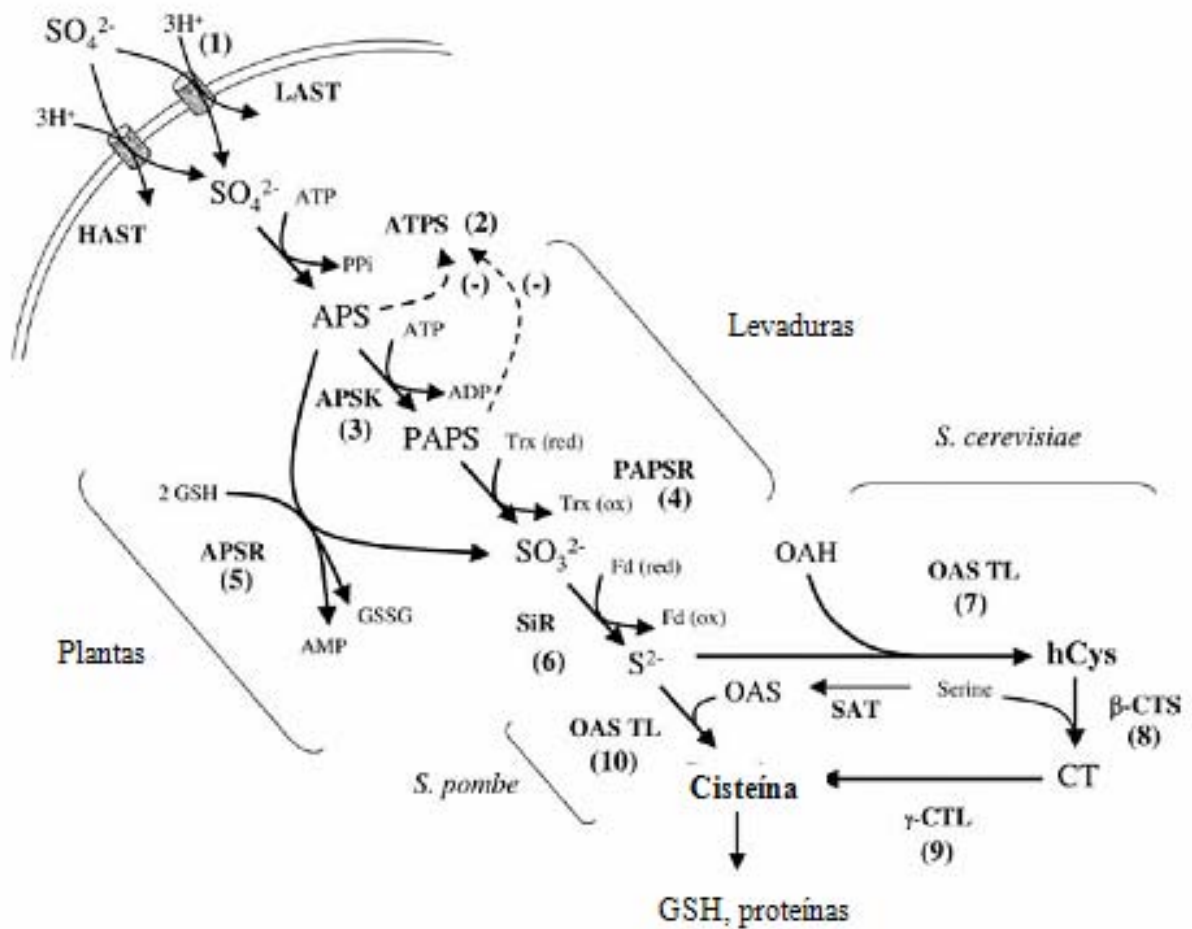


Figura 3. Vía de asimilación del sulfato (SAP) y biosíntesis de cisteína. Tomado de Mendoza-Cózatl et al, 2005.



En algunos compartimentos celulares, como los cloroplastos, no se han descrito los transportadores del  $\text{SO}_4^{2-}$ , sin embargo si han caracterizado otras enzimas de la SAP que dependen de la entrada del  $\text{SO}_4^{2-}$ , y eso es un indicativo de que deben estar presentes en esos compartimentos. Un ejemplo de esto es la caracterización de la enzima ATP sulfurilasa, la cual se ha localizado tanto en el citosol como en los cloroplastos. La enzima ATP sulfurilasa activa el  $\text{SO}_4^{2-}$  como primer paso de la SAP. Otro ejemplo es la enzima APS reductasa, la cual se encarga de reducir el sulfato en sulfito. La APS reductasa de *Arabidopsis* se ha localizado solamente en los cloroplastos. (Renosto et al., 1993, Gutierrez-Marcos et al., 1996, Leustek y Saito; 1999).

Si bien no se ha reportado que el  $\text{CrO}_4^{2-}$  se reduzca mediante la vía completa de asimilación de  $\text{SO}_4^{2-}$ , se ha descrito en la entrada del metal pesado a la célula es mediante los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$ . En las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus* se han reportado valores de  $K_m$  para el transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  de 19 y 151  $\mu\text{M}$  y se ha propuesto que dicho proceso se da mediante transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Ohtake et al., 1987; Niels y Silver, 1989).

Finalmente, es importante conocer la vía completa del SAP porque de ella depende la síntesis de la Cys y a su vez la síntesis tanto del GSH y las FQ. Debido a eso se debe mencionar que después de la reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{SO}_3^{2-}$ , la enzima sulfito reductasa (SiR) toma al  $\text{SO}_3^{2-}$  y lo reduce a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). Este paso es similar tanto en bacterias, hongos y plantas (Nakayama et al., 2000). Por último, el  $\text{S}^{2-}$  es tomado por la enzimas serín acetil transferasa y es transferido a la O-acetilserina para concluir la síntesis de la Cys. Algunos pasos varían entre microorganismos dependiendo de las enzimas que utilicen, sin embargo esas diferencias se muestran en la Figura 3 (Mendoza-Cózatl et al, 2005).

## 8. Justificación de la hipótesis:

En esta sección se presenta un resumen de los datos más importantes que justifican la hipótesis de trabajo:

- 1) *E. gracilis* puede acumular el 60% de  $\text{Cd}^{2+}$  en el medio, del cual el 62% es compartimentado en los cloroplastos de la cepa fotosintética y el 79% en las mitocondrias de la cepa heterotrófica.
- 2) La quelación del  $\text{Cd}^{2+}$  por el  $\text{S}^{2-}$ , la Cys, el  $\gamma$ -EC, el GSH y la FQ es uno de los mecanismo principales que le permite a *E. gracilis* resistir y acumular altas cantidades del metal.
- 3) Enzimas que son parte de la vía de asimilación del  $\text{SO}_4^{2-}$  (SAP) y de la síntesis del GSH, se han encontrado en el citosol y las mitocondrias de *E. gracilis*.
- 4) Así mismo, los transportadores del  $\text{SO}_4^{2-}$  que son parte de SAP, se encuentran en la membrana celular, los cloroplastos y las mitocondrias de plantas, algas y hongos.
- 5) El  $\text{CrO}_4^{2-}$  y el  $\text{SO}_4^{2-}$  tiene características químicas y estructurales semejantes y debido al mimetismo entre oxianiones, el metal pesado puede entrar a la célula de microorganismos mediante los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$ .
- 6) El cromo puede formar enlaces coordinados con metabolitos que funcionen como donadores de electrones, tales como Cys, GSH y acetato. Dichos enlaces son más estables con el Cr (III) el cual se puede generar intracelularmente a partir de la reducción del Cr (VI). Esto permite considerar un mecanismo de inactivación.

**9. Hipótesis:**

*E. gracilis* fotosintética puede resistir una exposición a Cr (VI) y acumular al metal en citosol, cloroplastos y mitocondrias.

**10. Objetivo:**

Determinar los mecanismos bioquímicos que utiliza *E. gracilis* para resistir y acumular cromo hexavalente.

**10. Objetivos particulares:**

- Susceptibilidad. Determinar el efecto de la exposición a Cr (VI) sobre la cinética de crecimiento.
- Transporte. Caracterizar la entrada de Cr (VI) a la célula.
- Remoción. Medir la cantidad de Cr<sub>total</sub> acumulado y adsorbido en *E. gracilis* después de una exposición al metal.
- Compartimentación y quelación: Evaluar la acumulación de cromo en la mitocondria y el cloroplasto, así como la unión del metal acumulado con tioles solubles.

## 11. Metodología:

### 11.1.- Cultivo de *Euglena gracilis* fotosintética

La cepa fotosintética de *Euglena gracilis* Z fue cultivada axénicamente en medio Hutner, modificado por Schiff *et al*; 1971. Los componentes y concentraciones utilizadas son los siguientes: Glutamato 34 mM, Malato 15 mM, CaCO<sub>3</sub> 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM, *Minerales traza A* (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 mM, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.47 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 mM y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 7x10<sup>-3</sup>), *Minerales traza B* (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.03 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1 mM y NaI 2x10<sup>-3</sup> mM). El medio se ajustó a pH 3.5 con perlas de KOH. Durante el desarrollo del proyecto se modificó dicho medio respecto a la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. La sal de MgSO<sub>4</sub> se sustituyó por MgCl<sub>2</sub> (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en los medios Hutner utilizados. H = Medio Hutner con 2.82 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; H1 = Medio Hutner con 0.8 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

	H (mM)	H1 (mM)
MgSO4	2.02	---
MnSO4	0.47	0.47
ZnSO4	0.3	0.3
CuSO4	0.03	0.03
[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] <sub>Total</sub> *	2.82	0.8
pH	3.5	3.5

El medio se esterilizó por autoclave 45 minutos a 20 libras de presión y antes de sembrar las células se añadió una mezcla de vitaminas (tiamina 0.03 mM,

cianocobalamina 200 pg/mL y  $\text{FeCl}_3$  0.2 mM). Las vitaminas fueron previamente esterilizadas por filtración (diámetro de poro de filtro 0.22  $\mu\text{m}$ ). En el caso de las células expuestas al  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  se utilizó una solución concentrada 0.1 M esterilizado por filtración (poro de filtro 0.22  $\mu\text{m}$ ), del cual se tomó las alícuotas necesarias para cada exposición, adicionándose después de las vitaminas y antes de agregar las células.

Las células se mantuvieron por resiembras, las cuales se hicieron antes de que llegaran a la fase estacionaria de crecimiento partiendo de un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL. El cultivo se mantuvo en una cámara entre 22-25 °C, con un fotoperiodo de 12 horas con luz blanca ( $70 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 12 horas de oscuridad. Las células se contaron con una cámara de Neubauer y se inmovilizaron con HCl 5%.

### 11.2.- Medición de la clorofila

Se determinó por el método de Arnon, 1949. La clorofila se extrajo con 2.5 mL de acetona 80% (v/v) a partir de 15  $\mu\text{L}$  de muestra con una densidad de  $3 \times 10^7$  células/mL. Estas fueron centrifugadas a 3,500 rpm, 4°C por 5 min. Posteriormente se leyó la absorbencia a 663 y 645 nm en una celda de vidrio. La concentración de clorofila<sub>total</sub> (a y b) era calculada de la siguiente forma:

$$[\text{clorofila}_{\text{total}}] = (\text{Abs}_{663} \times 8.05) + (\text{Abs}_{645} \times 20.29) = \mu\text{g clorofila}$$

### 11.3.- Medición de la proteína

Se determinó proteína por el método de Kies & Morphy, para lo cual se siguió el protocolo descrito por Moreno y Hansford (1988). Se utilizó 5 mL de NaOH 0.05N a los cuales se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra con una densidad de  $3 \times 10^7$  células/mL, se vortexeó 1 min y se leyó la absorbencia a 215 y 225 nm. La diferencia de  $\text{Abs}_{215} - \text{Abs}_{225}$

se interpoló en una curva construida con 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg de albúmina (Figura 4), la cual se trató bajo las mismas condiciones.

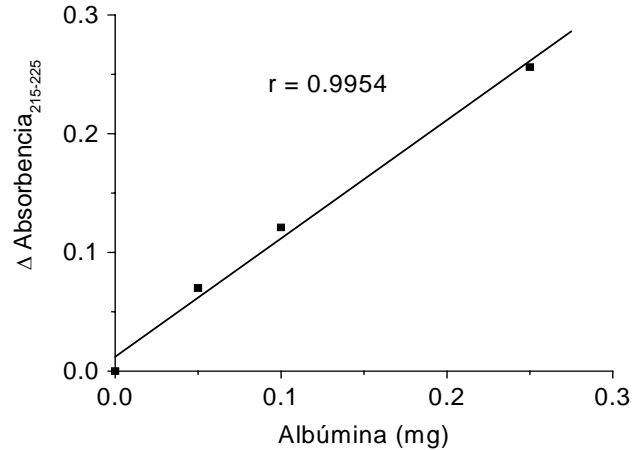


Figura 4. Curva patrón de albúmina utilizada en la determinación de proteína en *Euglena gracilis*.

#### 11.4.- Medición del transporte de $\text{CrO}_4^{2-}$

Durante el presente proyecto se diseñó el siguiente protocolo. Se utilizó  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ . Las células se cultivaron en 1 L de medio H1 (ver Tabla 3) y fueron cosechadas a las 120 h por centrifugación (3,500 rpm/4 °C/10 min). Las células se lavaron por centrifugación (3,500 rpm/4 °C/10 min) con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2 y se preparó una solución celular de  $2 \times 10^7$  células/mL. El experimento de transporte se inició incubando 1 mL de la solución celular a 25 °C durante 2 minutos y después se adicionó la alícuota de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  correspondiente. Durante todo el experimento las células fueron agitadas a 150 rpm. Se tomaron muestras ( $8 \times 10^6$  células/mL) a los 30 y 90 minutos de incubación cuando se trabajó con una concentración de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-} < 1\text{mM}$  y a los 30 y 60 minutos cuando se trabajó con una concentración de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-} \geq 1\text{mM}$ , ya que en estos tiempos la velocidad de transporte fue lineal (Figura 5). Cada muestra se lavó por filtración con 10 mL de

$K_2CrO_4$  50 mM frío (sin marca radioactiva). Se utilizaron filtros de PVDF (polyvinylidene difluoride; Millipore) con un diámetro de poro de  $0.65 \mu m$ .

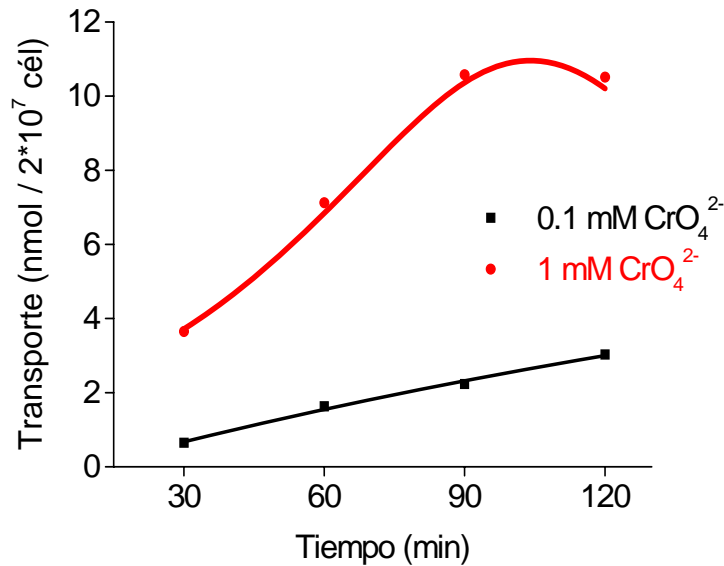


Figura 5. Transporte de cromato en *E. gracilis*. Se utilizó una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL,  $25 \text{ }^\circ C$  y 150 rpm en buffer de  $KH_2PO_4$  0.1 M pH 7.2.

### 11.5.- Protocolo de exposición de *E. gracilis* al $K_2CrO_4$ para determinar Cromo<sub>total</sub> y tioles en condición de alta densidad celular

Se inició con un cultivo de 1 L y un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL en medio Hutner H ( $2.82 \text{ mM } SO_4^{2-}$ ) y se cosechó las células a las 96 h. El botón celular obtenido se lavó por centrifugación ( $3,500 \text{ rpm}/4 \text{ }^\circ C/10 \text{ min}$ ) con medio Hutner H1 ( $0.8 \text{ mM } SO_4^{2-}$ ) ó con  $KH_2PO_4$  0.1 M pH 7.2 dependiendo de la condición experimental deseada. Al final de los lavados se contaron las células. En un volumen de 25 mL del medio respectivo se adicionó una alícuota adecuada de la solución celular para obtener una densidad aproximada de  $3 \times 10^7$  células/mL. Antes de adicionar las células se adicionaron las diferentes concentraciones de  $K_2CrO_4$ . Las células se mantuvieron en una cámara con un fotoperiodo (12 horas) de luz blanca ( $70 \mu mol \text{ quanta } m^{-2} s^{-1}$ )/oscuridad, en agitación (150

rpm) y con temperatura 20-25 °C. A los tiempos determinados se tomó una muestra (3 mL) y se lavó por centrifugación con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2. Para determinar el  $\text{Cromo}_{\text{total}}$  adsorbido a las células, la solución de lavado fue la mezcla  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M y EGTA 10 mM pH 7.4.

Al final de los lavados se resuspendió el botón celular en 2 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se tomó 1 mL para medir  $\text{Cr}_{\text{total}}$  y 1 mL para medir tioles. Después de la cosecha las células se contaron. La muestra para medir tioles se guardó a -70 °C con 1 mM de DTT (Dithiothreitol).

#### **11.6.- Medición de $\text{Cromo}_{\text{total}}$**

El  $\text{Cromo}_{\text{total}}$  se midió por espectrofotometría de absorción atómica ó AAS (Atomic absorption spectroscopy) en el equipo Varian Spectra AA 640, a una longitud de onda de 357.9 nm y usando una mezcla de Aire:Acetileno a un flujo de 13.5:4.5 L/min. El software Varian Spectra AA 640 sugiere un flujo de acetileno de 2.5 L/min, sin embargo en este proyecto se utilizó un flujo de 4.5 L/min debido a que se observó que la reproducibilidad de las lecturas y la sensibilidad del equipo fue mayor.

Las células control y expuestas se cosecharon según se indicó en el inciso **E**. Para romper a las células se hizo una digestión ácida (2.5 mL  $\text{HNO}_3$ /0.5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en una plancha de calentamiento (100 °C) durante 2 horas. Las muestras se aforaron a 5 mL con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{mili-Q}}$ . La concentración de las muestras se obtuvo de la interpolación en una curva patrón con 0.5, 0.1, 0.15 y 0.2 ppm de cromo (Figura 6).



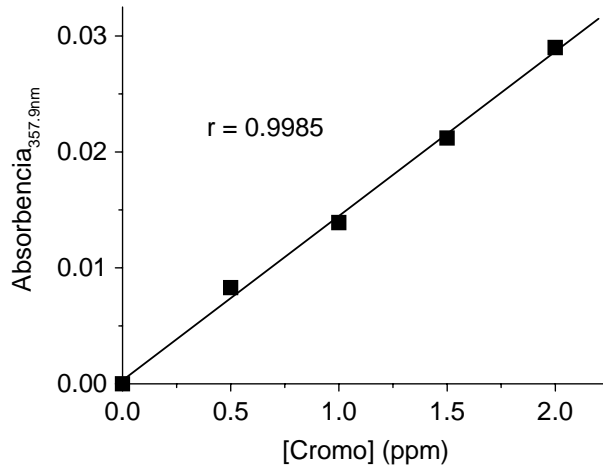


Figura 6. Curva patrón utilizada en la determinación cuantitativa de Cromo<sub>total</sub> en el espectrofotómetro de absorción atómica Varian Spectra AA 640.

### 11.7.- Determinación de los tioles

Se siguió el procedimiento reportado por Mendoza-Cózatl et al, 2002 para medir tioles mediante cromatografía líquida de alta resolución ó HPLC (High performance liquid chromatography). Se utilizó una columna C-18 Waters Novo-Pak, la cual fue equilibrada con TFA (Trifluoroacetic acid) 0.1% (v/v). Las muestras fueron separadas por un gradiente lineal en fase reversa de 1 -20% de acetonitrilo 100% en TFA 0.1% (v/v). Las separaciones se hicieron durante 60 min a un flujo de 1 mL/min. Los compuestos con grupos sulfhidrilo fueron detectados después de haber pasado la columna mediante una reacción colorida con DTNB (Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)) 0.1 mM (disuelto en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M pH 8). Esta reacción fue medida por un espectrofotómetro acoplado al HPLC a una absorbancia de 412 nm.

Las células control y expuestas se cosecharon según se indicó en el inciso **E**. Una vez descongeladas las muestras, se adicionaron 45 µL de Tritón X-100 15% y se incubaron por 20 min. Se agregó 100 µL de PCA (Perchloric acid) al 30% y se agitaron 1

minuto, después de lo cual se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm/4 °C/5 min y el sobrenadante se filtró a 45  $\mu\text{m}$ . Se tomó 90  $\mu\text{L}$  de muestra más 10  $\mu\text{L}$  de PCA 30% y se inyectó al equipo. La concentración final de PCA en las muestras fue 5.6%.

