



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MECANISMOS DE RESISTENCIA A CROMO  
EN *Euglena gracilis* HETEROTRÓFICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
ELIZABETH LIRA SILVA**



**MÉXICO, D.F**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ROSA MARIA RAMIREZ GAMA  
**VOCAL:** Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA  
**SECRETARIO:** Profesor: RICARDO JASSO CHAVEZ  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR  
**2° SUPLENTE:** Profesor: ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

**El tema se desarrollo en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

**Este proyecto se realizó con el financiamiento del Programa Apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de estudiantes de Nivel Licenciatura, CONACYT 2009 (102260)**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Ricardo Jasso Chávez**

**SUSTENTANTE:**

**Elizabeth Lira Silva**

*Acepta los riesgos, toda la vida no es sino una oportunidad. El hombre que llega más lejos es, generalmente, el que quiere y se atreve a serlo.*

*Dale Carlyle*

## *Agradecimientos*

*Al Dr. Ricardo Jasso Chávez por permitirme realizar este proyecto, por su disponibilidad, apoyo y asesoría durante la realización de este trabajo, por el impulso para superar los retos y alcanzar mis objetivos*

*Al Dr. Rafael Moreno por darme la oportunidad de adentrarme en el interesante mundo de la investigación, por sus aportaciones, sugerencias y observaciones.*

*A mis amigos y a todas aquellas personas, quienes me enseñaron a ser mejor cada día, con quienes tuve el privilegio de compartir momentos inolvidables en cada etapa de mi vida, quienes siempre me han ofrecido su invaluable amistad y sabios consejos: Miguel Cedillo, Alfredo Sánchez, Rafael Carbajal, Noé Hernández, Yanira Cruz, Aíde León, Angélica Pacheco, Itzumi Ramírez y Ayac López*

## *Dedicatorias*

*A mi madre, por estar siempre detrás de mí dándome la fuerza necesaria para seguir mi camino, por tu amor, apoyo y comprensión. Por exigir el máximo desempeño en todos los proyectos de mi vida y mi fortaleza cuando ha sido necesario.*

*A mi abuela por todo el amor, apoyo, guía y sabios consejos que siempre me ha brindado. Nunca podre pagar tanto amor recibido a lo largo de mi vida y siempre estaré profundamente agradecida.*

*A mi familia, a mis tíos Lidia, Reyna, Roberto, Alfredo y Margarito, y a Rodolfo por su cariño, confianza y apoyo incondicional, por sus consejos durante mi niñez y contribuir en mi formación como ser humano.*

*A René Gerardo por ser parte de la mejor etapa de mi vida, por su amor, confianza, paciencia, por su ayuda en los momentos difíciles y su compañía durante tantas noches de desvelo, sabes que te quiero mucho. Gracias por compartir tu vida conmigo...*

# 1 Resumen

---

## Mecanismos de resistencia a cromo en *Euglena gracilis* heterotrófica

La contaminación por metales pesados es uno de los principales problemas ambientales que altera el metabolismo de plantas y organismos. Metales como cadmio, mercurio y cromo son desechados a cuerpos de agua donde se concentran y biomagnifican afectando a todo el ecosistema. Debido a su amplia gama de aplicaciones industriales, el cromo se ha convertido en uno de los principales contaminantes de suelos y organismos acuáticos; por lo que se han desarrollado diferentes estrategias y metodologías para la desintoxicación de aguas residuales contaminadas por este metal. Muchas de las técnicas utilizadas son poco rentables, por lo que se buscan alternativas simples, eficientes y de bajo costo. Actualmente se estudian diferentes organismos (plantas, hongos, protozoos y bacterias) que puedan acumular o remover los metales para descontaminar aguas contaminadas.

El Cr (III) y Cr (VI) son las especies de cromo más estables y abundantes que se utilizan en las actividades industriales, por lo que representa un contaminante ambiental muy importante. Se asume que el Cr (VI) es más tóxico que el Cr (III) debido a su mayor solubilidad en agua y porque dependiendo del pH puede formar  $\text{CrO}_4^{2-}$  o  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  y de que es un análogo estructural del sulfato y fosfato, por lo que puede utilizar sus sistemas de transporte para entrar a las células, por lo que son altamente tóxicos y mutagénicos en muchos organismos, así mismo su reducción a Cr (III) produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y se une al DNA por lo que se ha descrito también como un mutagénico potente.