Se utilizaron estándares internos de la Cys, el GSH, la  $\gamma$ -EC y la FQ2 para hacer la identificación de los picos de la muestras (Figura 7). La linealidad del método se determinó usando el patrón de GSH, y fue lineal hasta 100 nmol. Todas las soluciones usadas se filtraron con un diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

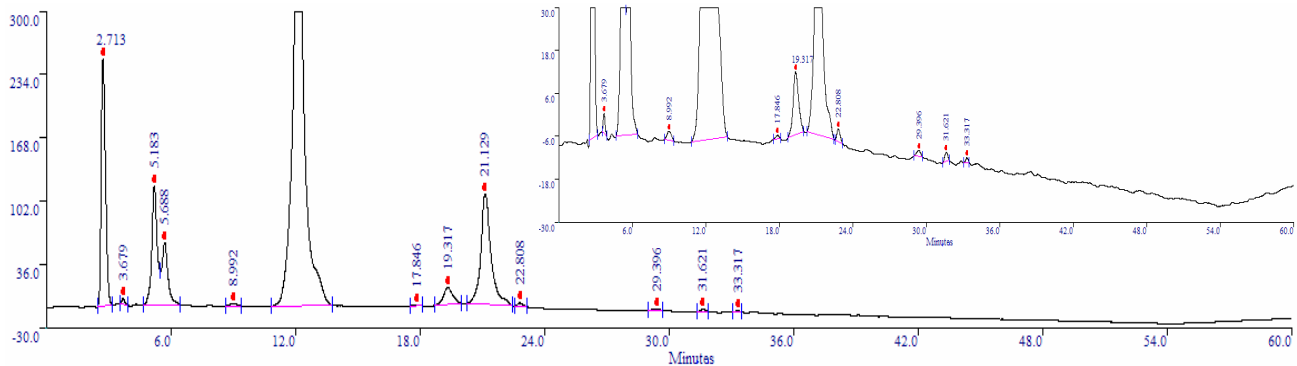


Figura 7. Cromatograma obtenido mediante HPLC de los estándares de Cys (TR= 2.71 min), GSH (TR=5.18 min);  $\gamma$ -EC (TR=5.68 min) y FQ2 (TR=21.12 min). El pico a 12 min corresponde al DTT. TR = Tiempo de retención.

### 11.8.- Determinación de cromo hexavalente

Se utilizó la reacción colorida con DFC (Diphenilcarbazine) siguiendo el método descrito por Taras et al, 1971. El reactivo de DFC se preparó disolviendo 100 mg de difenilcarbazine en 50 mL etanol 95% (Solución A). Por otro lado se mezcló 20 mL de

$\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en 180 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (Solución B). Finalmente se mezclaron la Solución A y B.

Para cada medición se utilizó 0.5 mL de reactivo de DFC al cual se adicionó 0.5 mL de muestra y se llevó a un volumen de 5 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se homogenizó la mezcla y se leyó la absorbencia a 540 nm. Se comprobó la linealidad del método utilizando una curva patrón con 0.5, 1, 1.5 y 2 ppm de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Figura 8).

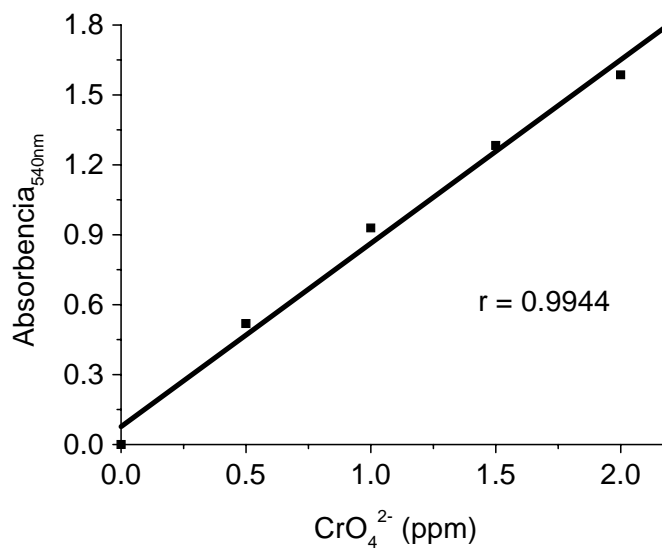


Figura 8. Curva patrón de Cr (VI) utilizando una solución estándar de  $\text{CrO}_4^{2-}$ .

Los datos se reportaron en porcentajes tomando como 100% la lectura observada inmediatamente después de la adición del Cr (VI) en cada experimento. Se comprobó que el método fuera lineal y reproducible en las condiciones empleadas.

### 11.9.- Protocolo para determinar el efecto de Cr (VI) sobre la respiración y la fotosíntesis en *E. gracilis*

Se inició con un cultivo de 500 mL e inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL. Las células fueron cosechadas a las 96 h y se lavaron con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2 por centrifugación

(3500 rpm, 5 min, 4 °C). El botón celular obtenido se resuspendió con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y la densidad celular que se obtuvo en esta solución fue aproximadamente  $12 \times 10^7$  células/mL. Se prepararon matraces con 25 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células/mL, a los cuales se adicionaron las alícuotas correspondientes de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Durante el experimento las células se mantuvieron en una cámara con un foto-periodo (12 horas) de luz blanca ( $70 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/oscuridad, en agitación (150 rpm) y con temperatura 20-25 °C.

Para cada lectura de respiración y fotosíntesis se usó una alícuota de  $12 \times 10^6$  células/mL ( $5 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}$ ). Antes de poner las células se adicionó el amortiguador KME (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7.2) saturado con oxígeno para calibrar el electrodo. Una vez estabilizado el sistema se adicionaron las células y se inició el trazo de consumo y producción de oxígeno.

#### **11.10.- Medición del consumo y la producción de oxígeno en *E. gracilis*.**

Las mediciones se hicieron usando un electrodo de  $\text{O}_2$  tipo Clark (Yellow Spring Instruments) y en una cámara (1.7 mL) con agitación, la cual se mantuvo a temperatura constante (25 °C) mediante un flujo continuo de agua. El electrodo se calibró con una solución de KME pH 7.2 saturada de oxígeno. La solubilidad del oxígeno a la altitud de la Ciudad de México (2240 m) se consideró de 420 ngatO/mL (Devars et al, 1998). Las mediciones se hicieron dentro de una caja oscura para mantener aisladas a las células de la luz y así controlar la fotosíntesis sólo con la luz de un proyector de diapositivas ( $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se acopló un registrador (Kipp & Zonen) que graficó los trazos de respiración y fotosíntesis.

## 12. Resultados:

### 12.1.- Susceptibilidad

Se ensayaron cinéticas de crecimiento exponiendo a *E. gracilis* a diferentes concentraciones de Cr (VI) (en forma de  $K_2CrO_4$ ) con el objetivo de evidenciar un efecto dosis respuesta (Figura 9). Se observó que al aumentar la concentración de  $K_2CrO_4$  se prolongó la fase *lag* de la cinética de crecimiento, sin embargo una vez que inició la fase exponencial las cinéticas llegaron a la misma densidad celular en la fase estacionaria en tiempos posteriores a las células control, excepto cuando se hizo la exposición con 1 mM.

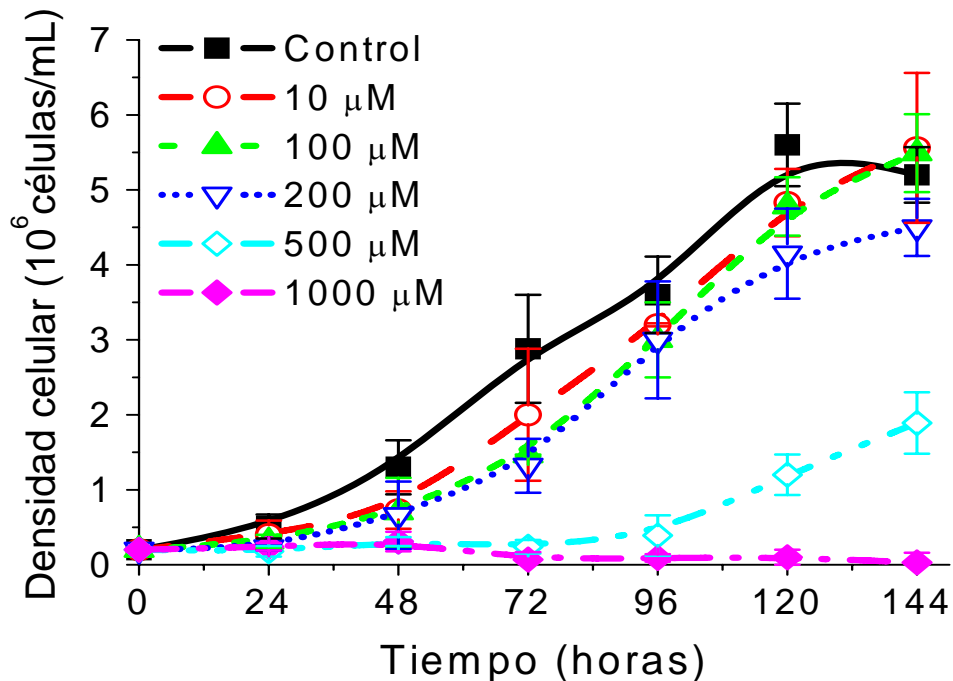


Figura 9. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* expuesta a  $K_2CrO_4$ . Los valores se reportan con desviación estándar. Medio Hutner 2.82 mM  $SO_4^{2-}$ . n = 4

En nuestro laboratorio se tienen datos de el efecto de Cr (VI) sobre la cinética de crecimiento de *E. gracilis* (Cervantes et al, 2001) y los resultados de la Figura 9 correlacionan con ellos, sin embargo no se había calculado la concentración inhibitoria del

50% de la población expuesta ( $IC_{50}$ , por sus siglas en inglés) por lo tanto se hicieron a partir de los datos de la Figura 9. Debido a que la cinética de crecimiento de las células no expuestas llegó a su fase estacionaria a las 120 h, se tomaron los datos de densidad celular de las células expuestas a Cr (VI) a las 120 h para determinar la  $IC_{50}$ . Se hicieron dos gráficos, en el primero se usaron los valores de densidad celular de todas las condiciones de exposición que se probaron en la Figura 9 más la exposición con 400  $\mu\text{M}$  que no se muestra en esa figura, los datos se ajustaron a una línea recta y la  $IC_{50}$  fue  $460 \pm 10 \mu\text{M K}_2\text{CrO}_4$  (Figura 10 A). Debido a que las densidades celulares de las exposiciones con 0, 10, 100 y 200  $\mu\text{M}$  fueron similares, se decidió hacer un segundo gráfico en el cual se tomaron en cuenta los datos de 200, 400, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  y se ajustó a un decaimiento exponencial de segundo orden de donde se calculó la  $IC_{50}$  de 414  $\mu\text{M}$  (Figura 10 B).

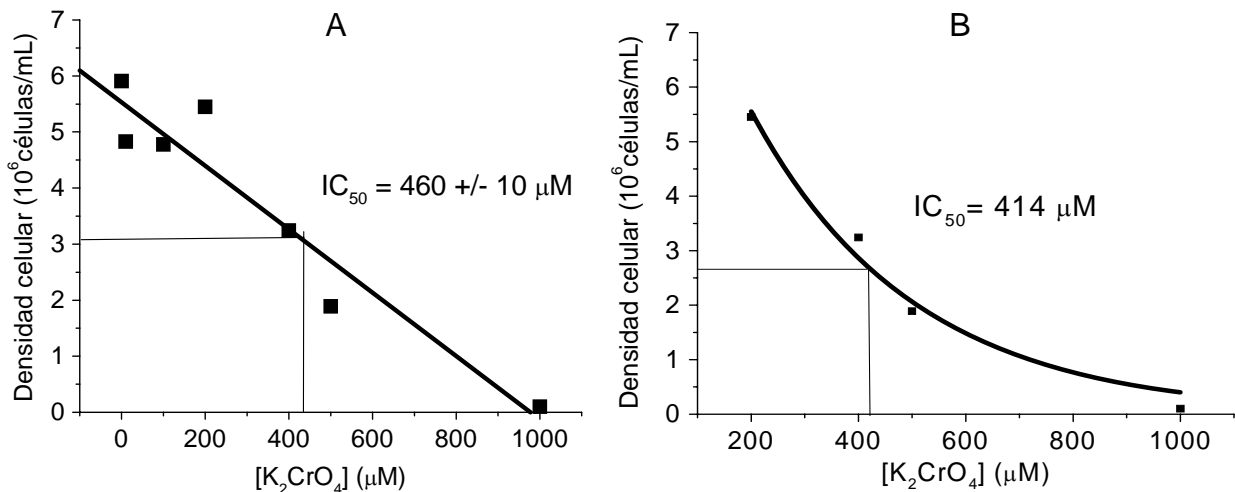


Figura 10. Crecimiento celular de *E. gracilis* expuesta a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  durante 120 h. La  $IC_{50}$  se determinó considerando como 100% la densidad celular de las células no expuestas y el 50% de crecimiento se extrapoló al eje de las abscisas mediante el uso de la curva que resultó de un ajuste (A) lineal y (B) de decaimiento exponencial de segundo orden.  $n = 3$ .

Los efectos sobre la cinética de crecimiento se pueden atribuir a la toxicidad del metal que entró a las células. Hasta el momento no hay datos en la literatura sobre el mecanismo de transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis*, pero según los antecedentes este proceso se lleva a cabo vía los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$ . De cumplirse lo anterior en *E. gracilis*, habría competencia entre ambos oxianiones por usar los mismos transportadores y entrar a la célula, lo cual podría influir sobre la susceptibilidad del protista a Cr (VI).

Con el fin de evaluar el efecto del  $\text{SO}_4^{2-}$  sobre la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cr (VI) se disminuyó su concentración en el medio de cultivo. Se hicieron cinéticas controles de las células no expuestas al metal para asegurar que la disminución de  $\text{SO}_4^{2-}$  no tuviera un efecto sobre *E. gracilis*. (Figura 11).

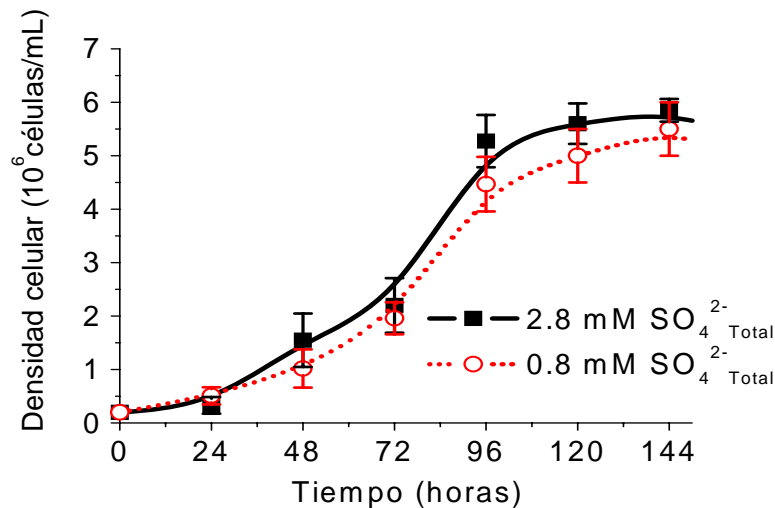


Figura 11. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* con diferentes concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio de cultivo. Medio Hutner: H = 2.82 mM y H1 = 0.8 mM de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Ver Tabla 3).

n = 3

No se observó diferencia en las cinéticas de crecimiento al variar el  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio de cultivo. Por lo tanto la disminución en la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  no representa un

artificio para la determinación de la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cr (VI) en estas nuevas condiciones de cultivo.

Una vez realizado el control anterior, se procedió a evaluar la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cr (VI) en la condición con menor  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio. Se hicieron exposiciones a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en el medio H1 (Hutner con 0.8 mM de  $\text{SO}_4^{2-}$  Total) (Figura 12).

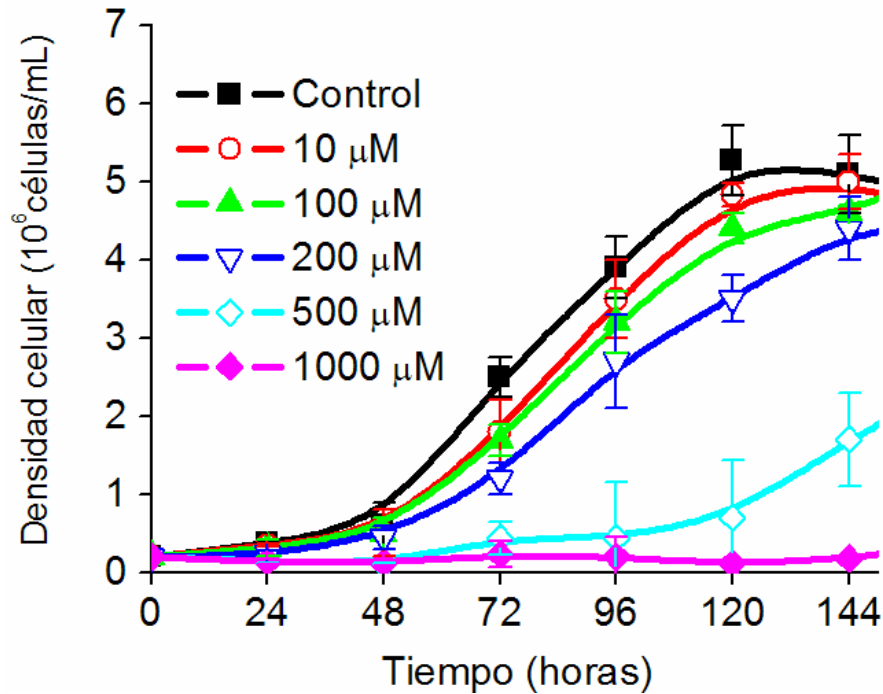


Figura 12. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* expuesta a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  y cultivada en medio H1 (0.8 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Los valores se presentan con desviación estándar.  $n = 3$ .

La  $\text{IC}_{50}$  se determinó graficando los valores de densidad celular obtenidos a las 120 h de exposición de las cinéticas de la Figura 12. Los puntos graficados mostraron un mejor ajuste con la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden y la  $\text{IC}_{50}$  fue  $142 \pm 26$   $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Figura 13). La  $\text{IC}_{50}$  disminuyó 3 veces, las mismas 3 veces que se disminuyó el  $\text{SO}_4^{2-}$ , lo cual indica una relación lineal entre la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cr (VI) y la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio. Lo anterior puede ser debido a la competencia por



la vía de entrada a la célula. Esta propuesta se tendría que comprobar midiendo el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  y usando al  $\text{SO}_4^{2-}$  como inhibidor.

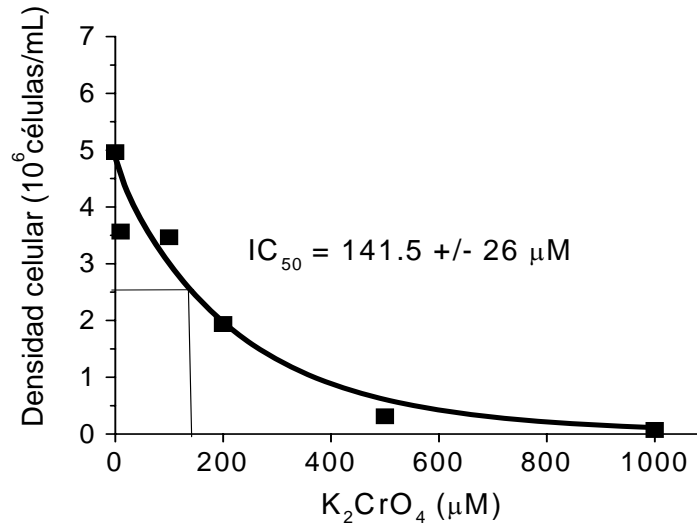


Figura 13. Crecimiento celular a 120 h de exposición a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . La  $\text{IC}_{50}$  se determinó de la misma forma que se describió en la Figura 10. Los datos se ajustaron a la ecuación de decaimiento exponencial de primer orden.  $n = 3$ .

Si bien los efectos sobre la cinética de crecimiento se atribuyen a efectos tóxicos del metal que entró a la célula, se consideró determinar otro parámetro característico de la toxicidad del Cr (VI) para que ayudara a la interpretación de que el metal estaba entrando a la célula. Entonces se decidió medir la clorofila a y b ya que es un parámetro que disminuye con la exposición a Cr (VI) en plantas (Choo et al, 2006).

Se expuso a *E. gracilis* a las  $\text{IC}_{50}$  calculadas en las dos condiciones probadas respecto a la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Las células cultivadas en el medio H y expuestas a  $450 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  mostraron una ligera disminución de la clorofila, sin embargo las células cultivadas en el medio H1 y expuestas a  $150 \mu\text{M}$  no mostraron diferencia respecto a las células controles. Se esperaba que la disminución de la clorofila fuera mayor en esta

última condición experimental, al igual que como ocurrió con la susceptibilidad en las cinéticas de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Medición de la clorofila a y b en células controles y expuestas a las IC<sub>50</sub> (Figura 10 y 13) en medio H y H1.

	Condiciones de medio Hutner			
	H*	H1*	H + IC <sub>50</sub> *	H1 + IC <sub>50</sub> *
Promedio	48 ± 6 (4)	38 ± 8 (7)	32 ± 9 (5)	42 ± 9 (6)

\*  $\mu\text{g Clorofila}_{\text{Total}}/10^7 \text{células}$

Lo que se observa en la Tabla 4 puede ser debido a que la cantidad de cromo que entró a la célula es muy baja como para tener un efecto sobre la clorofila, sin embargo esta cantidad de metal es suficiente para tener efectos sobre los procesos relacionados con división celular, lo cual se evidenció en las cinéticas de crecimiento. Por otro lado, se debe tener en cuenta que para que se presente un efecto tóxico en la clorofila, el cromo acumulado, en forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , primero debe transportarse del citosol al cloroplasto, por lo tanto, otra interpretación de los resultados presentados en la Tabla 4 puede ser que el cromo acumulado no se está transportando al cloroplasto, ya sea porque la disponibilidad de Cr (VI) disminuye y esto impide el uso de los transportadores de sulfato para entrar al organelo ó porque no hay transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el cloroplasto de *E. gracilis*. Esta última propuesta podría comprobarse mediante experimentos de transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en cloroplastos aislados ya que en la literatura no hay información al respecto.

Debido a que las mediciones de la clorofila a y b no aportó información clara sobre las células expuestas a las IC<sub>50</sub> este parámetro no pudo ser utilizado para interpretar que el cromo entró a las células.

### 12.2.- Transporte celular del $\text{CrO}_4^{2-}$

No existen datos acerca del transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis*. Es por eso que en este proyecto se buscó definir los parámetros cinéticos que describen este fenómeno. En bacterias, plantas, hongos y levaduras se ha propuesto que la entrada del metal pesado se da a través de los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  debido a la semejanza estructural entre los oxianiones (Cervantes et al, 2001). Por otro lado, los resultados de la susceptibilidad de *E. gracilis* a el Cr (VI) sugirieron que el metal entró a la célula y que los efectos tóxicos dependen de la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio de cultivo, sin embargo esos datos no son suficientes para caracterizar el proceso del transporte celular de Cr (VI) y es por eso que se planteó hacer los experimentos correspondientes.

La primera etapa consistió en definir el protocolo para medir el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis*. Se modificaron distintas variables que son parte de los experimentos de transporte tales como: densidades celulares, tiempos de muestreo, volúmenes de muestra, concentraciones de  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ , filtros (diámetros de poro) y velocidad de agitación (rpm) de las células expuestas. Los experimentos se hicieron en condiciones de velocidad inicial, en donde el transporte es lineal respecto a las concentraciones de  $\text{CrO}_4^{2-}$  ensayadas (Ver sección de Metodología).

Una vez diseñado el protocolo, se planearon experimentos en los cuales se consideró como sustrato de los transportadores celulares al  $\text{CrO}_4^{2-}$  y como inhibidor al  $\text{SO}_4^{2-}$ , la Figura 14 es un gráfico representativo de los datos que se generaron, sin embargo se usaron concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$  de 0.05 a 1 mM. En cada experimento se hizo un control con cero de inhibidor y con las respectivas concentraciones de  $\text{CrO}_4^{2-}$ .

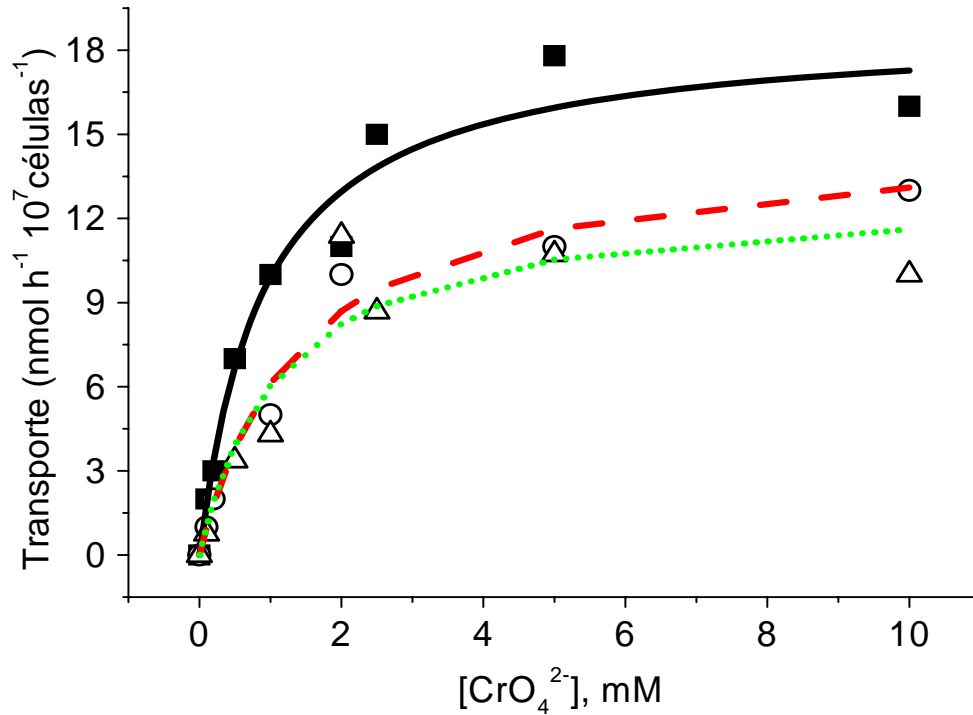


Figura 14. Inhibición del transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis* por sulfato (■ 0, ○ 0.25, ▲ 1 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para inhibición competitiva simple. Los experimentos se realizaron en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.2, 25°C, agitación (250 rpm) y se usó una muestra celular de  $2 \times 10^7$  células/mL.

Los datos que se presentan en la Figura 14 se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para inhibición competitiva simple debido a que previamente se realizó un análisis global por regresión no-lineal de todos los datos generados mediante un programa computacional (Origin 5.0) el cual permite editar las ecuaciones hiperbólicas que describen el comportamiento de los cuatro tipos de inhibiciones simples: competitiva, incompetitiva, no competitiva y mixta (Tabla 5). Se editaron las ecuaciones en el programa y se dejó como variable independiente a las concentraciones de  $\text{CrO}_4^{2-}$  ensayadas y como variable independiente a la velocidad de transporte que se obtuvo para cada condición de inhibidor, de tal forma que el programa hizo un análisis global de todos los datos y dio como

resultados los valores de  $K_m$  para  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$  para  $\text{SO}_4^{2-}$  y de  $\alpha$  para el caso de la inhibición mixta, los cuales son parámetros cinéticos del transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$ .

Tabla 5. Ecuaciones de inhibición utilizadas en el análisis global de los datos de transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  utilizando como inhibidor sulfato.

Tipo de Inhibición	Ecuación
Competitiva	$V = \frac{V_{max} * S}{K_s * (1 + I/K_i) + S}$
Incompetitiva	$V = \frac{(V_{max}/(1 + I/K_i)) * S}{(K_s/(1 + I/K_i)) + S}$
No competitiva	$V = \frac{(V_{max}/(1 + I/K_i)) * S}{(K_s + S)}$
Mixta	$V = \frac{(V_{max}/(1 + I/\alpha K_i)) * S}{\left( \frac{K_s}{(1 + I/K_i)/(1 + I/\alpha K_i)} + S \right)}$

Este análisis es muy confiable debido a que toma en cuenta una gran cantidad de datos para generar los parámetros cinéticos además reporta un valor de  $\chi^2$ , el cual representa que tan bueno fue el ajuste de todos los datos a las distintas ecuaciones de inhibición que se probaron (Tabla 6). Es así como se determinó que los resultados de velocidad de transporte se ajustaron mejor a la ecuación de inhibición competitiva, sin embargo, este mismo análisis permitió observar que también la ecuación de la inhibición no competitiva presentó un buen ajuste de los resultados.

Tabla 6. Ajuste de los datos experimentales de transporte de Cr (VI) en *E. gracilis* a las ecuaciones de inhibición competitiva, incompetitiva, no competitiva y mixta. Software:

Origin 5.0.

Tipo de inhibición	Chi <sup>2</sup>	$K_m$	$V_{max}$	$K_i$	$\alpha$
Competitiva	1.3	$0.9 \pm 0.2$	$17.9 \pm 1.5$	$0.3 \pm 0.1$	---
Incompetitiva	1.9	$1.1 \pm 0.3$	$18 \pm 1.9$	$1.1 \pm 0.4$	---
No competitiva	1.4	$1.1 \pm 0.2$	$18.7 \pm 1.6$	$1.5 \pm 0.3$	---
Mixta	1.5	$1 \pm 0.3$	$18.6 \pm 1.8$	$1.7 \pm 1$	$3 \pm 14$

Así que se hizo un gráfico de dobles recíprocos de los datos presentados en la Figura 14 y se observó que el patrón corresponde a una inhibición de tipo competitivo simple.

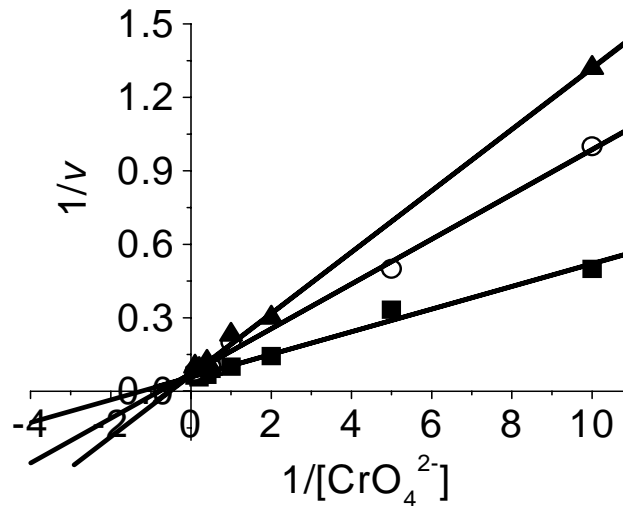


Figura 15. Gráfico de dobles recíprocos para el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis* (Figura 14) utilizando como inhibidor sulfato ( $\blacksquare$  0,  $\circ$  0.25,  $\blacktriangle$  1 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Si bien el método gráfico de los dobles recíprocos fue claro para los datos de la Figura 14, los datos que se reportan en la Tabla 7 de los parámetros cinéticos del transporte se calcularon mediante el uso de la ecuación de Michaelis-Menten para la inhibición

competitiva simple y se usó el programa Origin 5.0 ya que hacerlo por el método gráfico fue poco práctico y preciso.

Tabla 7. Parámetros cinéticos del transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis*.

$K_m$ (mM $\text{CrO}_4^{2-}$ )	$V_{max}$ (nmol/h $10^7$ células)	$K_i$ (mM $\text{SO}_4^{2-}$ )
$1.1 \pm 0.3$ (5)	$16 \pm 4$ (5)	$0.4 \pm 0.1$ (5)

Estos resultados demostraron que el Cr (VI) en forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$  se transporta en *E. gracilis* mediante transportadores de sulfato y confirmaron que la dependencia de la susceptibilidad del protista a la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio de cultivo se debe a la competencia entre los oxianiones por la misma vía de entrada.

### **12.3.- Remoción**

Las mediciones de la susceptibilidad y el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis* demostraron que el cromo entra a las células, sin embargo fue necesario determinar cuanto metal se acumulaba en el protista ya que de esta manera se puede calcular el porcentaje de remoción de cromo por *E. gracilis*. Este parámetro es útil para comparar al protista con otros modelos biológicos y para conocer su potencial biorremediador.

Se utilizó la técnica de AAS para medir cuantitativamente el cromo. La técnica no discrimina valencias del metal y la lectura que se obtiene reporta el cromo total de la muestra, por lo tanto se utilizó la nomenclatura  $\text{Cr}_{\text{Total}}$ .

En un primer protocolo se expuso a *E. gracilis* a las  $IC_{50}$  calculadas en las cinéticas de crecimiento en medio H y H1 (Figura 10 y 13). Se siguió el mismo protocolo que se usó cuando se hicieron las cinéticas de crecimiento (inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL y 120 h de incubación). Las células se cosecharon después de 120 h, se lavaron por centrifugación con  $KH_2PO_4$  0.1 M pH 7.2, se digirieron con mezcla ácida y se determinó  $Cr_{total}$  por AAS (Figura 16).

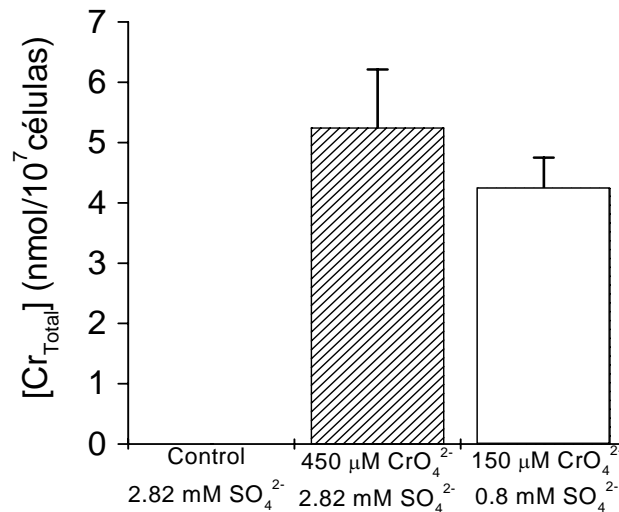


Figura 16. Remoción de cromo en *E. gracilis* utilizando un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL y exposición a  $IC_{50}$  de  $K_2CrO_4$  en medio H y H1 respectivamente durante 120 h.  $n = 3$

No se observó diferencia en la remoción de  $Cr_{total}$  cuando se expuso a *E. gracilis* a las  $IC_{50}$ . Sin embargo, al medir la disponibilidad del Cr (VI) en el medio Hutner (pH 3.5) sin células se pudo observar que disminuía respecto al tiempo (Figura 17).

Entonces, los resultados de remoción (Figura 16) están subestimados debido a que el medio de cultivo alteró la especie química ( $CrO_4^{2-}$ ) que es necesaria para que pueda transportarse el metal a la célula.

Se trabajó en diseñar una estrategia que permitiera aumentar la disponibilidad del Cr (VI) en el medio de cultivo. Así que se planteó eliminar al compuesto del medio Hutner



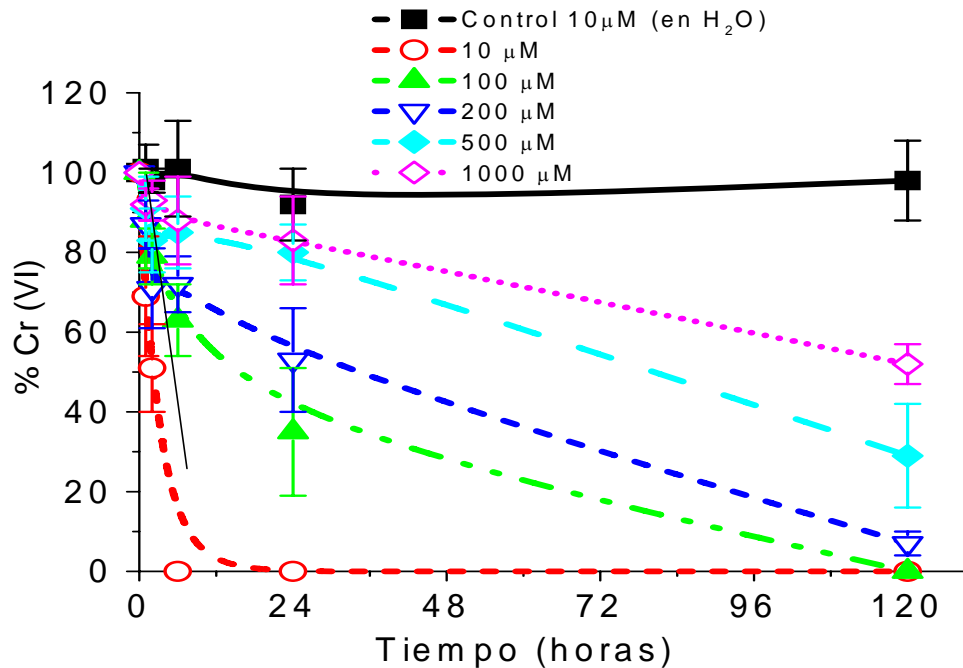


Figura 17. Medición de Cr (VI) en medio Hutner ( $H1=0.8 \text{ mM SO}_4^{2-}$ ) sin células. En el control se utilizó como medio  $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilada}}$ .  $n = 3$

responsable de la reducción del Cr (VI). Se consideraron como posibles agentes reductores el  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Fe}^{3+}$ , las vitaminas (Tiamina y Cianocobalamina) y a la luz. Entonces se prepararon medios de cultivo sin estos componentes y después se evaluó la disponibilidad de Cr (VI) sin células (Figura 18).

La disponibilidad del Cr (VI) no aumentó al eliminar el  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Fe}^{3+}$ , las vitaminas (Tiamina y Cianocobalamina) o la luz. Sin embargo si se observó una ligera mejoría en la disponibilidad de Cr (VI) al aumentar el pH del medio de cultivo de 3.5 a 5. No fue posible evaluar condiciones mas básicas debido a que a partir de pH 6 se precipitaban las sales del medio Hutner

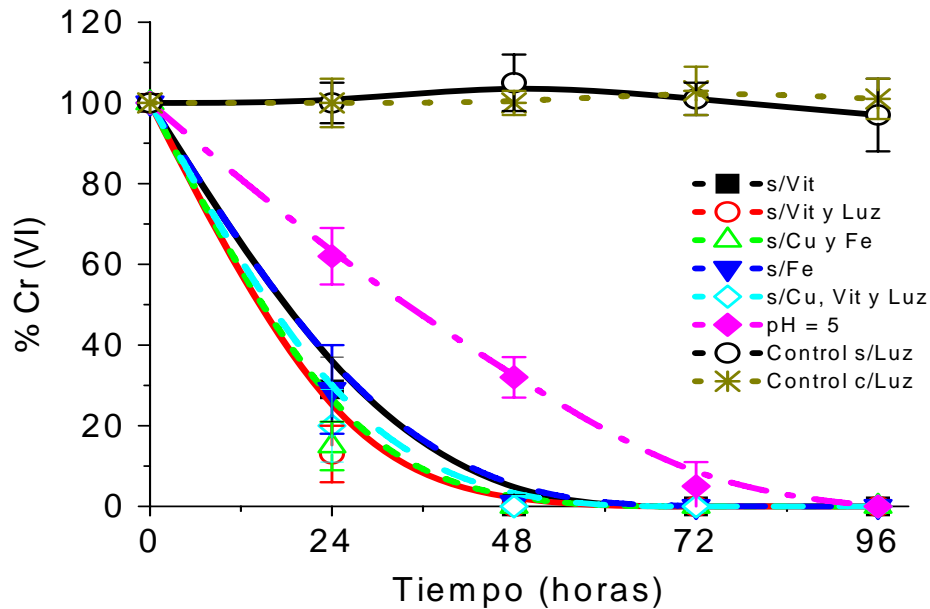


Figura 18. Medición de Cr (VI) en medio Hutner ( $H_1=0.8 \text{ mM SO}_4^{2-}$ ) en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , vitaminas (Tiamina y Cianocobalamina) y luz. Se utilizó  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en todas las condiciones. En los controles se utilizó como medio  $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilada}}$ .  $n = 3$ .

El pH puede generar las condiciones óptimas de las reacciones redox mas no ser el agente donador o el aceptor de electrones. Por lo tanto, con el fin de evidenciar el componente reductor del medio de cultivo sin tener presente el factor del pH ácido, se midió la disponibilidad del Cr (VI) en el buffer de acetatos 20 mM pH 5 adicionando por separado cada uno de los componentes del medio Hutner en cantidades estequiométricamente equivalentes a la formulación (Figura 19).

No se observó la reducción de Cr (VI) a pH 5 con buffer de acetatos en ninguna condición probada, por lo tanto se puede inferir que la reducción del Cr (VI) en le medio Hutner fue debida principalmente al pH ácido y no a las sales del medio.

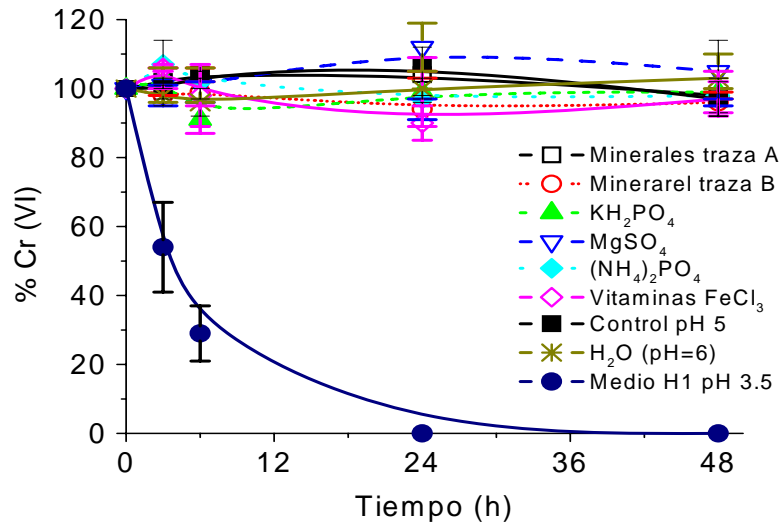


Figura 19. Medición del Cr (VI) en buffer de acetatos 20 mM pH 5 adicionando los componentes del medio Hutner. En el control se usó H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub>. Se adicionó 10 μM K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> en todas las condiciones. Se incluyó la condición con medio H1 (pH 3.5). n = 3.

Para comprobar lo anterior se repitió el experimento y se usó un medio con glutamato 33.7 mM, malato 15 mM y CaCO<sub>3</sub> 2 mM a pH 3.5 (Figura 20).

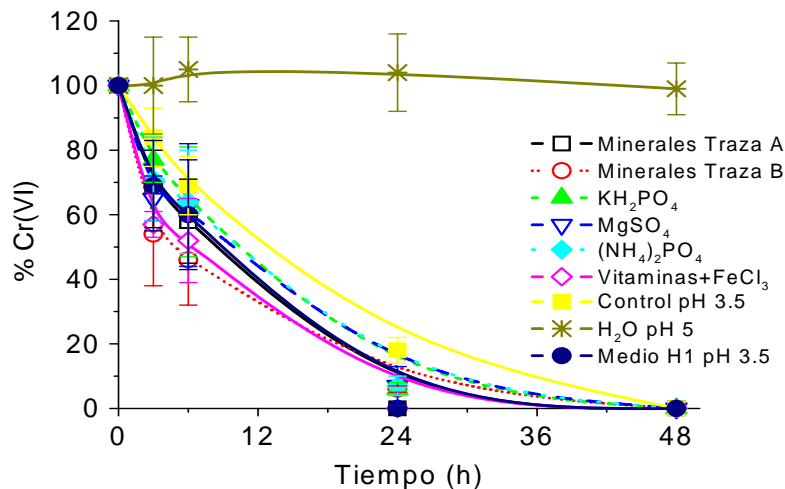


Figura 20. Medición de Cr (VI) en el medio con glutamato 33.7 mM, malato 15 mM y CaCO<sub>3</sub> 2 mM a pH 3.5 adicionando los componentes del medio Hutner. En el control se usó H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub>. Se adicionó 10 μM K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> en todas las condiciones. Se incluyó la condición con Medio H1 (pH 3.5). n = 3.