El protista de agua dulce *Euglena gracilis* es capaz de resistir la presencia de metales pesados, ya que se ha encontrado en aguas residuales de desechos de industrias cementeras, acereras y curtidoras entre otras; lo que indica que ha desarrollado mecanismos para contender contra metales pesados. En condiciones de laboratorio, tanto la cepa fotosintética como la cepa heterotrófica (una cepa sin cloroplastos) de *Euglena gracilis* ha mostrado mecanismos de resistencia como la biotransformación y la acumulación de metales pesados a través del aumento en la síntesis de moléculas con grupos tiol y su compartimentación en cloroplastos y mitocondrias respectivamente.

En este trabajo se evaluó la capacidad de *E. gracilis* heterotrófica para contender contra la exposición a Cr (VI) y Cr (III) en cultivos con glutamato, malato y etanol como fuentes de carbono (medio GME) o sin malato (medio GE). Se determinó el efecto tóxico del cromo sobre la duplicación celular y la capacidad de *Euglena* para acumularlo. Además, se evaluaron los niveles de moléculas con grupos tiol y de ascorbato así como la capacidad de *Euglena* para reducir al Cr (VI). Los resultados obtenidos proporcionan mayor evidencia de que *Euglena* puede considerársele como un potencial biorremediador de aguas contaminadas por cromo y otros metales.

## 2 Índice

---

1	Resumen.....	1
2	Índice.....	2
3	Marco teórico .....	4
3.1	Metales en la naturaleza .....	4
3.2	Metales pesados .....	5
3.3	La importancia de los metales en las tierras de cultivo .....	6
3.4	Contaminación por metales pesados .....	8
3.5	Cromo .....	13
3.6	Técnicas de remediación para la remoción de metales pesados.....	16
3.7	Biorremediación .....	17
3.8	Mecanismos de resistencia a metales pesados .....	17
3.9	<i>Euglena gracilis</i> .....	22
4	Antecedentes .....	23
5	Justificación.....	24
6	Hipótesis .....	25
7	Objetivo general .....	25
7.1	Objetivos particulares.....	25
8	Metodología .....	26
8.1	Medio de cultivo .....	26
8.2	Condiciones de cultivo .....	26
8.3	Efecto del malato sobre el crecimiento celular y la toxicidad de cromo.....	27
8.4	Determinación de cromo (VI) en el medio de cultivo .....	27
8.5	Determinación de la acumulación de cromo intracelular e intramitocondrial..	28
8.6	Aislamiento de fracciones sub-celulares .....	28
8.7	Actividad de la enzima cromato reductasa .....	30
8.8	Cuantificación de ascorbato .....	31
8.9	Determinación de la secreción de malato .....	31

8.10	Determinación de la actividad de las enzimas dependientes de malato en fracciones sub-celulares de <i>E. gracilis</i> .....	32
8.11	Cuantificación de moléculas con grupos tiol.....	33
9	Resultados.....	35
9.1	Efecto del malato sobre el crecimiento celular y la toxicidad de cromo.....	35
9.2	Efecto de la ausencia de malato en el Cr (VI) remanente en el medio de cultivo.....	36
9.3	Efecto de la ausencia de malato en la acumulación de cromo intracelular....	37
9.4	Efecto de la ausencia de malato en la compartimentación de cromo.....	40
9.5	Efecto de la ausencia de malato en la actividad de la enzima cromato reductasa.....	42
9.6	Determinación de la secreción de malato.....	46
9.7	Determinación de la actividad de las enzimas dependientes de malato.....	46
9.8	Efecto de la ausencia de malato en la síntesis de moléculas con grupos tiol	49
10	Discusión.....	52
10.1	Toxicidad a cromo en <i>E. gracilis</i> .....	52
10.2	El Cr (VI) remanente en el medio de cultivo.....	53
10.3	Acumulación intracelular.....	53
10.4	Reducción enzimática del Cr (VI).....	54
10.5	Secreción de malato y enzimas dependientes de malato.....	56
10.6	Síntesis de moléculas con grupos tiol.....	58
11	Conclusiones.....	61
12	Apéndice.....	62
12.1	Normatividad para metales pesados.....	62
12.2	Normatividad para metales pesados en aguas residuales y su uso.....	62
12.3	Normatividad para metales pesados en alimentos.....	65
13	Índice de figuras.....	67
14	Índice de tablas.....	68
15	Abreviaturas.....	69
16	Bibliografía.....	70