No fue posible distinguir un componente responsable de la reducción del Cr (VI) en el medio de cultivo. Si bien el aumento del pH favoreció la disponibilidad del Cr (VI) no se consideró como una buena condición experimental debido a que cuando se midió la cinética de crecimiento de *E. gracilis* a pH 5 se alteró respecto a la condición con pH 3.5 y la fase estacionaria se estableció en 2.5 células/mL (Figura 21).

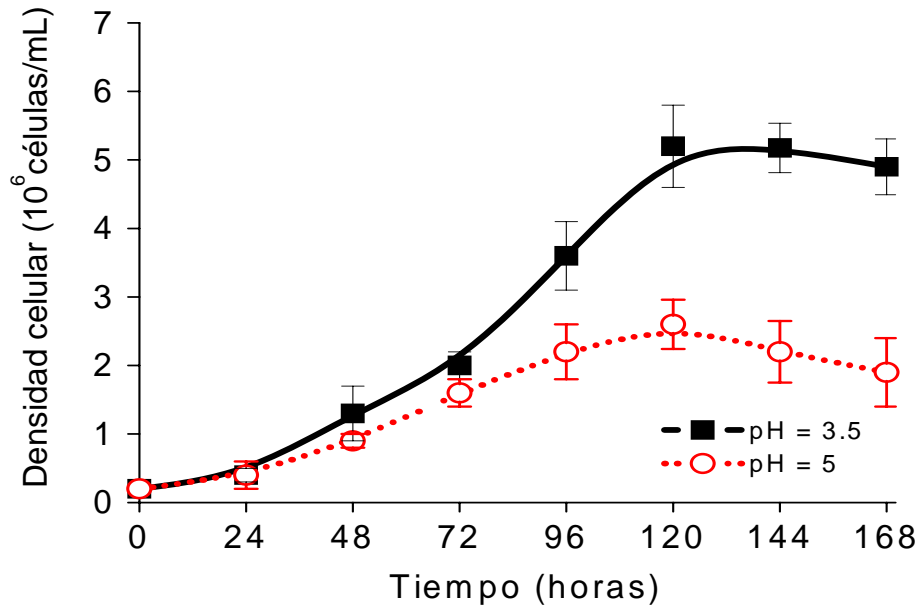


Figura 21. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* en el medio Hutner a pH 3.5 y 5. n = 3.

Se abandonó la idea de modificar el medio Hutner y se pensó en otra estrategia para poder medir la remoción del cromo en *E. gracilis*. Así que se probó medir la remoción de cromo utilizando un número mayor de células expuestas al metal y trabajar en tiempos cortos en donde la disponibilidad de Cr (VI) fuera mayor (Figura 17).

El protocolo para medir la remoción de cromo usando una condición de alta densidad celular se inició con un cultivo de 1 L en medio H1 pH 3.5 y un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL el cual se cosechó por centrifugación a las 72h. El botón celular que se obtuvo se lavó y se volvió a cosechar por centrifugación con en medio H1 y se volvió a

cosechar por centrifugación. Después se resuspendió en un mínimo volumen de medio H1 y se contaron las células cosechadas. Esta solución celular concentrada se usó para hacer las exposiciones a Cr (VI) en 25 mL de medio H1. La densidad celular final en el medio de exposición fue aproximadamente de  $3 \times 10^7$  células/mL.

En un inicio se establecieron como tiempos de cosecha 0.5, 1, 2, 8, 12, 24 y 36 h, sin embargo la cantidad de cromo era muy baja y los resultados eran difíciles de interpretar, por lo tanto los experimentos subsecuentes se siguieron hasta 120h (Figura 22). Las células cosechadas también fueron lavadas con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

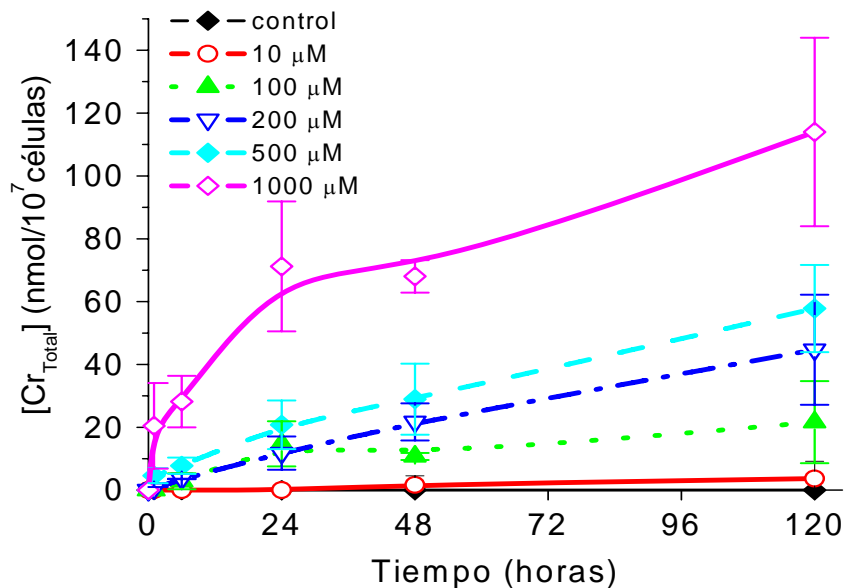


Figura 22. Remoción del cromo en *E. gracilis* en medio H1 usando un inóculo inicial de  $3 \times 10^7$  células/mL.

En la Figura 22 se reportó el total de cromo removido, sin embargo con el fin de saber cuanto cromo se encontraba adsorbido a la membrana celular y cuanto se encontraba acumulado dentro de la célula se hicieron lavados con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M y EGTA 10 mM, pH 7.4 (Figuras 23 y 24).

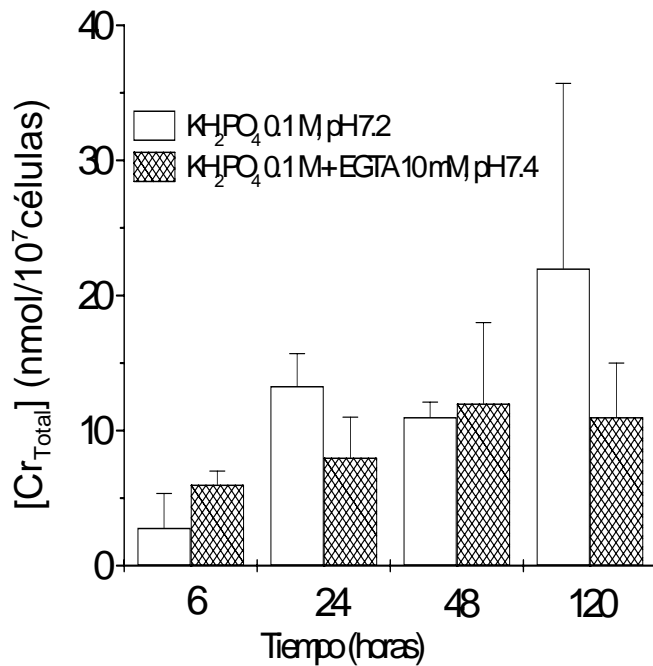


Figura 23

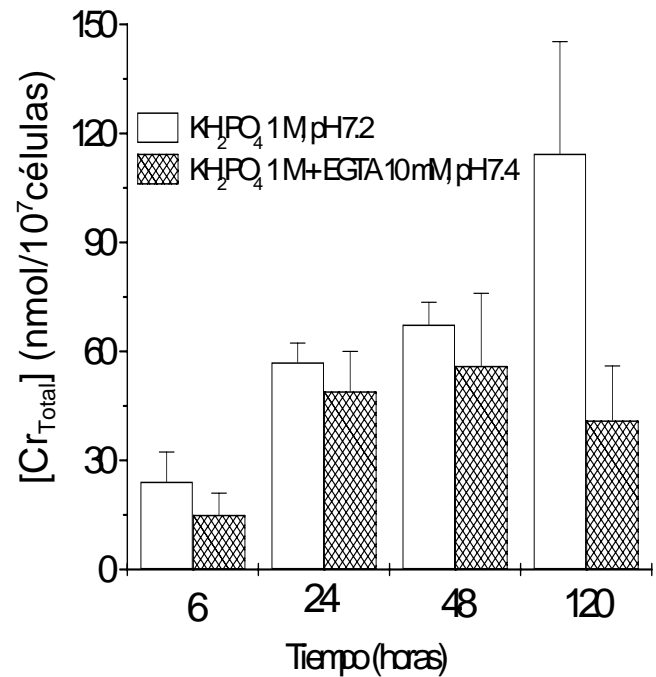


Figura 24

Figuras 23 y 24. Cromo adsorbido y acumulado en *E. gracilis*. El cromo medido después de lavados con EGTA representa el metal acumulado y la diferencia con el cromo medido sin lavados con EGTA representa lo adsorbido. Se muestran exposiciones con 100  $\mu\text{M}$  (Figura 23) y 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 24) de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Los experimentos se realizaron en medio H1 y con un inóculo inicial de  $3 \times 10^7$  células/mL.  $n = 3$ .

Se hicieron las mediciones de crecimiento celular durante el experimento de acumulación de cromo con  $3 \times 10^7$  células/mL (Figura 25) y se observó que a pesar de estar en condiciones de alta densidad celular hubo crecimiento de casi el doble del inóculo inicial. Debido a esto fue de mucha importancia hacer un a cuenta correcta en cada cosecha realizada para poder reportar las cantidades correctas de cromo acumulado.

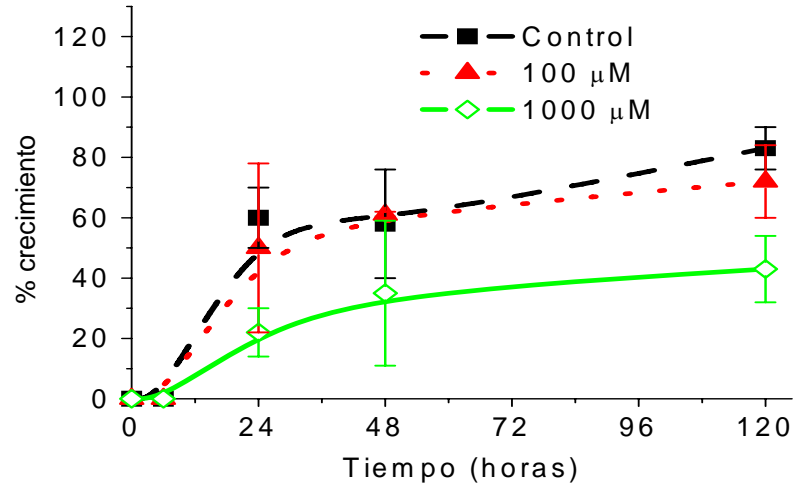


Figura 25.- Crecimiento de *E. gracilis* durante el experimento de remoción de cromo en el medio H1 en condiciones de alta densidad celular. Se expresa en porcentajes debido a que cada experimento se comenzó con un número de células entre  $25 - 35 \times 10^6$  células/mL y cada punto se relacionó con su respectivo inóculo inicial.  $n = 3$ .

Se midió la disponibilidad de Cr (VI) durante el desarrollo de los experimentos de remoción. Se siguió observando la disminución del Cr (VI), lo cual era de esperarse debido a que en este protocolo se utilizó medio H1 pH 3.5 (Figura 26)

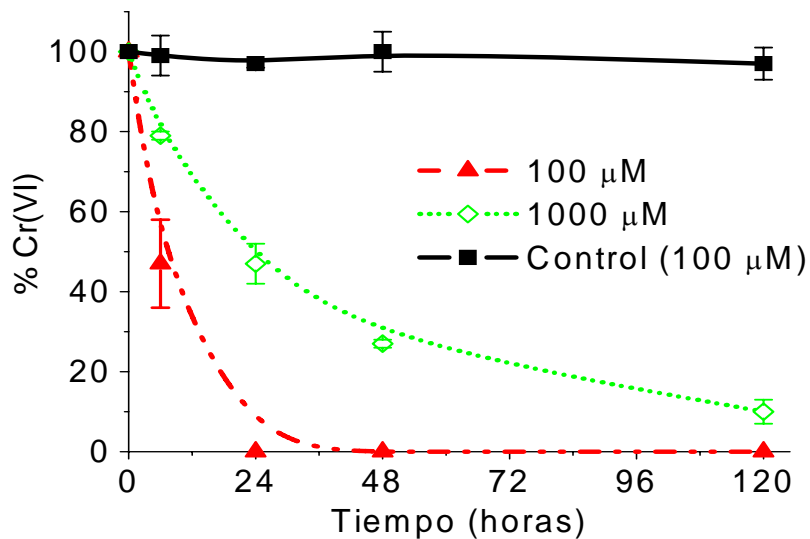


Figura 26. Medición de Cr (VI) durante los experimentos de remoción de cromo en *E. gracilis* en medio H1 (Figura 22). En el control se utilizó como medio  $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilada}}$ .  $n = 3$ .

Aunque se obtuvo una cinética de remoción de cromo en *E. gracilis* en medio H1 pH 3.5, esta condición experimental presentó el inconveniente de que la disponibilidad de Cr (VI) disminuyó por efecto del medio de cultivo y debido a esta razón se decidió probar un medio en el cual el Cr (VI) fuera estable. Se decidió utilizar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2 como medio de exposición ya que se observó que el Cr (VI) fue estable en este medio (Figura 27). Cabe mencionar que cuando se hicieron los experimentos de transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  también se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH7.2.

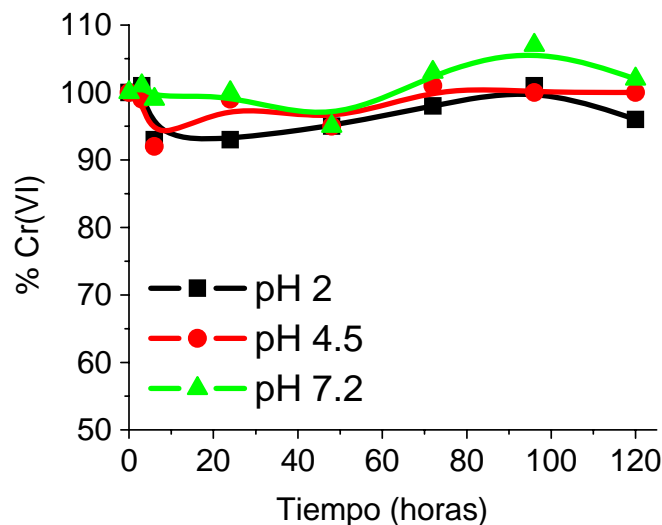


Figura 27. Medición de Cr (VI) en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M y Na acetato 0.02 M a diferentes pH y sin células. En todas las condiciones se usó  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ .

Se usó el protocolo de alta densidad celular descrito anteriormente y se midió el cromo removido por *E. gracilis* durante 120 h de exposición a diferentes concentraciones de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Las células cosechadas en cada punto fueron lavadas por centrifugación con de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.2 (Figura 28).



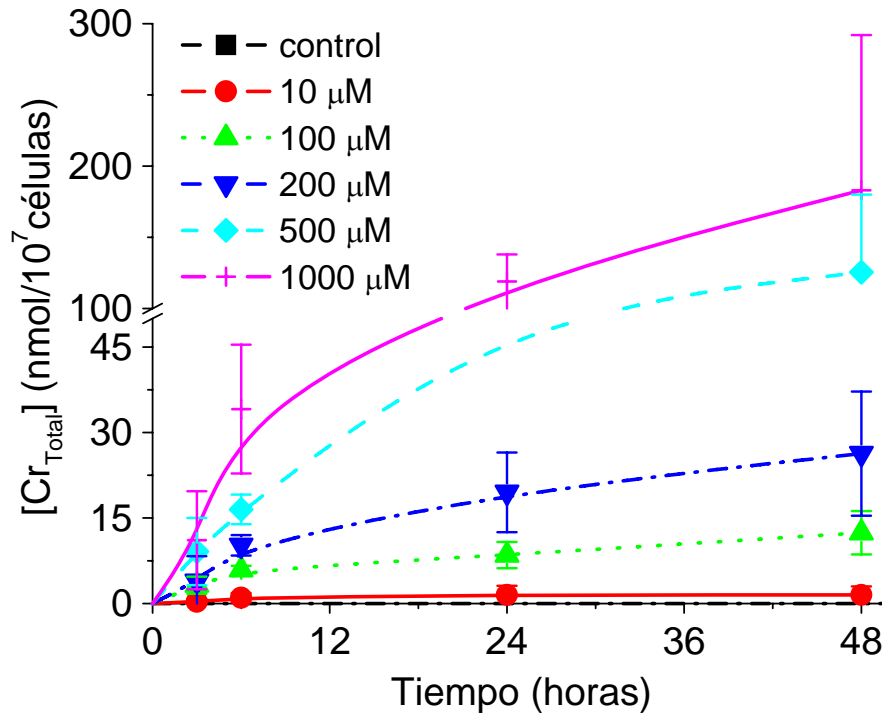


Figura 28. Remoción del cromo en *E. gracilis* utilizando un inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL en buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.2.  $n = 3$ .

Los resultados obtenidos al usar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como medio de exposición mostraron un comportamiento dosis respuesta entre la remoción y la concentración de Cr (VI) a la cual se expuso a *E. gracilis* similar a la obtenida en medio H1, sin embargo se observó que la cantidad de cromo removido en las exposiciones con 500 y 1000  $\mu\text{M}$  a las 24 y 48 h de incubación fue de 2 a 3 veces mayor que la que se midió cuando se usó medio H1 pH 3.5.

En esta condición también se determinó el crecimiento celular (Figura 29), el cual fue nulo e inclusive mostró una disminución, al igual que la viabilidad (41% y 11% en las células expuestas a 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  a las 48 h; y en las células controles de 92%). De igual forma se puso atención en el número de células cosechadas en cada tiempo de muestreo para obtener un valor confiable de la remoción de cromo.

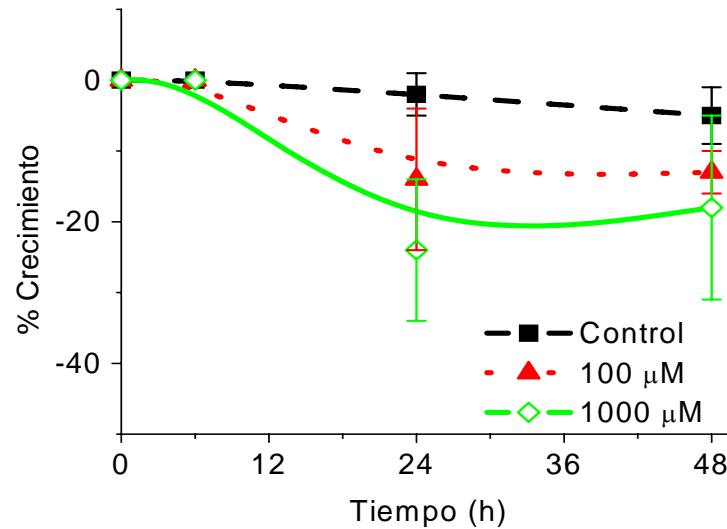


Figura 29. Crecimiento de *E. gracilis* durante los experimentos de remoción de cromo en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los porcentajes se calcularon como se explicó en la Figura 23.  $n = 3$ .

Finalmente, también se midió en esta condición la disponibilidad de Cr (VI) y se observó que esta disminuyó durante el experimento de remoción en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Figura 30), lo cual no sucedió cuando se midió el Cr (VI) en el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sin células.

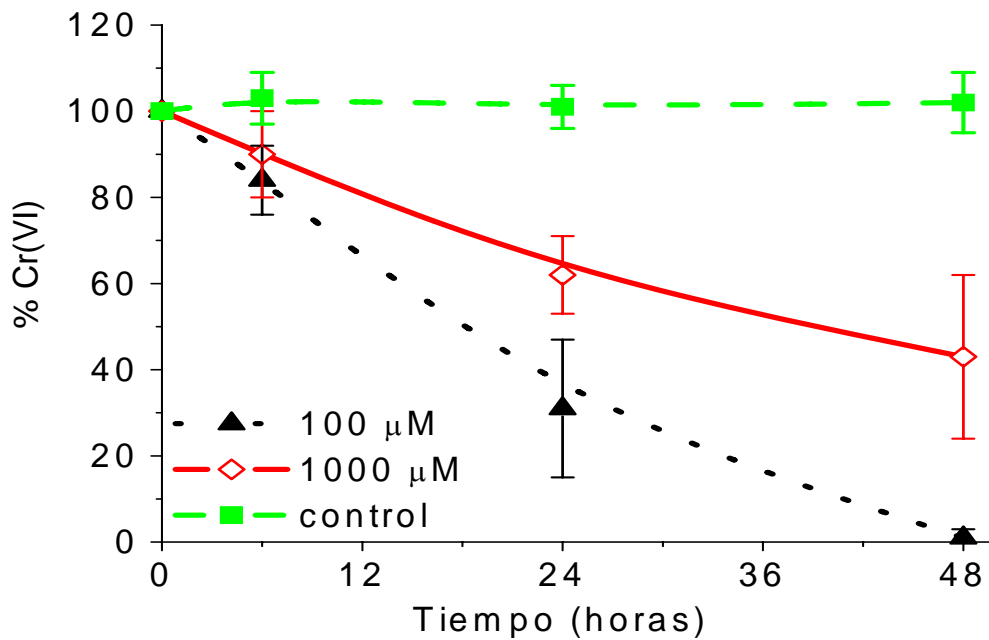


Figura 30. Medición de Cr (VI) durante los experimentos de remoción de cromo en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En el control se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  sin células.  $n = 3$ .