## 3 Marco teórico

---

### 3.1 Metales en la naturaleza

Existe una gran variedad de metales y minerales ampliamente distribuidos en aguas y suelos como constituyentes naturales o resultado de las actividades antropogénicas. En la composición química del suelo se encuentran minerales como  $\text{SiO}_2$  (óxido de silicio),  $\text{KAlSi}_2\text{O}_6$  (leucita),  $\text{Na(AlSi}_3\text{O}_8)$  (albita),  $\text{K(AlSi}_3\text{O}_8)$  (sanidina),  $\text{H}_2\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{12}$  (muscovita)  $\text{MgFeSiO}_4$  (olivina),  $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$  (microclina),  $\text{K}_2\text{Al}_2\text{SiO}_4$  (kalsilita),  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (alúmina),  $\text{CaO}$  (cal viva),  $\text{MgO}$  (magnesia) y  $\text{K}_2\text{O}$  (óxido de potasio), etc., (Manzanares, 2005). Es posible encontrar cadmio, cromo, níquel, hierro, manganeso, plomo, zinc, cobre y mercurio en mantos acuíferos no contaminados y en los estratos profundos de ríos y lagos. Además, las actividades geológicas naturales como el desgaste y erosión de las rocas constituyen una fuente importante de metales pesados en suelos. Un ejemplo de ello, es el cadmio presente en la naturaleza, sus depósitos se asocian a los de zinc, plomo y cobre formando minerales como asfalerita ( $\text{ZnS}$ ), blenda de zinc, greenockita ( $\text{CdS}$ ) y óxido de cadmio.

El cromo también es un metal ampliamente diseminado en la naturaleza en minerales como la cromita ( $\text{FeOCr}_2\text{O}_3$ ) y algunas piedras preciosas. Se ha descrito que algunos compuestos de cromo desempeñan un papel importante, p.ej. el cromo (III) es esencial en el metabolismo de la glucosa, ya que su ausencia al parecer altera la función de la insulina (Zecua, 2007). Sin embargo, las diversas actividades antropogénicas como el refinamiento de productos mineros, la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares; causan en el ambiente un incremento en la concentración basal de metales pesados, que pueden resultar altamente tóxicos para diversos organismos. Incluso metales como el hierro, cobre, selenio y zinc que son esenciales para el metabolismo (son cofactores para algunas enzimas o metaloproteínas) resultan tóxicos a concentraciones muy elevadas porque modifican la conformación activa de las moléculas biológicas, bloquean grupos funcionales, o desplazan a otros iones metálicos (Devars, 2008).

En el ambiente, los metales están presentes como iones libres o formando compuestos solubles e insolubles como óxidos, carbonatos e hidróxidos (Prieto-

Méndez *et al.*, 2009). Estos metales al incorporarse al suelo pueden: 1) permanecer retenidos en el suelo, ya sea disueltos o bien fijados a través de procesos de adsorción, complejación y precipitación, 2) ser absorbidos por plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas, 3) pasar a la atmósfera por volatilización y 4) movilizarse por las aguas superficiales o subterráneas sin afectar a los ecosistemas debido a sus bajas concentraciones naturales y algunos metales son de vital importancia para el desarrollo de la vida (Metcalf y Eddy, 1991).

### **3.2 Metales pesados**

Existen diferentes definiciones de metales pesados pero en general, se clasifican como un grupo de elementos químicos con densidad mayor a  $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Devars, 2008) y son tóxicos. En este grupo se encuentran algunos metales y metaloides como: mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl) y plomo (Pb) que no son esenciales y son tóxicos aún a bajas concentraciones (Avilés, 2001). Pero también se incluyen metales como el vanadio (V), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni), zinc (Zn), estaño (Sn) que en bajas concentraciones, son esenciales para el crecimiento celular de procariones y eucariotes.

Los metales pesados se clasifican en dos grupos:

- Oligoelementos o micronutrientes: Co, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni y Zn.