#### **12.4.- Compartimentación**

La compartimentación es otro mecanismo de resistencia y acumulación que se ha descrito en *E. gracilis* ante exposiciones con  $\text{Cd}^{2+}$ . Se propuso determinar este mecanismo en *E. gracilis* expuesta a Cr (VI) debido a que este metal en forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$  puede usar los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  y entrar en las mitocondrias y en los cloroplastos. Si bien no se ha caracterizado los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  en las mitocondrias y las cloroplastos de *E. gracilis*, hay antecedentes que permiten pensar que se encuentran presentes los cual se planteó en la introducción.

En este trabajo se determinó la compartimentación de manera indirecta, para lo cual se consideró como biomarcadores de efecto a la respiración y la fotosíntesis. La interpretación que se usó fue que una alteración en alguna de estas funciones en células expuestas al Cr (VI) evidenciaría la presencia del metal en el organelo respectivo.

La concentración de oxígeno se midió mediante un electrodo tipo Clark. Se obtuvieron trazos como el que se muestra en la Figura 38 y los cálculos se hicieron en base a las pendientes de dichos trazos. Se consideró como la respiración (consumo de oxígeno) a las pendientes R2 y R3 (en la Figura 38) y como la fotosíntesis (producción de oxígeno) a las pendientes F1 y F2 (en la Figura 38) de cada muestra que se midió. De esta manera se determinó en las células control una velocidad de respiración de  $80 \pm 25$  y de fotosíntesis de  $109 \pm 56$  ng AO ( $\text{min} \times 10^7 \text{células}$ )<sup>-1</sup>. n = 3.

En un primer protocolo se expuso a *E. gracilis* a 100  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  durante 6 h usando el protocolo de alta densidad celular ( $3 \times 10^7$  células/mL) en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sin embargo no se observó diferencia respecto a las células control ya que se determinó la respiración de  $90 \pm 25$  y la fotosíntesis de  $126 \pm 52$  ng AO ( $\text{min} \times 10^7 \text{células}$ )<sup>-1</sup> en las células expuestas.

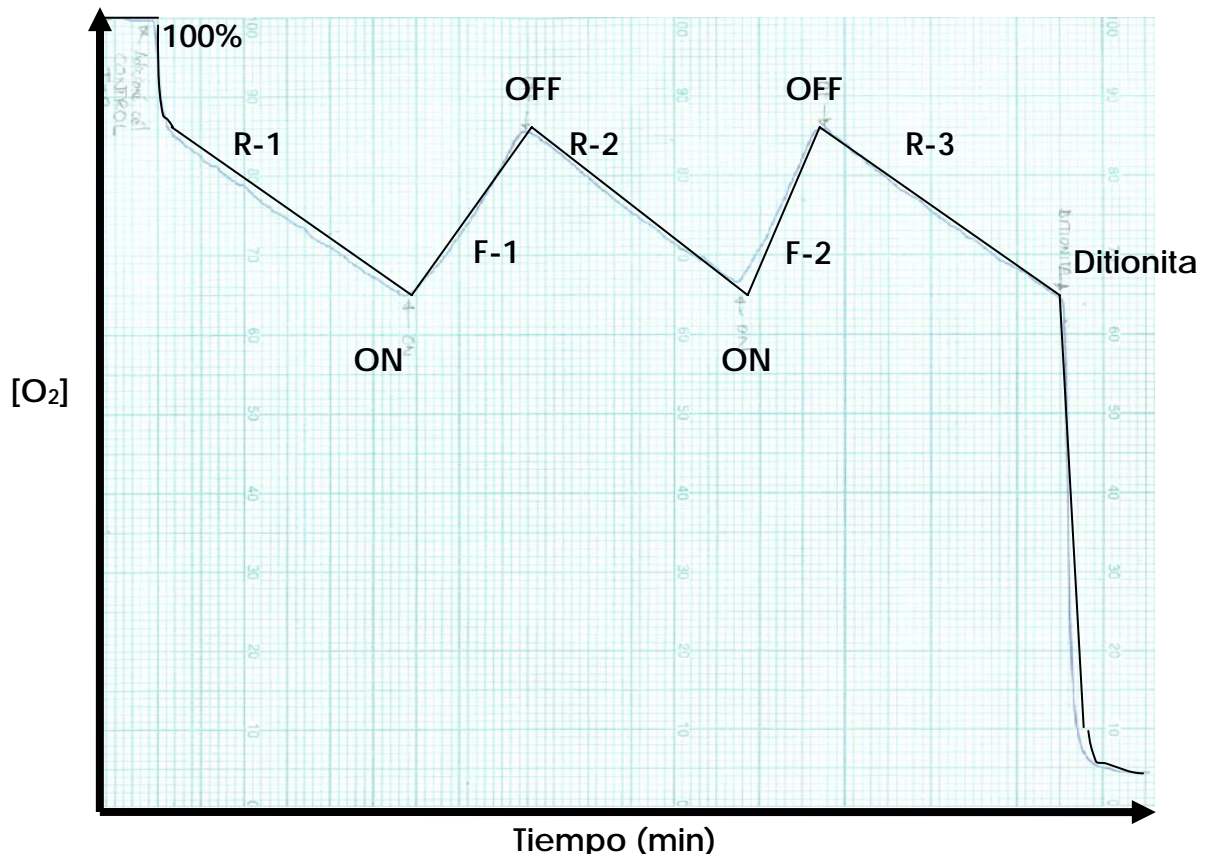


Figura 31. Trazo obtenido de la respiración y fotosíntesis de *E. gracilis* en medio KME pH 7.2, 25° C. La fotosíntesis se controló con un proyector de diapositivas (1000  $\mu\text{mol}$  quanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

En un segundo protocolo las células se expusieron a 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  durante 24 h en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  usando el protocolo de alta densidad celular y se hicieron mediciones a las 3, 6 y 24 h de incubación. Los trazos de las células expuestas a 1000  $\mu\text{M}$  no mostraron consumo ni producción de oxígeno (datos no mostrados) mientras que en las células expuestas a 100  $\mu\text{M}$  la respiración se redujo 74% y la fotosíntesis disminuyó en 100% respecto a sus respectivos controles (Figura 39).

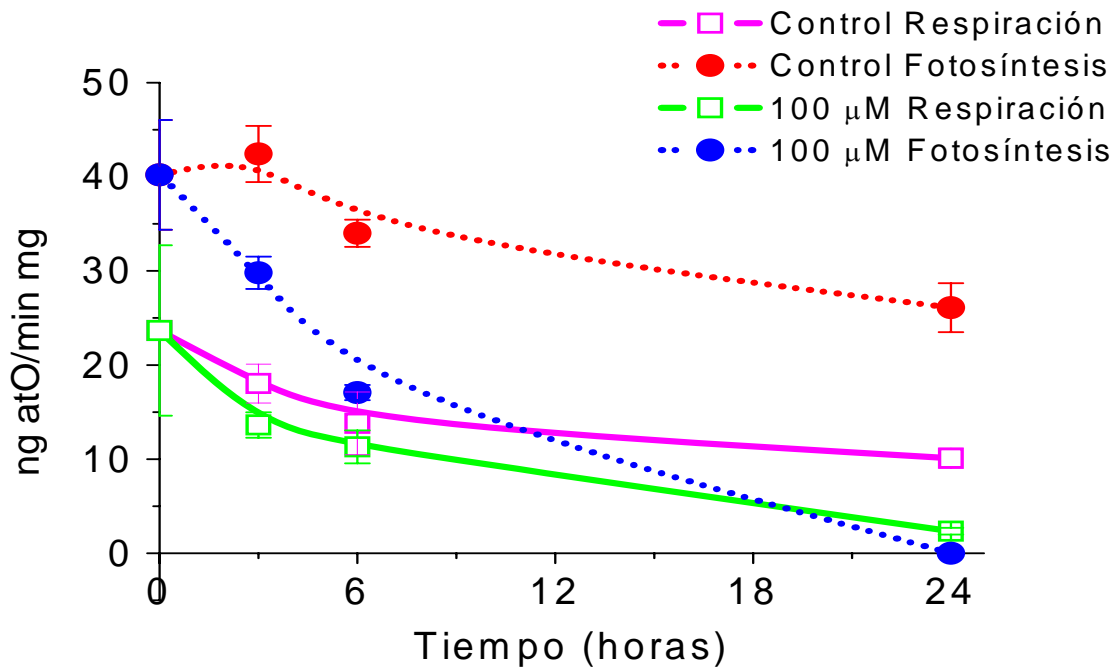


Figura 32. Fotosíntesis y respiración de *E. gracilis* expuesta a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2. Las mediciones se hicieron en buffer KME pH 7.2, 25° C.

Si bien se observó una disminución de la respiración y de la fotosíntesis tanto en células control como en células expuestas, se pudo observar que dicha disminución fue mayor en las células incubadas con  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , lo cual se atribuye a que el cromo entró tanto a la mitocondria como al cloroplasto y tuvo un efecto tóxico. Estos datos apoyarían la propuesta de que el cromo se acumula en la mitocondria y el cloroplasto, sin embargo nos son concluyentes.

### 12.5.- Quelación.

#### PERFIL DE TIOLES

El objetivo de determinar la Cys, el GSH, la  $\gamma$ -EC y las FQ en *E. gracilis* expuesta a Cr (VI) es porque participan en el mecanismo de quelación cuando se expone al protista a  $Cd^{2+}$ , de tal forma que estos tioles son importantes para la resistencia y la acumulación de este metal. Por otro lado, el cromo puede formar enlaces coordinados con grupos químicos donadores de electrones, tales como los grupos tiol presentes en la Cys, el GS, la  $\gamma$ -EC y las FQ.

Para determinar la participación de los monotioles y las FQ en la acumulación de cromo en *E. gracilis* se probaron los mismos protocolos de exposición que cuando se hicieron las determinaciones de remoción ya que ambas mediciones se hicieron en paralelo.

En las primeras mediciones de los monotioles y las FQ, las células fueron expuestas a las  $IC_{50}$  durante un periodo de 120 h y se usó un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL. (Tabla 8 y Figura 33). Estas exposiciones se hicieron en medio H y H1.

Tabla 8. Concentraciones de Cys y GSH+ $\gamma$ -EC en *E. gracilis* expuesta a las  $IC_{50}$  calculadas en las Figuras 10 y 13 durante 120 h. n = 4.

	H*	H1*	H + $IC_{50}$ *	H1 + $IC_{50}$ *
Cys	10 $\pm$ 2	19 $\pm$ 6	40 $\pm$ 18	116 $\pm$ 19
GSH + $\gamma$ EC	10 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	14 $\pm$ 6	26 $\pm$ 7

\*nmol/ $10^7$  células

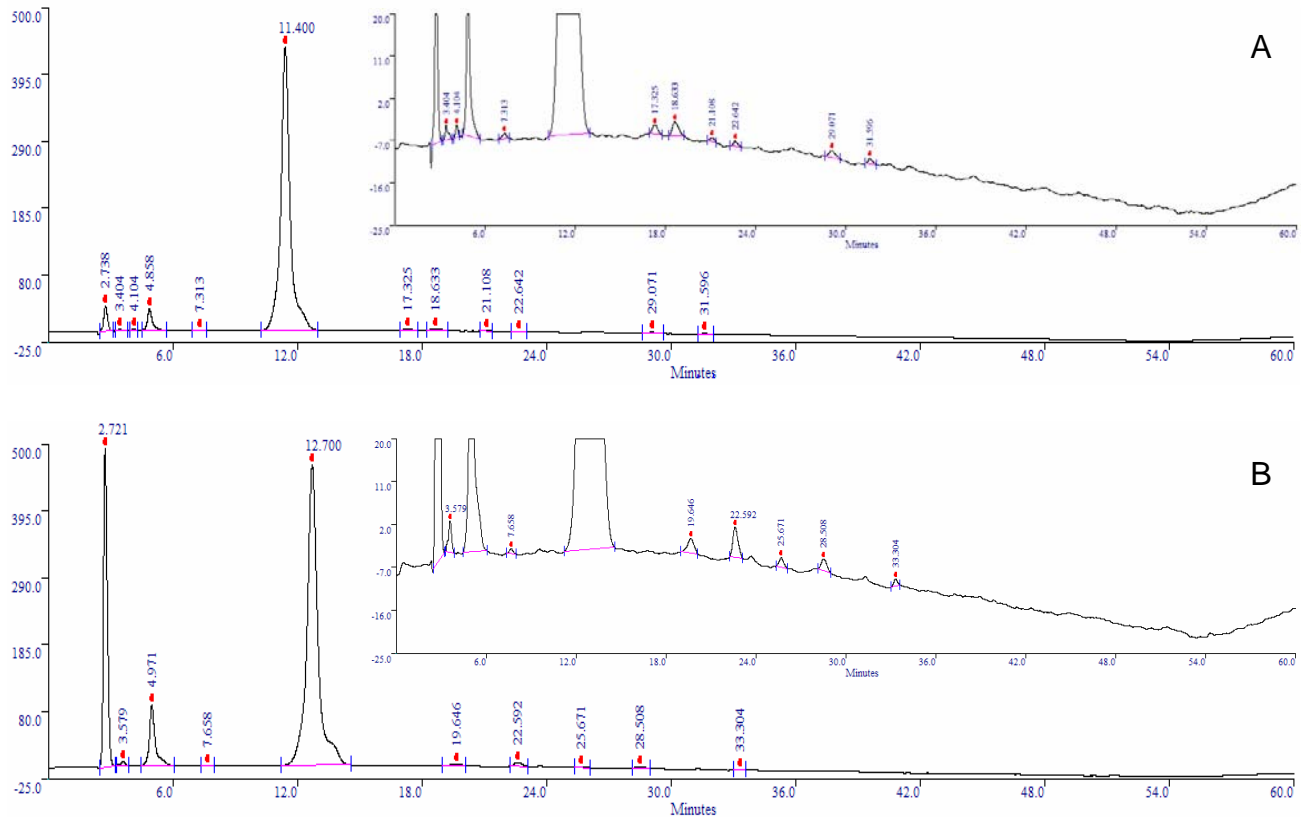


Figura 33. Cromatograma de los monotioles y las FQ de *E. gracilis*. A) Células control; B) Células expuestas a 150  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Se expuso  $0.2 \times 10^6$  células/mL durante 120 h en H1 pH 3.5. La identificación de Cys, GSH y  $\gamma$ -EC se hizo usando patrones internos.

No fue posible cuantificar por separado al GSH y a la  $\gamma$ -EC debido a que no se pudo separar los picos de estos tioles en los cromatogramas que se obtuvieron, por lo tanto en la Tabla 8 se reportó la suma de ambos tioles y se indicó como GSH+ $\gamma$ -EC. En cada figura (Figura 33A y 33B) se insertó un recuadro superior derecho que es un acercamiento de la zona en la cual aparece el pico que corresponde a la FQ2 (Ver sección de metodología). Se esperaba que en las células expuestas a la  $\text{IC}_{50}$  este pico aumentara respecto a las células control, sin embargo al no ser así, se interpreta que no hay inducción de FQ2. La Figura 33 muestra que el pico que se incrementó considerablemente en el cromatograma

de las células expuestas fue el de la Cys y en la Tabla 8 se pudo ver que dicho incremento fue de 4 veces cuando se usó medio H y de 6 veces cuando se usó medio H1.

Posteriormente se hicieron las mediciones de los monotioles y las FQ usando el protocolo de alta densidad celular (inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL) en H1 (Figura 34). Cabe recordar que este protocoló se usó debido a que se tenía problemas para determinar la remoción en medio H1 usando las  $IC_{50}$  durante 120h con un inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL y cuando se usó el protocolo de alta densidad se pudo obtener una cinética de remoción de cromo (Figura 22).

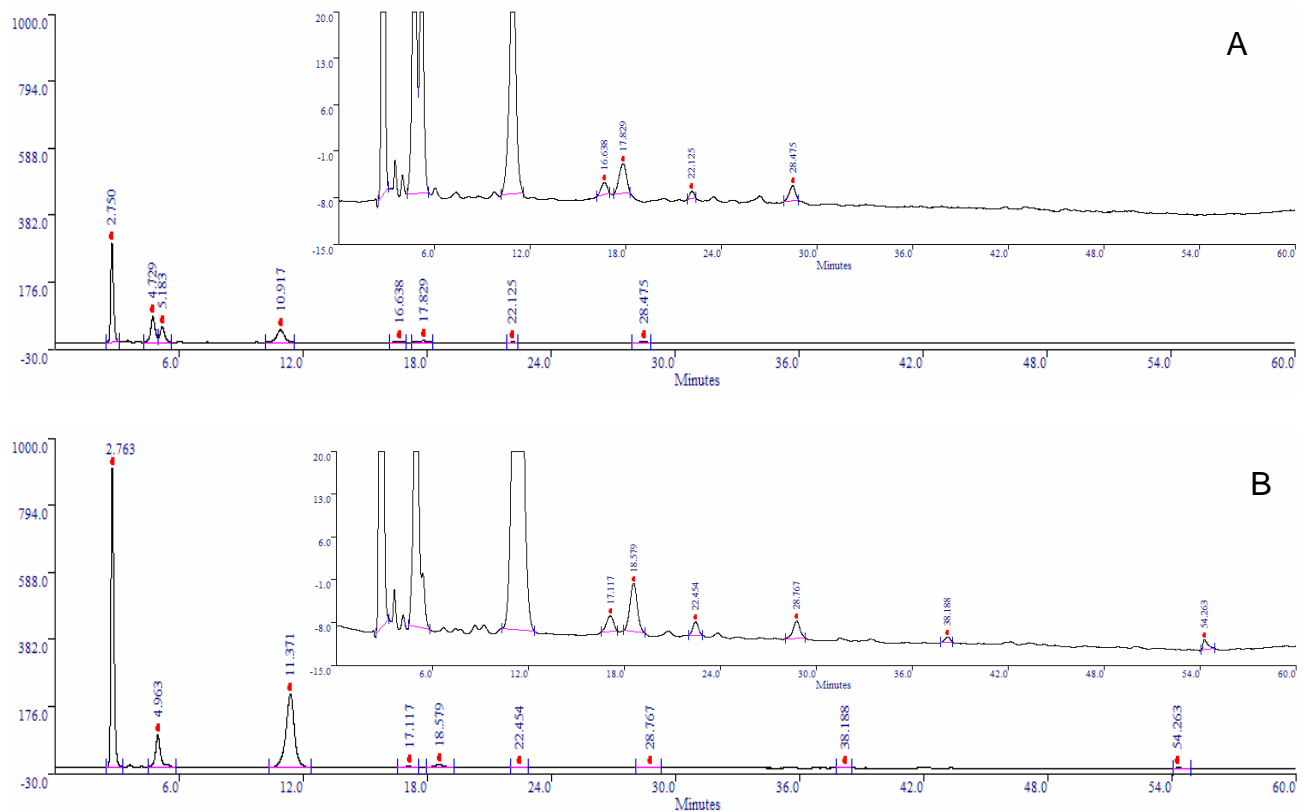


Figura 34. Cromatograma de los monotioles y las FQ de *E. gracilis*. A) Células control; B) Células expuestas a  $100 \mu\text{M K}_2\text{CrO}_4$ . Se expuso  $30 \times 10^6$  células/mL durante 48 h en H1 pH 3.5. La identificación de Cys, GSH y  $\gamma$ -EC se hizo usando patrones internos.



En los experimentos de alta densidad celular se dejó de usar las  $IC_{50}$  y en cambio las células fueron expuestas a 10, 100, 200, 500 y 1000  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en medio H1.

El GSH y la  $\gamma$ -EC se reportaron juntos debido a que tampoco se pudieron separar los picos en los cromatogramas. Por otro lado, tampoco se detectó FQ2 en las células expuestas al metal, lo cual se pudo ver en los recuadros que se insertaron en la Figura 34.

En la Figura 35 se muestra el incremento de la Cys en las células expuestas respecto a las células no expuestas al metal. Se pudo observar que el incremento de este monotiol inició desde las 48 h de exposición y que la mayor acumulación se observó cuando se expuso a 200  $\mu\text{M}$  durante 120 h, llegando a ser de 5 veces respecto del control. También se observó un incremento del GSH+ $\gamma$ -EC de 4 veces en células expuestas a 200  $\mu\text{M}$  (Figura 36).

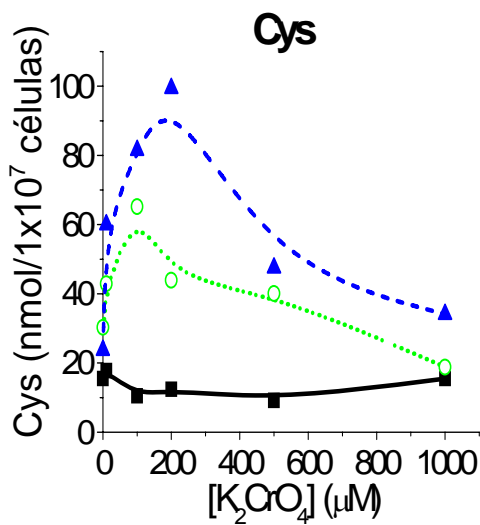


Figura 33

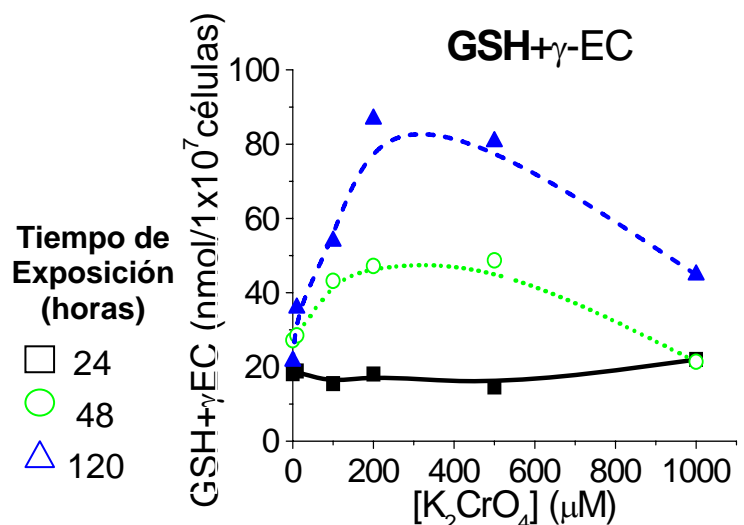


Figura 34

Figuras 35 y 36. Medición de Cys y GSH- $\gamma$ EC en *E. gracilis* expuesta a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Se utilizó un inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL en H1.

Por último, las mediciones de monotioles y FQ se hicieron usando el protocolo de alta densidad en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH7. Cabe recordar que se usó este buffer debido a que se intentó probar un medio en el cual la disponibilidad de Cr(VI) fuera del 100% y de esta forma se pudiera medir la remoción de cromo en *E. gracilis*, entonces también se midieron los monotioles y las FQ para buscar una relación entre ambos parámetros en estas nuevas condiciones de exposición. La Figura 37 muestra los cromatogramas obtenidos.

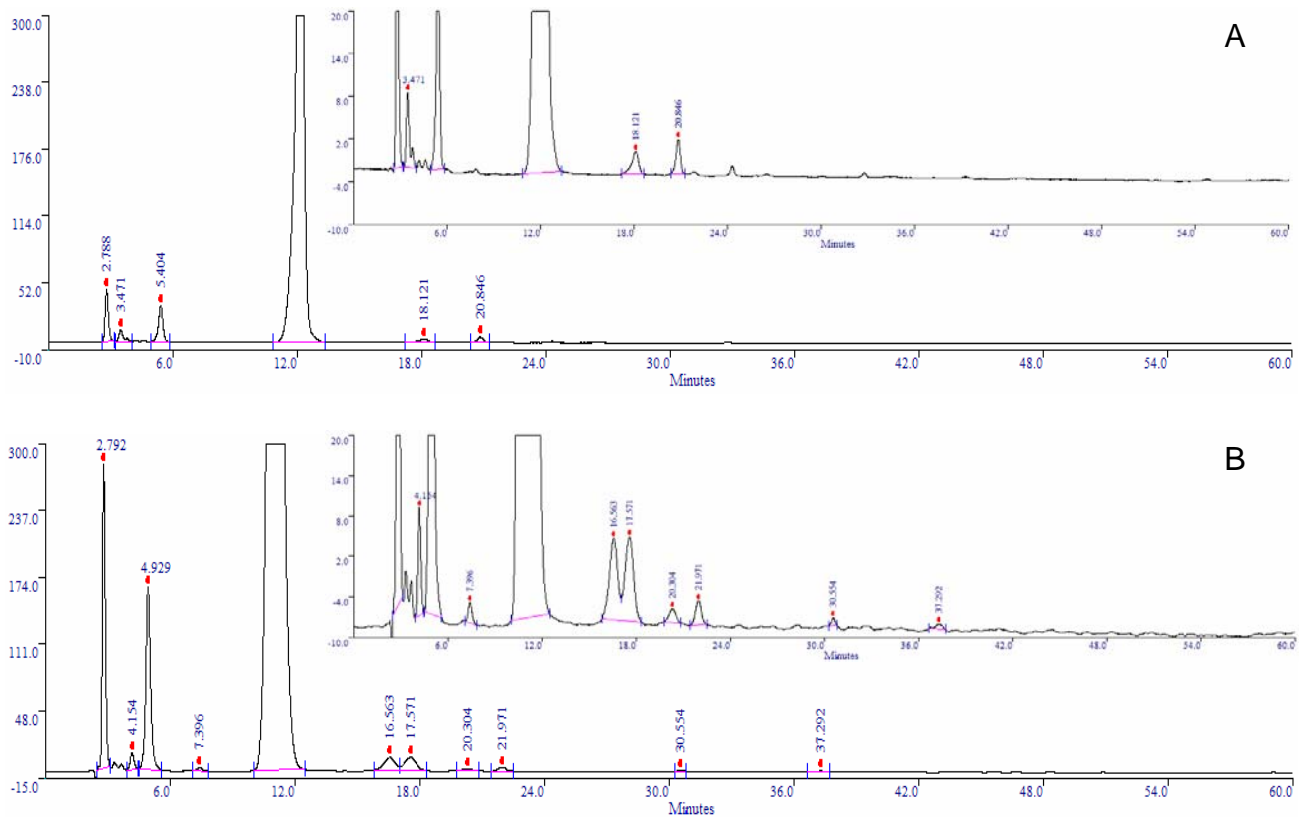


Figura 37. Cromatograma de los monotioles y las FQ de *E. gracilis*. A) Células control; B) Células expuestas a  $100 \mu\text{M K}_2\text{CrO}_4$ . Se expuso  $30 \times 10^6$  células/mL durante 48 h en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2. La identificación de Cys, GSH y  $\gamma$ -EC se hizo usando patrones internos.

En el recuadro de la Figura 37 B correspondiente a las células expuestas a 100  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  se observaron dos picos que parecen incrementar respecto a las células control, lo cual podría indicar un incremento de la FQ2, sin embargo se descartó esta interpretación debido a que ninguno de esos picos correspondió con el tiempo de retención del patrón de la FQ2. Cuando se hizo el mismo análisis con el resto de los cromatogramas obtenidos se pudo observar que no hubo acumulación de FQ2 en ninguna exposición a Cr (VI). En estas mediciones se determinó un incremento de la Cys de 3 veces cuando las células se expusieron a 10 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  durante 48 h (Figura 38), sin embargo a diferencia de cuando se usó medio H1, la máxima acumulación de Cys fue de 20  $\text{nmol}/10^7$  células. El  $\text{GSH}+\gamma\text{-EC}$  sólo aumentó a las 24 h en la exposición con 100  $\mu\text{M}$  y después disminuyó respecto a las células no expuestas (Figura 39).

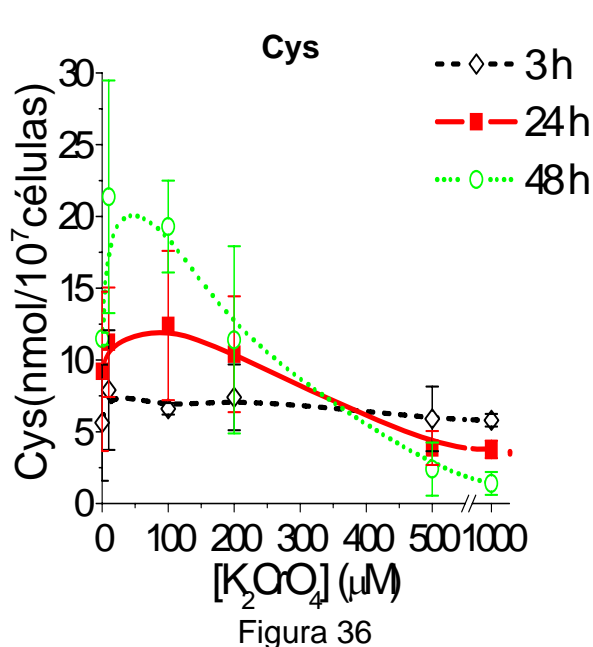


Figura 36

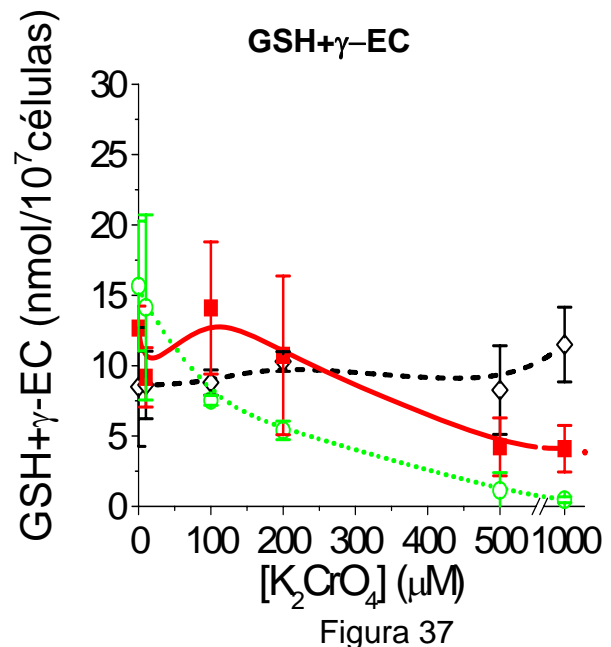


Figura 37

Figura 38 y 39. Mediciones de Cys y  $\text{GSH}-\gamma\text{EC}$  en *E. gracilis* expuesta a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Se utilizó un inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH7.2.

Finalmente, con los datos obtenidos de la medición de los monotioles se hizo un análisis estequiométrico entre la cantidad de tioles solubles y de  $Cr_{\text{removido}}$  cuando se utilizó un inóculo inicial de  $3 \times 10^7$  células/mL tanto en medio H1 como en  $KH_2PO_4$  (Tabla 9). Se puso mayor atención a los datos generados bajo el protocolo de alta densidad celular porque en estas condiciones experimentales se describió la capacidad de remoción de cromo en *E. gracilis*. Esta tabla tuvo el objetivo de mostrar si la cantidad de monotioles acumulados en la célula es suficiente para quelar e inactivar al cromo acumulado.

Tabla 9. Relación de Cys+GSH- $\gamma$ -EC entre el  $Cr_{\text{acumulado}}$  en *E. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de  $K_2CrO_4$ . Se reportan los datos obtenidos en incubaciones durante 120 h en H1 y los datos obtenidos en incubaciones durante 24 h en  $KH_2PO_4$  0.1 M pH7.2 .

	H1	$KH_2PO_4$
[ $K_2CrO_4$ ] ( $\mu$ M)	Cys+(GSH+ $\gamma$ -EC)/ $Cr_{\text{acumulado}}$	Cys+(GSH+ $\gamma$ -EC)/ $Cr_{\text{acumulado}}$
10	26	19
100	6	2
200	4	0.4
500	2	0.03
1000	0.8	0.007

Para construir la Tabla 9 se tomaron en cuenta los resultados de la acumulación de los monotioles (Cys, GSH,  $\gamma$ -EC) y de cromo a 120 h en H1 y a 24 h en  $KH_2PO_4$  debido a que en estos tiempos de incubación se obtuvieron los datos mas altos de acumulación de monotioles, por lo que se consideró que en estas condiciones las células puede responder mejor a una exposición con Cr(VI) vía Cys, GSH y  $\gamma$ -EC.

### 13. Discusión:

Se ha aislado a *E. gracilis* de aguas contaminadas con metales pesados y pH ácidos (Hargreaves, 1975). Esta evidencia ha llevado al estudio de los mecanismos de resistencia que utiliza este protista para resistir dichos ambientes para tener aplicaciones en procesos de biorremediación.

Con el fin de avanzar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y de la capacidad de remoción de metales pesados en *E. gracilis*, en este proyecto se planteó exponer al protista a Cr (VI), para lo cual se utilizó  $K_2CrO_4$ . A diferencia de los metales ya estudiados en el laboratorio ( $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ), el Cr (VI) se encuentra como oxianión en el medio acuoso.

#### - Susceptibilidad

En la Figura 9 y 12 se observó el alargamiento de la fase *lag* de las células expuestas a  $K_2CrO_4$  como consecuencia de la toxicidad del Cr (VI) lo cual coincidió con lo que se había reportado previamente por nuestro laboratorio (Cervantes et al, 2001). Se ha reportado en *E. gracilis* que una exposición a Cr (VI) inhibe la proliferación celular y arresta a las células en fase G-2, lo cual se debe principalmente a daños en la integridad del DNA (Fasulo et al, 1982), lo cual puede ser la explicación de los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento.

Sin embargo se observó que las células expuestas de 10 a 500  $\mu M$  de  $K_2CrO_4$  una vez que entraron a fase exponencial, pudieron llegar a la misma densidad celular en la fase estacionario que los cultivos controles después de un tiempo mas largo de incubación, con una viabilidad > 95%. Esto se atribuye a que después de el primer

contacto con el metal, las células fueron seleccionadas a la toxicidad del Cr (VI) excepto en las células expuestas a 1000  $\mu\text{M}$ .

Se obtuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 460  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , la cual fue alta comparada con los datos de la literatura. Rochetta et al, (2003) reportó una  $\text{IC}_{50}$  de 24.6 y 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  para *E. gracilis* cepa MAT y UTEX, respectivamente. Si bien en este reporte se utilizó  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  en lugar de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , en solución el  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  se disocia en  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Zhitkovich, 2005). Sin embargo, es de llamar la atención la diferencia de 1 o 2 órdenes de magnitud en las  $\text{IC}_{50}$ . En un primer análisis se pensó que la diferencia podía estar en la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  de los medios de cultivo utilizados. Rochetta et al, (2003) empleó medio Buetow, pero no especificó la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Kempner (1982) indica una concentración de 2.1 mM de  $\text{SO}_4^{2-}$  en el medio Buetow. El medio Hutner que se empleó en este proyecto tuvo 2.8 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ . La diferencia en la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  entre el medio Buetow y el Hutner no fue significativa como para explicar la distinta susceptibilidad de *E. gracilis* al Cr (VI).

Otra diferencia en los medios de cultivo es el pH. El medio Buetow tiene un pH de 7 y el Hutner de 3.5. En este proyecto se observó que el crecimiento de *E. gracilis* disminuye al aumentar el pH del medio Hutner de 3.5 a 5 (Figura 21), lo cual puede ser un indicador de que el metabolismo también está disminuido. Por lo tanto la diferencia en la  $\text{IC}_{50}$  de *E. gracilis* a Cr (VI) cuando se cultiva en medio Buetow puede deberse a que a pH 7 el protista no se encuentra en condiciones óptimas de crecimiento y esto lo hace ser más susceptible al metal.

En este trabajo se propone otra explicación que involucra la disponibilidad y la estabilidad del Cr (VI) en el medio de cultivo, ya que se observó que el Cr (VI) se reduce en el medio Hutner sin células (Figura 17). Por lo tanto, al disminuir la especie química del

cromo que puede ser transportada a la célula también disminuye la susceptibilidad de *E. gracilis* al metal. Esta idea se discute de manera más amplia en la sección de remoción.

Considerando este último planteamiento, se puede explicar que no se haya observado diferencia significativa en la determinación de clorofila a y b en células expuestas a las concentraciones de Cr (VI) correspondientes a las IC<sub>50</sub> calculadas (Tabla 4), siendo que hay reportes en la literatura que indican que la disminución de la clorofila es un efecto tóxico observado en plantas expuestas a Cr (VI). Tal es el caso de la planta *Nymphaea spontanea* en donde observaron una disminución en la clorofila total del 40% cuando se expuso a 100 µM de Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> durante 7 días. Si bien no se especifica la composición del medio de cultivo, se señala que los experimentos se realizaron en un intervalo de pH entre 6 y 6.5 (Choo et al, 2006). Rochetta et al, (2003) reportó una disminución de la clorofila en *E. gracilis* del 60% con una exposición de 4 días y usando 12 µM de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, sin embargo se debe recordar que el medio de cultivo que utilizó esta ajustado a pH de 7 y en estas condiciones el cromo en forma de CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es estable.

#### **- Transporte celular del CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>**

En *E. gracilis* no se había medido el transporte celular de CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. En este proyecto se midieron los parámetros cinéticos que definen este proceso. Se obtuvo una  $K_m$  de 1.1 mM CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, la cual fue muy alta comparada con lo observado en las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus* (0.019 y 0.151 mM). La  $V_{max}$  obtenida (16 nmol/h 10<sup>7</sup> células ó 62 nmol/ min g p.s.) fue de 2 a 3 veces menor respecto a lo que se ha reportado para *P. fluorescens* y *A. eutrophus* (170 y 140 nmol/min g p.s. respectivamente) (Ohtake et al, 1987; Niels DH y Silver S, 1989).

Tabla 10. Comparación de la eficiencia de transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis* respecto a bacterias.

Organismo	$V_{max}$ (nmol/min g p.s.)	$K_m$ (nmol/mL $\text{CrO}_4^{2-}$ )	$V_{max}/K_m$ (mL/min g p.s.)
<i>E. gracilis</i>	62	1100	0.056
<i>P. fluorescens</i>	170	19	8.9
<i>A. eutrophus</i>	140	150	0.93

Como se puede observar en la Tabla 10, si se calcula la eficiencia del transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  de *E. gracilis* respecto a lo reportado en bacterias, es posible ver que la entrada del metal en el protista es de 17 – 160 veces menos eficiente respecto a el transporte en bacterias.

Si bien los parámetros cinéticos obtenidos en *E. gracilis* para el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  no coincide con los de bacterias, esto puede ser debido a de la propia cinética de transporte de  $\text{SO}_4^{2-}$ . En este proyecto no se midió el transporte de  $\text{SO}_4^{2-}$ , sin embargo se calculó una  $K_i$  para la inhibición de del transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  con el  $\text{SO}_4^{2-}$ . Tomando en cuenta que el transportador que se esta evaluando es fisiológicamente el del  $\text{SO}_4^{2-}$ , la  $K_i$  se puede interpretar como la  $K_m$  del transportador por su sustrato fisiológico. Siendo así, el transportador de  $\text{SO}_4^{2-}$  que se evaluó se considera de baja afinidad, ya que su  $K_m$  por  $\text{SO}_4^{2-}$  es  $> 100 \mu\text{M}$ .

La inhibición competitiva del  $\text{SO}_4^{2-}$  sobre el transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Tabla 6, Figura 14 y 15) correlacionó con lo reportado en *A. eutrophus*. Este resultado se pudo corroborar al evaluar la susceptibilidad de *E. gracilis* en medio H1 (Hutner con  $0.8 \text{ mM SO}_4^{2-}$ ) el cual contenía 3 veces menos  $\text{SO}_4^{2-}$  que le medio H (Hutner con  $2.82 \text{ mM SO}_4^{2-}$ ). La  $\text{IC}_{50}$



obtenida en estas condiciones fue de 142  $\mu\text{M}$ , 3 veces menor a la  $\text{IC}_{50}$  obtenida usando medio H, lo cual indica que las células fueron más susceptibles al disminuir la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Por lo tanto, el aumento de la susceptibilidad se atribuye a que la disminución del  $\text{SO}_4^{2-}$ , inhibidor competitivo del transporte de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , permite la entrada de una mayor cantidad del metal pesado.

### **- Remoción**

En los experimentos anteriores (susceptibilidad y transporte celular) se pudo demostrar que el Cr (VI) entra a *E. gracilis* cuando se expone a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Sin embargo, otro parámetro importante para cubrir los objetivos de este trabajo era determinar la remoción de cromo. La capacidad de remoción permite evaluar a *E. gracilis* como modelo biológico con fines de biorremediación.

En este trabajo se hicieron modificaciones al protocolo en el cual se expusieron a las células a Cr (VI) debido a que el medio Hutner sin células disminuía la concentración de Cr (VI) (Figura 17), por lo tanto, los resultados obtenidos de cromo removido al usar las concentraciones de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  correspondientes a las  $\text{IC}_{50}$  no fueron confiables (Figura 16). Se pudo determinar que la disminución del Cr (VI) en el medio de cultivo se favorecía con un pH ácido (3.5).

Se sabe que el cromo es un metal de transición, el cual al tener su último nivel de energía incompleto tiene un carácter altamente reactivo y sus propiedades ácido-base y oxido-reducción están determinados por su concentración y el pH. El potencial del sistema Cr (VI)/Cr (III) depende del pH, por lo tanto en medios suficientemente ácidos (<4) y en presencia de un agente reductor, la reacción redox se ve favorecida hacia la formación del Cr (III). Por esta razón, las sales de Cr (VI) se consideran oxidantes fuertes para iones

como el  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{I}^-$  y acetato. A pH de 7 se considera estable las sales de  $\text{CrO}_4^{2-}$  pero cuando se usan concentraciones mayores a 10 mM (Burriel et al, 2001). En este trabajo no se usaron concentraciones mayores de 1 mM de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  debido a que las células se morían con esta cantidad de metal.

Se intentó evidenciar al componente reductor del medio Hutner, sin embargo no fue posible (Figuras 18, 19 y 20) y debido a esta razón se tuvieron que probar otras estrategias que permitieran determinar la remoción de cromo en *E. gracilis*.

Es así como se probó hacer exposiciones con un número mayor de células ( $3 \times 10^7$  células/mL) y se probaron distintas concentraciones de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Se usó medio H1 para hacer la evaluación con la menor competencia del  $\text{SO}_4^{2-}$ . Los resultados obtenidos permitieron construir una cinética de remoción en medio H1, en donde se observó que este parámetro depende de la concentración de Cr (VI) a la cual se expuso a las células. Las cinéticas no mostraron una asíntota clara que evidenciara una saturación de la remoción, sin embargo, tomando en cuenta las desviaciones estándar de los puntos de la curva, se pudo observar que no hay diferencia significativa entre la remoción medida a las 24, las 48 h y las 120 h de exposición, sin embargo si se distingue una tendencia hacia mayor remoción de cromo. Lo anterior se observó en todas las concentraciones de Cr (VI) que se ensayaron. Esto nos conduce a pensar que en las curvas de la Figura 22 se muestran dos comportamientos, uno saturable a las 24 h y otro que permanece lineal a las 120 h y al cual no se pudo determinar su saturación.