Estos son requeridos en pequeñas cantidades, o en cantidades traza por plantas y animales, además son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, pueden formar parte de sistemas enzimáticos como el cobalto, zinc, molibdeno, o como el hierro que forma parte de la hemoglobina. A concentraciones altas resultan tóxicos para los organismos y su ausencia causa enfermedades (Zecua, 2007; Devars, 2008).

- Metales pesados sin función biológica conocida: Cd, Cr, Hg, Pb y Bi.

Su presencia en ciertas cantidades en seres vivos puede ser altamente tóxica. La toxicidad de estos metales se debe a su capacidad de combinarse con gran variedad de moléculas orgánicas, pero la reactividad de cada metal es diferente y en consecuencia su acción tóxica. Los metales pesados llegan a cuerpos de agua a

través de la descarga de residuos industriales y domésticos en ríos y lagos, donde se depositan alcanzando concentraciones muy altas.

La toxicidad de los metales varía según su estado de oxidación y depende de factores como el pH, la dureza del agua, la presencia y concentración de materia orgánica, así como de las características oxido-reductoras del medio que influirán directamente en la especiación, acumulación y biodisponibilidad del metal; es decir, si se encuentra disuelto, ligado o precipitado. Los metales pesados permanecen en el ambiente durante cientos de años y causan graves problemas de contaminación en suelos, aguas superficiales y subterráneas; así como efectos tóxicos en muchos organismos.

Los animales acuáticos como moluscos y tunicados (ascidias), ostras, crustáceos y peces, captan y acumulan concentraciones significativas de metales pesados a través de las superficies respiratorias como las branquias, adsorción del agua a las superficies corporales o a través del sistema digestivo (Vázquez, 2006). Los iones metálicos tóxicos entran a la célula por medio de los sistemas de captación que utilizan los iones metálicos importantes fisiológicamente como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Se ha descrito que algunos organismos fotosintéticos son la principal vía de acceso de los metales pesados hacia los animales y el ser humano (Devars, 2008).

### **3.3 La importancia de los metales en las tierras de cultivo**

La composición del suelo es muy compleja y variada dependiendo de cada región. Las propiedades químicas del suelo dependen de la proporción de los distintos minerales y sustancias orgánicas que lo componen. Pero en general más del 90% de la fracción sólida del suelo está constituida por compuestos inorgánicos de diferentes elementos metálicos como  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{AlSi}_2\text{O}_6(\text{OH})_4$ , (Reilly, 2002). El suelo agrícola, forestal o natural presenta concentraciones endémicas de diversos elementos. En suelos agrícolas el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio debe ser abundante y equilibrado, en suelos fértiles el 45% de la fracción sólida está compuesta por minerales como Al, Fe, Ca, K, Na y Mg. Las tierras y suelos de cultivo deben tener los nutrimentos y sales minerales (procedentes de las reservas orgánicas del suelo o de su incorporación al suelo en forma de fertilizantes) necesarios para el óptimo desarrollo y crecimiento de los cultivos.

## **Metales en alimentos**

Los cultivos requieren en forma abundante nitrógeno, fósforo, potasio y minerales esenciales (calcio, magnesio, azufre, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc) para su crecimiento y desarrollo (Tabla 1). Si alguno de estos micronutrientes se encuentra en baja concentración en el suelo o en una forma insoluble, se afecta el crecimiento de los cultivos y se originan síntomas de deficiencia de elementos traza, p. ej., en las leguminosas el cobalto es esencial y requerido como nutriente para fijar nitrógeno atmosférico para la síntesis de aminoácidos y proteínas (Reilly, 2002).

La composición de minerales en el suelo se modifica a través del tiempo por factores como el clima, los procesos bioquímicos o por la contaminación debida a las actividades humanas. Por ello, se ha implementado el uso de fertilizantes y agroquímicos para reducir la falta de nutrientes y mejorar la fertilidad del suelo y con ello la sustentabilidad física, económica y ambiental, pero su uso desmedido es una fuente importante de contaminación por metales pesados (Reilly, 2002). Cuando en los suelos y tierras de cultivo se alcanzan concentraciones excesivas de metales como el cobre, níquel y cobalto, los cultivos pueden mostrar señales de contaminación por metales. Sin embargo existen reportes de que algunas plantas y algas como *Cladophora glomerata*, *Hormidium rivulare*, *Chlorella* y *Scenedesmus* pueden crecer en altas concentraciones de Pb, Cu y Ni porque han desarrollado eficientes mecanismos de resistencia (Devars, 2008), pero resultan un peligro potencial para los animales o seres vivos que las consumen debido a su transferencia y acumulación a través de la cadena alimenticia (Reilly, 2002).