Cabe mencionar que la remoción de cromo puede ser debida a dos mecanismos: 1) la adsorción a la membrana celular (cromo removido extracelularmente) y 2) la acumulación (cromo removido intracelularmente). La adsorción (unión entre metal – organismo) no implica un proceso de transporte al interior de la célula y es por eso que se

ha propuesto como un mecanismo de biorremediación muy importante y atractivo, económicamente hablando, ya que este proceso no requiere de mantener cultivos de microorganismos, sino que se puede utilizar biomasa muerta. Se han realizado estudios en biomasa de levadura, de musgo de pantano, de microalgas, de hongos y de algas de mar debido a su capacidad para secuestrar el cromo. En el alga café *Ecklonia sp.* se reportó que la adsorción de Cr (III) es un proceso que está mediado por la unión del cromo a grupos carboxilo y que estas interacciones son favorecidas en pH ácidos (Yun et al, 2001). En el alga *Ulva spp.* se determinó por espectroscopia FTIR (Fourier transform infrared) que en la unión de Cr (III) y Cr (VI) a la biomasa del alga participan grupos amino, sulfonato e hidroxilo, además de los grupos carboxilo descritos en *Ecklonia sp.* Además se reportó que *Ulva spp.* adsorbe 2 veces más Cr (III) que Cr (VI) en un rango de concentraciones de exposición de 0.5 a 2.5 mM. El pH óptimo que se reportó para adsorber Cr (III) fue de 4.5 y para adsorber Cr (VI) fue de 2 (Murphy et al, 2008)

Tomando en cuenta estos antecedentes, se pensó que parte de la remoción de cromo en *E. gracilis* podía ser debido al mecanismo de adsorción. Se lavaron a las células con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M y EGTA 10 mM para diferenciar entre el cromo adsorbido y el cromo acumulado. Estos experimentos se realizaron exponiendo a las células con 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Figura 23 y 24). Los resultados no mostraron diferencia significativa en la cantidad de cromo medido en las células expuestas a 100  $\mu\text{M}$  después de los lavados con el EGTA, por lo tanto podemos considerar que la remoción medida se debe sólo al mecanismo de acumulación. En cambio, en la exposición con 1000  $\mu\text{M}$  si se observó una diferencia en las muestras medidas a las 120 h de incubación, en las que después de los lavados con el EGTA se observó una diferencia de 64% del cromo medido respecto a la medición sin los lavados con el EGTA. Por lo tanto, se consideró que el 64% de la

remoción que se había medido corresponde al mecanismo de adsorción y el 36% restante corresponde al mecanismo de acumulación. También se pudo observar en las Figuras 23 y 24 una saturación de la cinética de acumulación en las células lavadas con EGTA. En las exposiciones con 100  $\mu\text{M}$  la saturación se estableció entre las 24 h de incubación con una remoción de  $10 \text{ nmol}_{\text{Cromo}}/10^7 \text{ células}$ , mientras que en las exposiciones con 1000  $\mu\text{M}$  la saturación se observó a las 48 h con una remoción de  $45 \text{ nmol}_{\text{Cromo}}/10^7 \text{ células}$ . La diferencia en la cantidad de cromo con que se saturaron las cinéticas de las exposiciones con 100 y 1000  $\mu\text{M}$  sugiere que hubo un factor que no permitió que las células pudieran remover más cromo en la exposición con 100  $\mu\text{M}$ . Tomando en cuenta que en este protocolo habían  $3 \times 10^7$  células/mL, la remoción total de las células expuestas a 100  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) en 1 mL fue de 30 nmol, por otro lado en el medio habían 100 nmol/mL, eso quiere decir que aún habían 70 nmol/mL de cromo en el medio que no se removieron. Este cálculo nos permite descartar que la limitante en la remoción de cromo haya sido la concentración de cromo en el medio de cultivo. Así que la diferencia en la saturación de las cinéticas de remoción se atribuyó a la disponibilidad de Cr (VI) en el medio de cultivo H1 ya que cuando se midió la concentración de Cr (VI) a las 24 h de incubación esta fue igual a cero (Figura 17). Por lo tanto, al no haber la especie química capaz de transportarse al interior de la célula la remoción se detiene.

Como se mencionó anteriormente, en la exposición con 1000  $\mu\text{M}$ , la saturación que se observó a las 48 h de incubación se atribuyó al mecanismo de acumulación, mientras que la diferencia en el cromo medido a las 120 h después de los lavados con EGTA se atribuyó al mecanismo de adsorción, por lo tanto es posible proponer que la remoción de cromo en *E. gracilis* expuesta a 1000  $\mu\text{M}$  contempla dos mecanismos y que hay un orden entre ellos, en el cual primero se lleva a cabo la acumulación mediante el uso de los

transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  y después se presenta la adsorción del metal. En la literatura se encontró que Pillichshammer et al, (1995) al exponer el hongo *Mucor hiemalis* al cromo observó dos mecanismos de remoción, uno relacionado con un proceso pasivo de adsorción, el cual lo observó al ensayar exposiciones con Cr (III), y otro llevado a cabo por la acumulación a través de los transportadores de sulfato al usar Cr (VI). Esta referencia apoya la propuesta que se hace en el presente trabajo sobre la remoción de cromo en *E. gracilis*.

Si embargo, los experimentos anteriores se hicieron en medio H1 (pH 3.5) y se observó la disminución de la concentración de Cr (VI) durante el desarrollo de los mismos (Figura 26). Por lo tanto se repitieron los experimentos de remoción usando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2 con el fin de eliminar el artefacto del medio H1. Con este cambio se buscó evaluar si la remoción de cromo aumentaba al favorecer la disponibilidad de la especie química del metal que puede ser transportada en *E. gracilis*.

Los resultados mostraron una cinética de remoción para cada concentración de exposición a Cr (VI) similar a la obtenida en medio H1 (Figura 28). Si bien en las exposiciones con 500 y 1000  $\mu\text{M}$  se midió de 2 a 3 veces más cromo removido a 48 h de incubación, esta diferencia no fue significativa (Figura 28). Por lo tanto, el cambio en el medio no se vio reflejado en un aumento en la remoción de cromo. Respecto a la remoción medida cuando se usó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , cabe señalar que no se observaron diferencias en las mediciones después de hacer lavados con EGTA, por lo tanto la remoción se considera resultado del mecanismo de acumulación celular.

Sin embargo estos experimentos permitieron obtener un dato muy importante ya que cuando se midió la concentración de Cr (VI) en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  durante las exposiciones de las células al metal, se observó que ésta disminuyó respecto al tiempo, mientras que el

control ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sin células) se mantuvo constante (Figura 30). Estos resultados podrían indicar que *E. gracilis* tiene la capacidad de reducir al Cr (VI) extracelular. La reducción extracelular de Cr (VI) se considera un mecanismo de resistencia y también un mecanismo de biorremediación, ya que, por una parte, un microorganismo que reduce al Cr (VI) extracelularmente evita que el metal se transporte a la célula y, por otro lado, se considera que el Cr (III) es menos tóxico que el Cr (VI) debido a que no puede atravesar membranas biológicas (Shakoori et al, 2000; Smith y Gadd, 2000). Si bien este mecanismo ha sido descrito principalmente en bacterias, también se ha reportado en algas y hongos como parte del proceso de biorremediación de estos modelos biológicos. En exposiciones de células muertas de *Aspergillus niger* a Cr (VI) se ha reportado que en el mecanismo de remoción de cromo comprende dos eventos, primero se observa la reducción del Cr (VI) a Cr (III) en un proceso dependiente del pH, y después la adsorción del metal a la biomasa del hongo (Park et al, 2005).

Sin embargo hay que considerar que la disminución en la concentración de Cr (VI) en el medio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  puede ser debida a dos situaciones: 1) la remoción del cromo debida al mecanismo de acumulación y 2) una capacidad oxido-reductora de *E. gracilis* asociada al membrana celular.

Para poder discernir entre el Cr (VI) que desapareció del medio debido a la acumulación y el debido a la reducción extracelular, se consideró que el Cr (VI) medido durante los experimentos de remoción (Figura 30) representan el *Cr (VI) total desaparecido* del medio. Por otro lado, el dato de el *cromo acumulado* ya se tenía registrado (Figura 28), así que para conocer cuanto Cr (VI) disminuyó debido a la reducción extracelular, se restó a el *Cr (VI) total desaparecido* la cantidad de *cromo acumulado* (Figura 40 y 41). Es así como se evidenció que durante las primeras 6 h de

exposición de *E. gracilis* a 100  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  la disminución de Cr (VI) en el medio de cultivo se debe al mecanismo de acumulación celular (Figura 38) y después de ese tiempo, el Cr (VI) que disminuye del medio es debido tanto al mecanismo de acumulación como al de reducción extracelular.

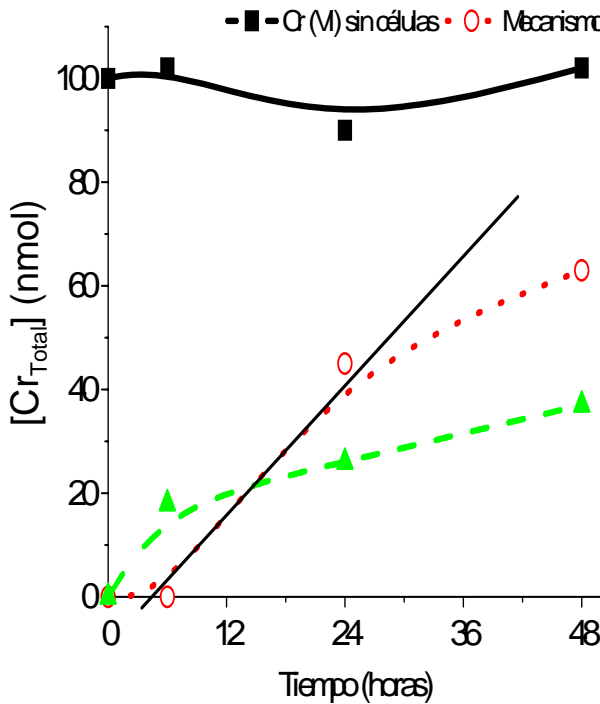


Figura 40

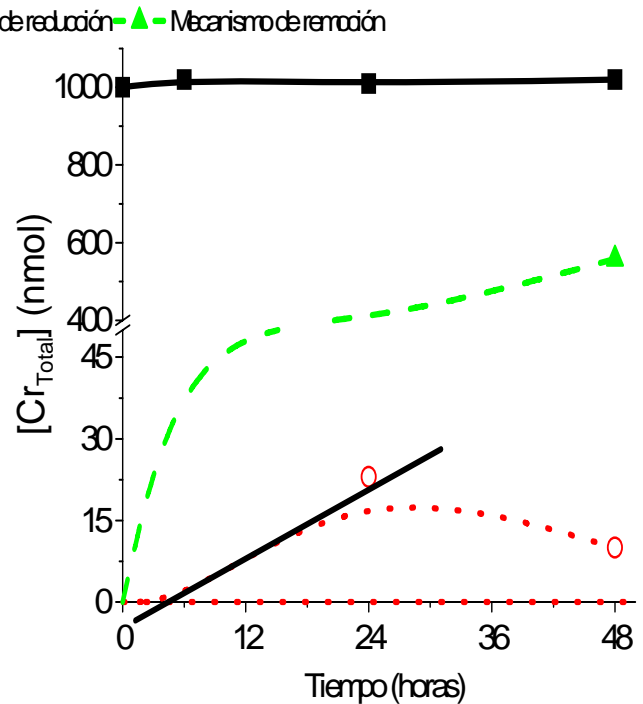


Figura 41

Figuras 40 y 41. Se muestra la reducción y acumulación de Cr (VI) en *E. gracilis* expuesta a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 38) y 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 39) de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  con una densidad celular de  $3 \times 10^7$  células/mL en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se señala la pendiente de la velocidad inicial de reducción.

En la exposición de *E. gracilis* con 100  $\mu\text{M}$  se observó que la reducción extracelular inició a las 6 h de incubación y terminó a las 48 h, lo cual era de esperarse debido a que en ese tiempo de incubación ya no había Cr (VI) disponible en el medio. Bajo el mismo razonamiento se puede explicar que la acumulación se haya detenido a las 48 h, ya que no había  $\text{CrO}_4^{2-}$  para entrar a la célula mediante los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Estos

resultados nos permiten concluir que el mecanismo de reducción extracelular fue capaz de disminuir el 70% de la concentración de Cr (VI) en el medio, mientras que la acumulación pudo remover el 30% del metal durante 48 h de incubación (Figura 40). En el caso de la exposición con 1000  $\mu\text{M}$  se observó que la disminución del Cr (VI) que se midió en el medio extracelular a las 120 h de incubación fue debida, casi en su totalidad, al mecanismo de acumulación (56% del cromo total) y sólo el 1% fue debido al mecanismo de reducción (Figura 41). La mayor reducción extracelular de Cr (VI) se observó a las 24 h (2.7 %).

Además, la Figura 40 muestra un orden en la aparición de los mecanismos de acumulación y reducción extracelular. Con el fin de encontrar una explicación a esta observación se calcularon las velocidades de ambos mecanismos (Tabla 11). La velocidad de reducción de Cr (VI) se calculó con la pendiente de la velocidad inicial que se marcó en las Figuras 38 y 39, mientras que la velocidad de transporte celular se calculó usando la ecuación de inhibición competitiva y los parámetros cinéticos reportados en la Tabla 7. Se puede observar que en la exposición con 100  $\mu\text{M}$  la velocidad de transporte celular de Cr (VI) fue 1.5 veces mayor a la velocidad de reducción, lo cual explica que en la Figura 40 primero se observe el mecanismo de acumulación y después el mecanismo de reducción extracelular.

Tabla 11. Velocidades de transporte celular y de reducción extracelular de Cr (VI) en *E. gracilis* expuesta a 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7.2.

$[\text{K}_2\text{CrO}_4]$ ( $\mu\text{M}$ )	Transporte de Cr(VI)* ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Reducción de Cr(VI)* ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
100	5.2	3.4
1000	29.5	1.6

\*nmol/min  $\text{g}_{\text{proteína}}$



Por otro lado, en la exposición con 1000  $\mu\text{M}$  se observó que la velocidad de transporte celular de Cr (VI) fue 18.4 veces mayor a la velocidad de reducción extracelular. En este caso si fue posible explicar que el mecanismo de acumulación estuviera más favorecido debido a la velocidad del transporte, lo cual correlaciona con lo que se mostró en la Figura 41. Otra explicación es que con 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  la toxicidad que se genera en la membrana celular de *E. gracilis* afecta los componentes (enzimáticos o no enzimáticos) relacionados con el mecanismo de reducción extracelular, ya que en esa exposición se observó una viabilidad del 25% a las 48 horas de incubación.

Esto podría indicar que la eficiencia del mecanismo de reducción extracelular de *E. gracilis* es mayor en exposiciones con concentraciones bajas de Cr (VI), mientras que el mecanismo de acumulación se favorece a concentraciones altas del metal, siempre y cuando se mantenga constante la disponibilidad de  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Por otro lado, el mecanismo de reducción extracelular se podría considerar un mecanismo de resistencia en *E. gracilis* expuesta a Cr (VI), ya que limita el transporte y acumulación del metal.

Los experimentos de remoción de Cr (VI) en *E. gracilis* nos han proporcionado datos con los cuales se puede comparar al protista con otros modelos biológicos expuestos al metal (Tabla 12).

Se pudo observar que *E. gracilis* removió 5 veces menos cromo que el alga *Spirogyra sp.* Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los experimentos fueron diseñados con objetivos distintos. En el alga se buscó evaluar el efecto del pH, tiempo de incubación, concentración de Cr (VI) y cantidad de biomasa sobre la adsorción del metal a los componentes químicos de la biomasa del alga. En cambio en nuestro trabajo se buscó evidenciar mecanismos de resistencia y acumulación que pudieran tener aplicación en la biorremediación de aguas contaminadas con Cr (VI).

Una perspectiva importante de este trabajo es buscar las condiciones de exposición de *E. gracilis* a Cr (VI) (pH, tiempo de incubación, concentración de Cr (VI), cantidad de células, etc.) para obtener la mayor capacidad de remoción de cromo, ya sea por el mecanismo de adsorción ó acumulación. El uso de biomasa seca de *E. gracilis* no se ha probado hasta el momento, sin embargo se debe contemplar como una opción debido a los resultados que se reportan en el alga *Spirogyra sp.*

Tabla 12. Tabla comparativa de la capacidad de remoción, adsorción y reducción extracelular de modelos biológicos expuestos a Cr (VI). La 2da y 3ra columna representan la remoción expresada en mgCr/g p.s. y en porcentaje, según la referencia. En paréntesis se muestran las condiciones de exposición: concentración, tiempo de incubación y pH.

Microorganismo	mgCr/g p.s.	% Adsorción	% Reducción Extracelular
<i>Euglena gracilis</i> (Protista)	<b>2.8</b> (1 mM, 48h, pH 7)	<b>50</b> 1mM, 120 h, pH 3.5)	<b>100</b> (0.1 mM, 48 h, pH 7)
<i>Candida guilliermondii</i> <sup>1</sup> (Levadura)	<b>6.7</b> (2 mM, 24h, pH 5.5)		
<i>Spirogyra sp.</i> <sup>2</sup> (Alga)	<b>14.7</b> (0.09 mM, 2h, pH 2)	<b>96</b> (0.09 mM, 2 h, pH 2)	
<i>Aspergillus sp. y Penicillium sp.</i> <sup>3</sup> (Hongos)	<b>0.001</b> (1 mM, 60 h)		<b>90</b> (1 mM, 72h)
<i>Nymphaea spontanea</i> <sup>4</sup> (Planta)	<b>2.1</b> (0.2 mM, 168 h, pH 7)		
<i>Arthrobacter aurescens</i> <sup>5</sup> (Bacteria)			<b>100</b> (1 mM, 120h)

<sup>1</sup> Kaszycki, P, et al., 2004; <sup>2</sup> Gupta, VK, et al, 2001; <sup>3</sup> Acevedo-Aguilar, JF, et al, 2006;

<sup>4</sup> Cho, TP, et al, 2006; <sup>5</sup>Horton, RN, 2006.

Sin embargo, con los resultados que se han obtenido hasta el momento se puede ver que *E. gracilis* puede remover los mismos niveles que la planta *N. spontanea* pero en menor tiempo de incubación. Aunque la levadura *C. guilliermondii* removió 2 veces mas cromo, la ventaja de *E. gracilis* sobre la planta, la levadura e inclusive sobre el alga *Spirogyra sp.* es la capacidad de reducción extracelular.

Si se compara la capacidad de reducción extracelular de *E. gracilis* respecto a lo reportado para los hongos *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y la bacteria *A. aurescens*, el protista es competitivo ya que redujo el 100% de la concentración de Cr (VI) disponible en el medio de cultivo. No es posible comparar que es mejor o peor modelo debido a que las concentraciones de exposición de Cr (VI) son diferentes. Sin embargo, a diferencia de los hongos y la bacteria, en este trabajo se observó que *E. gracilis* es capaz de remover cromo exavalente del medio de cultivo.

Estos resultados nos permiten concluir que *E. gracilis* es un buen modelo para biorremediación de aguas contaminadas con Cr (VI), ya que cuando se expuso a 100  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) a pH 7 y se usó  $3 \times 10^7$  células/mL, se observó una biorremediación del 100%, 30% mediante el mecanismo de acumulación y 70% mediante el mecanismo de reducción extracelular de Cr (VI) a Cr (III). Sin embargo, para que *E. gracilis* pueda ser un modelo mas competitivo en la biorremdiación de Cr (VI) respecto a otros, se deben probar distintas condiciones de exposición en las que se obtenga la mayor eficiencia de los mecanismo de remoción (acumulación y adsorción) y reducción de Cr (VI) con el menor gasto posible.

### **- Compartimentación**

Los resultados de la Figura 24 y 25 mostraron que *E. gracilis* es capaz de acumular cromo, además en el análisis de los resultados de remoción y reducción extracelular de

cromo (Figura 40 y 41), se observó que cuando se expuso a *E. gracilis* a 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , se favoreció el mecanismo de acumulación del metal comparado con los resultados de la exposición con 100  $\mu\text{M}$ , y esto nos llevó a proponer que a concentraciones altas de Cr (VI) se favorecería el mecanismo de acumulación. Por lo tanto, con el fin de describir lo que sucedía en *E. gracilis* al acumular cromo, se planteó como objetivo determinar si *E. gracilis* utiliza el mecanismo de compartimentación.

Se consideró que los cloroplastos de *E. gracilis* podían participar en este mecanismo debido a que en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* y en la planta *Arabidopsis* se ha reportado la presencia de transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Takahashi et al, 1999; Chen y Melis, 2004). También se consideraron a las mitocondrias, las cuales, a pesar de que tampoco se han descrito los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  en ellas, se considera que debe tener un transportador de  $\text{SO}_4^{2-}$  debido a que se ha caracterizado el sistema de activación de la vía de asimilación de sulfato (ATP sulfurilasa, adenilil sulfato cinasa y pirofosfatasa) en *E. gracilis* (Saidha et al., 1985).

Esta propuesta implica que el cromo acumulado se encuentre en forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , lo cual es difícil de asegurar debido a que en el citosol hay metabolitos que pueden reducir al Cr (VI) (GSH, Cys, NADH, etc.) a especies de menor valencia. Por lo tanto, la compartimentación en los cloroplastos y las mitocondrias depende de la concentración intracelular del Cr (VI) y de la velocidad de transporte a dichos organelos. A diferencia de la acumulación celular de cromo, en esta ocasión no fue posible hacer una predicción teórica de la acumulación del metal en los organelos, debido a que no se han reportado los parámetros cinéticos del transporte de Cr (VI) en los cloroplastos y en las mitocondrias.