**Tabla 1. Requerimientos nutricionales de algunos cultivos**

Nutriente	Maíz	Soja	Arroz	Trigo	Girasol	Alfalfa
	kg/T grano					
Nitrógeno	22	80	22.2	30	40	27
Fósforo	4	8	3.1	5	5	2.5
Potasio	19	33	26.2	19	28	21
Calcio	3	16	2.8	3	18	12
Magnesio	3	9	2.4	3	11	3
Azufre	4	7	0.94	4.5	5	3.5
Boro	0.020	0.025	0.016	0.025	0.165	0.030
Cobre	0.013	0.025	0.027	0.010	0.019	0.007
Hierro	0.125	0.300	0.350	0.137	0.261	0.040
Manganeso	0.189	0.150	0.370	0.070	0.055	0.025
Molibdeno	0.001	0.005	-	-	0.029	0.0003
Zinc	0.053	0.060	0.040	0.052	0.099	0.015

Fuente: *International Plant Nutrition Institute*

### **3.4 Contaminación por metales pesados**

Las actividades antropogénicas como la minería, la metalurgia (extracción del cadmio como subproducto del Pb, Zn, Cu y otros metales), las emisiones industriales procedentes de la producción de pigmentos, cristales, anticorrosivos, baterías de Ni/Cd, e insecticidas, así como las incineradoras municipales afectan la calidad de los mantos acuíferos, suelos y en consecuencia la salud de los habitantes de las comunidades cercanas a dichas zonas (McLaughlin y Singh, 1999, Bonomelli *et al.*,

2003; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2008). Las aguas residuales de origen residencial, contribuyen de manera significativa a la contaminación por metales pesados (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007). Debido a las concentraciones de metales pesados como As (0.06-230  $\mu\text{g}/\text{cápita}/\text{día}$ ), Zn (1.5-120  $\mu\text{g}/\text{cápita}/\text{día}$ ), Cr (0.55-8.5  $\mu\text{g}/\text{cápita}/\text{día}$ ) y Hg (0.01-0.21  $\mu\text{g}/\text{cápita}/\text{día}$ ) que son arrojados diariamente al drenaje provenientes de productos de limpieza y detergentes (Devars, 2008).

En México se han presentado múltiples casos de contaminación por metales pesados tales como el de Torreón Coahuila, donde se detectaron altos niveles de plomo en sangre, en habitantes cercanos a un complejo metalúrgico. En Zacatecas, principal productor de plata en México, existen reportes de niveles elevados de arsénico (de 15 a 812 %), mercurio (de 33 a 768%) y plomo (de 82 a 892%) en suelos agrícolas y cultivos. Lo que representa un peligro para el ganado alimentado con estos cultivos y para la salud de los consumidores, debido a que muchos metales son vertidos en ríos, en zonas de cultivo y de pastoreo (Santos *et al.*, 2006). Otro caso es el de la empresa Cromatos de México ubicada en Tultitlán, Estado de México, donde 75 mil toneladas de cromato (contaminante altamente tóxico) fueron enterradas en las instalaciones de la ex empresa, donde permanecieron confinadas de manera inadecuada por muchos años causando graves problemas de contaminación en la zona.

En el 2005, la SEMARNAT dio a conocer que Cromatos de México es el tercer punto de mayor contaminación química del país, debido a que la sustancia química es muy corrosiva y al estar mal confinada contaminó cuatro pozos de agua y causó graves problemas de salud en los habitantes. Un estudio reveló que después de 33 años de su desaparición se han encontrado altos niveles de cromo en pelo y orina de niños y adultos. En México existen cerca de 600 empresas que generan mensualmente entre dos mil y tres mil litros de agua contaminada con metales con cromo y sólo unas pocas cumplen con la norma oficial (Merino, 2008). Industrias como la automotriz, la hulera y la química generan en sus aguas residuales grandes cantidades de metales pesados (plomo mercurio, cromo, arsénico, etc.), las cuales son descargadas en cuerpos de agua donde se concentran y biomagnifican afectando el ecosistema (Cervantes *et al.*, 2001).

## **Contaminación de alimentos**

Las fuentes de contaminación por metales pesados en alimentos son muy variadas, estas tienen su origen en el manejo inadecuado de los desechos industriales, mineros y de uso doméstico, así como en la escasa normativa mexicana (ver Apéndice) y su falta de aplicación. Las concentraciones excesivas de metales en el suelo alteran el medio ambiente, los cultivos y en consecuencia la calidad de los alimentos, ya que los metales se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez son consumidos por el ser humano (Pérez *et al.*, 2008).

## **Contaminación en cultivos agrícolas**

Algunos países en vías de desarrollo como México, utilizan en la agricultura aguas residuales o biosólidos para el mejoramiento de suelos, ya que constituyen una fuente de riego y nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) para los cultivos. Sin embargo, éstos pueden contener altas concentraciones de metales pesados y causar graves daños a la salud (Melo *et al.*, 2000). En Zacatecas, las aguas residuales utilizadas con fines agrícolas han presentado concentraciones de cadmio superiores a las permitidas por la NOM (Cajuste *et al.*, 1991; Carrillo *et al.*, 1992).

Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben más oligoelementos y su concentración en los tejidos vegetales se relaciona con la abundancia en suelos, debido a que los metales tienden a bioacumularse en la superficie del suelo quedando accesibles para las raíces de las plantas (Cajuste *et al.*, 2001). En cultivos de espinaca, ajo, remolacha, berenjena y zanahoria contaminados por cadmio, se ha reportado mayor acumulación en la raíz y solo una pequeña parte en la parte aérea de la planta, concentrándose en orden decreciente en tallos, hojas, frutos y semillas. (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

Las aguas residuales producidas en el D.F. se utilizan para el riego de cultivos de alfalfa, col, chile, frijol, lechuga, avena y pepino (Melo *et al.*, 2000) en la Presa Endhó (Hidalgo), en el Valle del Mezquital y en el Estado de México, lo que ha propiciado la acumulación de metales pesados en suelos y la transferencia de cadmio, níquel y plomo del suelo al cultivo, así como del cultivo al grano (Cajuste *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2008). El incremento de cadmio en las tierras de cultivo causó un incremento en la

acumulación de cadmio en cultivos de papa y trigo, así como en algunos órganos del ganado (riñón e hígado).

Los cultivos de alfalfa también presentaron concentraciones de cromo, plomo, níquel superiores a los valores considerados como normales en tejido vegetal (Cajuste *et al.*, 2001). Además, en suelos y cultivos de chinampa de la zona de Tláhuac se reporta la presencia de Pb, Ni, Zn, Cu, Cr y Cd, cuando el riego por aspersión con agua de los canales se realiza durante largos periodos de tiempo (Ramos *et al.*, 2001).

El uso de biosólidos en la agricultura, constituye una fuente de contaminación por cadmio y cromo en especias y azúcar morena (Reilly, 2002; Ramírez, 2002). Otra fuente significativa de contaminación por metales pesados en suelos agrícolas y alimentos es el uso desmedido de fertilizantes, debido a la falta de información sobre su uso y efectos a largo plazo. En las últimas décadas, se ha reportado enriquecimiento de suelos de cultivo con concentraciones de molibdato 6 veces mayores, 25% de zinc y 66% de cadmio mayores que los valores encontrados en suelos sin fertilizantes (Reylli, 2002). Sin embargo, no existen normas o especificaciones sobre la máxima concentración de metales pesados que pueden contener algunos cultivos para consumo humano, lo que constituye un riesgo potencial de toxicidad y graves problemas de salud, como los ocurridos en Toyama Japón por la acumulación de metales pesados en cultivos de arroz irrigados con aguas residuales contaminadas por cadmio (Graniel y Carrillo, 2006).

### ***Contaminación en organismos marinos.***

La descarga de las aguas residuales provenientes de los procesos naturales y actividades humanas en los ríos Tula y Panuco, cuyos efluentes son descargados al Golfo de México (Melo *et al.*, 2000), han contribuido de manera importante a la contaminación de ríos y zonas costeras de la república mexicana (Páez-Osuna, 1999a, b; Devars, 2008). Las zonas costeras de México son las principales productoras de algunas especies de moluscos, ostiones y ostras para consumo humano; sin embargo la contaminación por metales pesados ha causado que muchas de estas especies presenten niveles metales pesados en sus tejidos superiores a los establecidos por la NOM-031-SSA-1993.