Sin embargo, en este proyecto se intentó definir la compartimentación de cromo mediante la medición de la respiración y la fotosíntesis en células expuestas a 100  $\mu\text{M}$  de

$K_2CrO_4$  durante 24h. Se observó una disminución del 74% de la respiración y del 100% de la fotosíntesis respecto a las células control (no expuestas al metal). Las células control también disminuyeron su capacidad de respiración y fotosíntesis entre 35-40%, aunque en este caso la disminución se puede atribuir a que el buffer de  $KH_2PO_4$  no favorece el metabolismo energético de *E. gracilis* (Figura 32). Estos resultados cualitativos indican que la alteración que se observó en la respiración y la fotosíntesis fue debida a un efecto tóxico del metal, el cual pudo ser porque el metal entró a dichos organelos o, de manera indirecta, por la formación de especies reactivas de oxígeno, en cuyo caso no implica una presencia del metal dentro de los organelos. Por lo tanto, La inhibición de estas funciones metabólicas no es suficiente para concluir que el cromo se compartimento en la mitocondria y en el cloroplasto. Para redondear estos resultados se propone hacer un aislamiento de las mitocondrias y de los cloroplastos y medir el cromo acumulado en ellos. Estas mediciones también son parte de las perspectivas de la presente tesis.

### **- Quelación**

En las tres condiciones de exposición a Cr (VI) que se ensayaron en este trabajo (H1 con inóculo de  $0.2 \times 10^6$  células/mL, H1 con inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL y  $KH_2PO_4$  con inóculo de  $3 \times 10^7$  células/mL) el resultado constante fue el aumento de la Cys respecto a otros monitoles y FQ (33, 34 y 37). Este resultado fue importante porque la Cys es uno de los metabolitos que participan en la reacción redox intracelular del Cr(VI) (Valko et al, 2005) y por otro lado, actúa como inhibidor del transporte de sulfato (Breton y Surdin-Kerjan, 1977).

Tomando en cuenta estos antecedentes se pueden hacer dos interpretaciones de los resultados obtenidos, por una parte el aumento de Cys puede favorecer la reducción

del Cr (VI) intracelular a especies de menor valencia, lo cual disminuiría la concentración de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en el citosol, lo cual disminuiría el transporte de compartimiento del Cr (VI) en la mitocondria y al cloroplasto. Por otro lado, la acumulación de Cys podría inhibir el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  en *E. gracilis*, con lo que la acumulación del cromo sería menor. De ser cierta esta propuesta, el aumento de la Cys representaría un mecanismo de resistencia y no un mecanismo de acumulación, ya que al evitar que el metal entre a la célula, *E. gracilis* se está protegiendo.

En *Neurospora crassa* y *Rhodospirium toruloides* se ha determinado que la resistencia a exposiciones con Cr (VI) esta relacionada con una deficiencia parcial o completa del transporte de sulfato (Marlzuf, 1970, Baldi et al, 1990; Pepi et al, 1995). Por lo tanto también se contempla como perspectiva de este trabajo medir el transporte y la acumulación de Cr (VI) en *E. gracilis* pre-expuesta a Cr (VI), lo cual no se ha reportado en la literatura.

El GSH y la  $\gamma$ -EC sólo aumentaron cuando se usó medio H1 con el protocolo de alta densidad celular ( $3 \times 10^7$  células/mL) (Figura 36), y cuando se cambió el medio por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se observó una disminución. Lo anterior podría atribuirse a que el cromo acumulado es tóxico para las enzimas  $\gamma$ -glutamil sintetasa y glutatión sintetasa, las cuales son responsables de la producción de GSH y  $\gamma$ -EC. Sin embargo también se debe considerar la posibilidad de que el cromo acumulado generó un efecto activador sobre la enzima serina acetil transferasa responsable de la producción de Cys (Figura 3). Debido a que no se puede descartar ninguna de las dos interpretaciones con los resultados obtenidos hasta el momento, se propone como perspectiva evaluar la actividad enzimática de las enzimas que se han mencionado anteriormente, en presencia de las concentraciones de cromo que se midieron en la acumulación.

El objetivo de la Tabla 9 fue hacer una predicción de la capacidad de respuesta de *E. gracilis* mediante la Cys, el GSH y el  $\gamma$ -EC ante la acumulación de cromo. Una alta cantidad de estos respecto al cromo acumulado sería indicativa de que habría la suficiente cantidad de monitioles, tanto para suministrar los requerimientos metabólicos (síntesis de proteínas) de la célula, como para unirse al cromo acumulado y formar los enlaces coordinados. Se consideró posible la formación de enlaces coordinados entre los monitioles y el cromo debido a que hay reportes en donde se ha demostrado que la Cys y GSH puede formar complejos con el cromo cuando se encuentra en la forma trivalente (Meester et al, 1977; Madafiglio et al, 1990, Gaggelli et al, 2002).

Tomando en cuenta que el cromo deja de ser reactivo al formar 6 enlaces coordinados y se estabilizar su carga (Steel, 1971), se puede proponer que cuando se expone *E. gracilis* a 10  $\mu$ M en el medio H1, la Cys, el GSH y el  $\gamma$ -EC pueden unirse eficientemente al metal y proteger a la célula, ya que ante esta exposición de Cr(VI) en *E. gracilis* se calcularon 26 nmol totales de grupos tioles (Cys + GSH- $\gamma$ EC) por cada nmol de cromo acumulado. Lo anterior correlaciona con que no se afectó el crecimiento celular. Cuando se exponen las células a Cr (VI) en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  la capacidad de protección de los monitioles es menor, lo cual correlacionó con la disminución del crecimiento celular, la respiración y la fotosíntesis. Tomando en cuenta que las aguas contaminadas llegan a tener hasta 1 mM de Cr (VI) (Tabla 1), y que en la Tabla 9 la relación estequiométrica monitioles/cromo acumulado con una exposición a 1 mM de Cr (VI), se puede concluir que la quelación de cromo mediante la Cys, el GSH y el  $\gamma$ -EC no representa un mecanismo de resistencia.

### 13. Conclusiones:

- La susceptibilidad de *E. gracilis* al Cr (VI) depende de la concentración del Cr (VI) y del sulfato en el medio de cultivo.
- El  $\text{CrO}_4^{2-}$  entra a la célula de *E. gracilis* mediante transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  de baja afinidad.
- *E. gracilis* utiliza los mecanismos de acumulación y adsorción para remover el Cr (VI) y el mecanismo de la reducción extracelular para resistir la exposición al metal, sin embargo, los tres mecanismos mencionados disminuyen la concentración de Cr (VI) del medio de cultivo.
- La exposición de *E. gracilis* a Cr (VI) disminuye la capacidad de respiración y fotosíntesis, lo cual puede ser debido a la compartimentación del metal en las mitocondrias y los cloroplastos.
- *E. gracilis* al ser expuesta a Cr (VI) acumula cisteína, glutatión y  $\gamma$ -glutamil-cisteína, pero no induce síntesis de fitoquelatinas.
- La cantidad de monotioles que acumula *E. gracilis* durante una exposición menor a  $100 \mu\text{M}$  de Cr (VI) es suficiente para quelar al cromo que se acumula en la célula.
- Los mecanismo de resistencia de *E. gracilis* a Cr (VI) pueden ser aplicados en la biorremediación de aguas copnatminadas con este metal.



#### 14. Perspectivas:

- Determinar el efecto de la acumulación de la Cys sobre el transporte celular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ . Debido a que la Cys inhibe la expresión de los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$ , también podría disminuir la entrada de  $\text{CrO}_4^{2-}$ . De ser así, la disminución del transporte del metal al interior de la célula debido a la Cys se puede proponer como un mecanismo de resistencia de *E. gracilis* a las exposiciones con Cr (VI)

- Determinar el mecanismo por el cual se lleva a cabo la acumulación de Cys ante una exposición al Cr (VI). Medir los efectos del cromo acumulado sobre las enzimas y sobre los transportadores responsables de la producción y consumo de Cys. Esto ayudaría a saber si la acumulación de la Cys responde a un efecto inhibitorio (tóxico) o de activación sobre las enzimas involucradas con la poza de este tiol. Bajo este enfoque se determinó que el cadmio es un activador esencial para la fitoquelatina sintasa (Mendoza-Cozatl et al., 2005), enzima clave en la resistencia de *E. gracilis*.

- Determinar las condiciones de exposición en las cuales *E. gracilis* pueda mostrar mayor eficiencia en los mecanismos de acumulación, adsorción y reducción extracelular de Cr (VI), con el fin de tener parámetros que ayuden a que el protista se un modelo atractivo para la biorremediación de aguas. Medir el límite de el mecanismo de adsorción, el cual es independiente de gasto energético y es económicamente importante. Las condiciones que se deben probar tienen que considerar tiempo de exposición, pH, cantidad de muestra, usar biomasa seca, concentraciones de Cr (VI), entre otras.

- Definir el componente enzimático o no enzimático responsable del mecanismo de reducción extracelular de Cr (VI) en *E. gracilis*. En la literatura se ha reportado que esta reacción es favorecida en medios con pH ácidos, sin embargo no se ha detallado los componentes de la misma. Es importante conocer el o los componentes que participan en esta reacción redox para tener información que represente una ventaja biotecnológica en el diseño de estrategias con fines de biorremediación.

- Teniendo en cuenta que una situación real plantea una exposición a mezclas de metales, se propone evaluar la capacidad de biorremediación de *E. gracilis* ante una exposición con la mezcla de Cr(VI) y Cd<sup>2+</sup>, siendo que los mecanismos de resistencia y remoción que utiliza el protista para cada metal son diferentes. Se espera que el protista pueda usar los mecanismos de resistencia y acumulación que se describieron en exposiciones separadas. Esto reforzaría la propuesta de *E. gracilis* como modelo de biorremediación.

## 15. Bibliografía:

- Acevedo-Agular, FJ, Espino-Saldaña, AE, León-Rodríguez, IL, Rivera-Cano, MaE, Ávila-Rodríguez, M, Wrobel, K, Wrobel, K, Lappe, P, Ulloa, M, Gutiérrez-Corona, (2006). Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. *Can J Microbiol*, 52:809-815.
- Alexander, J, Aaseth, J, (1995). Uptake of chromate in human red blood cells and isolated rat liver cells: The roll of the anion carrier. *Analyst*, 120:931-933.
- Armienta-Hernández, MA, Rodríguez-Castillo, R, (1995). Environmental exposure to chromium compounds in the Valley of León, México. *Environ Health Perspect*, 103:47-51.
- Armienta, MA, Morton, O, Rodríguez, R, Cruz, O, Aguayo, A, Cenicerros, N, (2001), Chromium in tannery wastewater irrigated area, Leon Valley, México. *Bull Environ Contam Toxicol*, 66:189-195.
- Arnon, D, (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24:1-15.
- Atlas, RM, Uterman R, (1999). *Bioremediation*. ASM. Press; 666-681.
- Avilés, C, Loza-Tavera, H, Terry, N, Moreno-Sánchez, (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol*, 180:1-10.
- Barque, JP, Schedler, P, Floch, E, Bonay J, (2000). In *Euglena gracilis*, a Heat-Shock protein related to hsc73 is constitutive and stress inducible. *Arch Biochem Biophys*, 378: 1-5.

- Baldi, F, Vaughan, AM, Olson, GJ, (1990). Chromium (VI)-resistant yeast isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes. *Appl Environ Microbiol*, 56:913-918.
- Breton, A, Surdin-Kerjan, Y, (1977). Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *J Bacteriol*, 132:224-232.
- Burriel, M, Arribas, J, Lucena, F, Hernández, J, (2001). Química analítica cualitativa. Ed. Paraninfo Thomson Learning, 591-603.
- Cevantes, C, Campos-García, J, Devars, S, Gutiérrez-Corona, F, Loza-Tavera, H, Torres-Guzmán, JC, Moreno-Sánchez, R, (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*, 25:335-347.
- Carriquiriborde, P, Ronco, AE, (2008). Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu (II) and Cr (VI) in tissue of south American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquat toxicol*, 86:313-322.
- Chang, YW, Sun, YS, Wang, Ch, Hsiao, ChD, (2008). Crystal structure of the 70-kDa heat shock proteins in domain disjoining conformation. *J Biol Chem*, 283,15502-11.
- Chen, HC, Melis, A (2004). Localization and function of SulP, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 220:198-210.
- Cho, TP, Lee, CK, Low, KS, Hishamiddin, O, (2006). Accumulation of chromium (VI) from aqueous solutions using water lilies (*Nymphaea spontanea*). *Chemosphere*, 62:961-967.
- De Flora, S, (2000). Threshold mechanism and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21:533-541.
- Devars, S, Hernández, R, Moreno-Sánchez, (1998). Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol*, 34:128-135.

- Dhakephalkar, PK, Bhide, JV, Paknikar, KM, (1996). Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnol Lett*, 18:1119-1122.
- Fasulo, M, Bassi, M, Donini, A, (1982). Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. I. First observations. *Protoplasma*, 110:39-47.
- Fasulo, M, Bassi, M, Donini, A, (1983). Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and ultrastructural studies. *Protoplasma*, 114:35-43.
- Fytianos, K, Katsianis, G, Triantafyllou, P, Zachariadis, G, (2001). Accumulation of heavy metals vegetables grown in an industrial area in relation to soil. *Bull environ Contam Toxicol*, 67:423-430.
- Gaggelli, E, Berti, F, D'amelio, N, Gaggelli, N, Valensin, G, Bovalini, L, Paffetti, A, Trabalzini, L, (2006). Metabolic pathways of carcinogenic chromium. *Environ Health Perspect*, 114:542-546.
- Gekeler, W, Grill, E, Winnacker EL, Zenk, MH, (1998). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complex. *Arch Microbiol*, 150:197:202.
- Grossman, A, Takahashi, H, (2001). Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:163-210.
- Gupta, V.K, Shrivastava, A.K., Jain, N, (2001). Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Wat Res*, 35:4079-4085.
- Gutierrez-Marcos, JF, Roberts, MA, Campbell, EI, Wray, JL, (1996). Three members of a novel small gene-family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally an *Escherichia coli* mutant defective in PAPS-reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and APS reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:13377-13382.

- Hargreaves, JW, Lloyd, EJH, Witton, BA, (1975). Chemistry and vegetation in highly in acidic streams. *Freswat Biol*, 5:563-576.
- Hauschild, MZ, (1993) Putrescine (1,4-diaminobutane) as an indicator of pollution-induced stress in higher plants: barley and rape stressed with Cr (III) or Cr (VI). *Ecotoxicol Environ Saf*, 26:228-247.
- Horton, RN, Apel, WA, Thompson, V, Sheridan, PP, (2006). Low temperature reduction of hexavalent chromium by microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*. *BMC Microbiology*, 6:5.
- Kaszycki, P, Fedorovych, D, Ksheminska, H, Babyak, L, Wójcik, D, Koloczek, H, (2004). Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiol Res*, 159:11-17.
- Kempner, ES (1982), Stimulation and inhibition of the metabolism and growth of *Euglena gracilis*. Chapter 6, In: *The biology of Euglena Vol 1*, 197-251.
- Leustek, T, Saito, K, (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol*, 120:637-643.
- Lide, DR (2003). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press (84<sup>th</sup> edition):12-15, 12-55.
- Madafiglio, K, Manning, TM, Murdoch, CM, Tulip, WR, Cooper, MK, Hambley, TW, Freeman, HC, (1990). Three chromium (III) complex with mixed amino acids ligands: (L-cysteinato)-(L-histidinato) chromium (III) 1-5 hydrate and bis(DL-histidinato)chromium (III) chloride 4-2 hydrate. *Acta Crystallogr*; C46: 554-561.
- Maine, MA, Suñe NL, Lager SC, (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res*, 38:1494-1501.

- Marlzuf, GA, (1970). Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. J Bacteriol, 102:716-721.
- McMurry, J (5<sup>a</sup> edición). Química Orgánica, International Thomson Editores; 2001: 410-411.
- Meister, A,(1995). Glutathione metabolism. Methods Enzymol, 251:3-13.
- Messter de P, Hodsong DJ, Freeman HC, Moore CJ (1977). Tridentate coordination by the L-cystein dianion. Crystal and molecular structure of sodium bis(L-cysteinato) chromate (III) dehydrate. Inorg Chem, 16:1494-1498.
- Mendoza-Cózatl, D, Devars, S, Loza-Tavera, H, Moreno-Sánchez, R, (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol Plant, 115:276-283.
- Mendoza-Cózatl, D, Loza-Tavera, H, Hernández-Navarro, A, Moreno-Sánchez, R, (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protist and plants. FEMS Microbiol Rev, 29:653-671.
- Mendoza-Cózatl, D, Rangel-González E, Moreno-Sánchez R, (2006). Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sub>2+</sub> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch Environ Toxicol, 51:512-528.
- Mendoza-Cózatl, D, Rodríguez-Savala, JS, Rodríguez-Enríquez, S, Mendoza-Hernández, G, Briones-Gallardo, R, Moreno-Sánchez, R, (2006). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complex of *Euglena gracilis*. FEBS Journal, 273:5703-5713.
- Millán de Khun, R, Streb, Ch, Breiter, R, Richter, P, Neeße, T, Häder, D-P, (2006). Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. Water Res, 40: 2695-2703.

- Moreno-Sánchez, R, Hansford, RG, (1988). Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 255:H347-H357.
- Moreno-Sánchez, R, Devars, S (1999). Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En: Contaminación ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos, AGT Editor; 1-10.
- Murphy, V, Hughes, H, (2008). Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. *Chemosphere*, 70:1128-1134
- Nakayama, M, Akashi, T, Hase, T, (2000). Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *J Inorg Biochem*, 82:27-32.
- Niels, DH, Silver, S, (1989). Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J Bacteriol*, 171: 4073-4075.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Nriagu, JO, Pacyna, JM, (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and trace metals. *Nature*, 333:134-139.
- Ohtake H, Cervantes C, Silver S, (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J Bacteriol*, 169:3853-3856.
- Ongley, LK, Sherman, L, Armienta, A, Concilio, A. (2007). Arsenic in the soils of Zimapan, Mexico. *Environ Pollut*, 145: 793-799.
- Ono, B, Kijima, K, Ishii, N, Takahiro, K, Matsuda A, Paszewski, A, Shinoda, S, (1996). Regulation of sulphate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12:1153-1162.
- Owens, JE, Niemeyer, ED, (2006). Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environ Pollut*, 140:506-515.



- Park D, Yun YS, Jo JH, Park JM (2005). Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Wat Res*, 39:533-540.
- Pepi, M, Baldi, F, (1995). Chromate tolerance in strains of *Rhodospiridium toruloides* modulated by thiosulfate and sulfur amino acids. *BioMetals*, 8:99-104.
- Pillichshammer, M, Pümpel, T, Pöder, R, Eller, K, Klima, J, Schinner, F (1995). Biosorption of chromium to fungi. *BioMetals*, 8:117-121.
- Renosto, F, Patel, HC, Martin, RL, Thomassian, C, Zimmerman, G, Segel, HI, (1993). ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf. *Arch Biochem Biophys*, 307:272-285.
- Rocchetta, I, Ruiz, LB, Magaz, G, Conforti, VTD, (2003). Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 70:1045-1051.
- Rocchetta, I, Mazzuca, M, Conforti, V, Ruiz, L, Balzaretto, V, Rios de Molina, MC, (2006). Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ Pollut*, 141:353-358.
- Rodríguez-Zavala, JS, García-García, JD, Ortiz-Cruz, MA, Moreno-Sánchez, R, (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J Environ Sci Health A tox Hazard Subs Environ Eng*, 42:1365-1378.
- Salt, DE, Rauser WE, (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol*, 170:1293-1301.
- Schiff, JA, Lyman, H, Russell, GK, (1971). Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Meth Enzymol*, 23:143-162.
- Shakoori, AR, Makhdoom, M, Haq, RU, (2000). Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram positive bacterium from effluents of tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 348-351.

- Smith, WL, Gadd, GM, (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *J Appl Microbiol*, 88:983-991.
- Standeven, AM, Wetterhahn, KE, (1992). Ascorbate is the principal reductant of chromium (VI) in rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium DNA binding *in vitro*. *Carcinogenesis*, 13:1319-1324.
- Steel, D (1971). Elementos de transición: química general, Editorial Alhambra S.A., 137-165.
- Streb, C, Richter, P, Sakashita, T, Häder, DP (2002). The use of bioassays for studying toxicology in ecosystems. *Curr Top Plant Biol*, 3: 131-142.
- Takahashi, H, Yamazaki, M, Sasakura, N, Watanabe, A, Leustek, T, Engler, J, Van Montagu, M, Saito, K(1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 94:11102-11107.
- Takahashi, H, Asanuma, W, Saito, K (1999). Cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a chloroplast localizing sulphate transporter isoform. *J Exp Bot*, 50:1713-1714.
- Taras, MJ, Greenberg, AE, Hoak, RD, Rand, MC (1971). Standard methods for examination of water and wastewater. (thirteenth edition). American Public Health Association, New York, NY, 155-159.
- Valko, M, Morris, H, Cronin, MT (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12:1161-1208.
- Vajpayee, P, Tripathi, RD, Rai, UN, Ali, MB, Sing, SN,(2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41:1075-1082.

- Vazquez, FG, Sharma, VK, Alexander, VH, Frausto, CA (1995). Metals in some lagoons of Mexico. *Environ Health Perspect*, 103:33-34.
- Vidmar, JJ, Tagmount, A, Cathala, N, Touraine, B, Davidian, JC, (2000). Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 475:65-69.
- Watanabe, M, Henmi, K, Ogawa, K, Suzuki, T (2003). Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 134:227-234.
- Watanabe, M, Suzuki, T (2004). Cadmium-induced synthesis of HSP70 and role of glutathion in *Euglena gracilis*. *Redox Report*, 9: 349-353.
- Williams, LE, Pittman, JK, Hall, JL, (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochem Biophys Acta*, 1465:104-126.
- Yun, YS, Park, D, Park, JM, Volesky, B (2001). Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environ Sci Technol*, 35:4353-4358.
- Zhitkovich, A (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chem Res Toxicol*, 18:3-11.
- Zhu, Y, Yu, H, Wang J, Fang, W, Yuan, J, Yang, Z, (2007). Heavy metal accumulations of 24 asparagus bean cultivars grown in soil contaminated with Cd alone and with multiple metals (Cd, Pb and Zn). *J Agric food Chem*, 55:1045-1052.