El consumo de ostiones y mejillones constituye un potencial riesgo para la salud debido a que son capaces de acumular altas concentraciones de Cu, Zn, Pb (Barqueiro *et al.*, 2007).

Existen reportes de que *Crassostrea virginica* puede acumular  $> 2\mu\text{g/g}$  de cadmio, concentraciones mayores al límite máximo permisible para consumo humano (Guzmán *et al.*, 2007); los ostrácodos (micro crustáceos) absorben altas concentraciones de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd y Pb (Palacios *et al.*, 2003); mientras que los pectinidos acumulan Cd, Cr y Pb en niveles superiores a lo reportado para otros moluscos (Sobrino *et al.*, 2007).

El incremento en la concentración de metales pesados es una potencial fuente de intoxicación para los habitantes de las zonas costeras y con efectos nocivos para las especies marinas, como ocurrió en la bahía de Minamata, Japón, donde el consumo de peces contaminados por Hg causó el envenenamiento y muerte de los pescadores del lugar; donde aún se reportan concentraciones de mercurio en los peces debido a la persistencia de este metal.

### 3.5 Cromo

El cromo es el sexto elemento más abundante de la corteza terrestre sin embargo, no se encuentra como cromo elemental sino en combinación con otros elementos formando minerales como la cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), crocoita ( $\text{PbCrO}_4$ ) y uvarovita ( $\text{Ca}_3\text{Cr}_2(\text{SiO}_4)_3$ ). El cromo puro se obtiene por reducción del óxido de cromo con aluminio, por medio de la electrólisis o a través del ioduro crómico. El cromo elemental carece de toxicidad, pero sus productos de oxidación (ácido crómico y sus sales de cromatos y dicromatos) son altamente tóxicos.

#### **Propiedades**

El cromo es un elemento químico de número atómico 24, tiene una configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^5 4s^1$ . El cromo es el cuarto elemento tóxico, tiene múltiples estados de oxidación (VI, V, IV y III) y de estos dependen sus efectos biológicos.

El Cr (III) y Cr (VI) son las especies más estables y abundantes que se utilizan y producen como resultado de las actividades industriales, por lo que representan un importante contaminante ambiental (Barnhart, 1997).

Se sabe que el Cr (VI) es más tóxico que el Cr (III) debido a su mayor solubilidad en agua, además el cromo en su estado de oxidación 6+ o Cr (VI) es un anión que dependiendo del pH puede formar  $\text{CrO}_4^{2-}$  o  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .

El Cr (VI) es un análogo estructural del sulfato y fosfato, debido a que el  $\text{CrO}_4^{2-}$  presenta una estructura tetraédrica semejante a los oxianiones de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), por lo que el  $\text{CrO}_4^{2-}$  se mimetiza con el  $\text{SO}_4^{2-}$  y utiliza sus sistemas de transporte para entrar al interior de las células (Banerjee *et al.*, 2008; García, 2009).

El Cr (III) se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, los cuales son insolubles a pH cercano a 5.5; y se encuentra unido a frecuentemente a materia orgánica en suelos y ambientes acuáticos. El Cr (VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr (III); esta transformación es más rápida en ambientes ácidos (Cervantes *et al.*, 2006).

## ***Usos y aplicaciones***

El cromo es un metal pesado muy utilizado en las industrias metalúrgicas (cromado, galvanizado), en industrias procesadoras de cemento, en el curtido de pieles, en la preparación y uso de pinturas, esmaltes, tintas y material fotográfico, en aleaciones de metales, también se utiliza en la agricultura para la fabricación de algunos insecticidas. La inadecuada disposición de los residuos con cromo puede elevar las concentraciones por encima de los valores naturales y/o permisibles (Cano *et al.*, 2002) y causar efectos nocivos en el ambiente y al ser humano.

## ***Toxicidad***

Debido a su amplia gama de aplicaciones industriales, el cromo se ha convertido en uno de los principales contaminantes de suelos y organismos acuáticos (Zayed y Terry, 2003). La concentración máxima de cromo en el ambiente está regulada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) debido a sus propiedades altamente tóxicas. Los efectos tóxicos del cromo dependen de su estado de oxidación. Los compuestos de Cr (VI) son altamente tóxicos y mutagénicos porque puede entrar a la célula a través de transportadores de sulfato, una vez dentro de la célula, son reducidos por el glutatión, el ácido ascórbico, la cisteína y la histidina (De Flora *et al.*, 1989) hasta formar compuestos estables de Cr (III); lo que provoca la generación de radicales hidroxilo, peróxido y especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan una amplia variedad de daños al DNA, principalmente aductos DNA-Cr, muerte celular apoptótica y altera la expresión de genes (Cervantes, 1991; Devars *et al.*, 2000).

El Cr (III) es relativamente inocuo ya que es insoluble y se asume que no puede atravesar membranas (De Flora *et al.*, 2000). Además, es muy importante en el funcionamiento de la insulina y requerido en el metabolismo normal de proteínas, grasas y carbohidratos, es fácil encontrarlo en forma de sales en suplementos dietéticos como micro nutrimento; sin embargo, el consumo crónico de estas sales provocan nefrotoxicidad (Mertz, 1992).

## ***Absorción y metabolismo***

La exposición a bajas concentraciones puede irritar la piel y causar ulceración. La exposición a largo plazo causa rinitis, dolor nasal, laringitis, úlcera nasal, bronquitis,

alteración de olfato, hemorragia nasal, perforación del tabique nasal, fibrosis pulmonar, cáncer del pulmón, daño en riñón e hígado y problemas en el sistema circulatorio y el tejido fino nervioso.

En seres humanos, el Cr (VI) se absorbe principalmente por vía área, a través de la piel y por ingestión vía oral; después de la inhalación el cromo se absorbe hacia el sistema circulatorio, es transferido al sistema gastrointestinal o permanece en los pulmones. La cantidad de cromo que se absorbe y la velocidad de absorción por respiración dependen de las condiciones de la mucosa bronquial y membranas alveolares, así como del estado de oxidación (Franchini *et al.*, 1978).

Tanto el Cr (III) como el Cr (VI) viajan a través del torrente sanguíneo unidos a aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas plasmáticas como las globulinas. Se ha sugerido que el Cr (III) también puede atravesar la membrana pero con una eficiencia muy baja, de hecho los complejos de Cr (III) unidos a ligandos de bajo peso molecular tienen mayor probabilidad de entrar a la célula (Ledezma, 2006).

En particular, el cromo hexavalente es transportado a los órganos con mayor irrigación como los pulmones, riñón, hígado y bazo), son los que más lo acumulan y en consecuencia son los mayormente afectados. En riñón ocasiona insuficiencia renal aguda, debido a que produce la disfuncionalidad y muerte de las células del túbulo proximal.

El cromo es eliminado lentamente por su unión con ligandos que provocan su reducción y es liberado hacia el torrente sanguíneo para su excreción por vía renal-urinaria, en donde es reabsorbido a nivel tubular y el porcentaje excretado es cerca del 1% (Cruz, 2008).

En organismos acuáticos, el cromo se acumula frecuentemente por lo que resulta un riesgo potencialmente tóxico el consumo de pescado, moluscos o almejas expuestos a altos niveles del cromo (Sobrino, 2007).

En plantas el cromo (VI) que se incorpora es convertido inmediatamente a Cr (III) en las raíces, por la Fe (III)-enzima reductasa. De hecho en retoños y raíces de varios cultivos comestibles, incluyendo cereales, leguminosas y apio solo se ha detectado la forma trivalente (Zayed y Terry, 2003). El cromo interfiere con diversos procesos metabólicos causando disminución en el crecimiento de raíces y biomasa, clorosis,

alteración de la fotosíntesis y finalmente muerte de la planta (Sharma *et al.*, 2003; Panda y Choudhury, 2005).

En algas el cromo causa diferentes efectos tóxicos, siendo la inhibición en el crecimiento el principal efecto observado en *Chlorella* sp, *Chlorella pyrenoidosa*, *Cladophora glomerata*, *Scenedesmus* sp, *Microcystis* sp, *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema capricornutum* y *Ulothrix fimbriata*; mientras que en *Euglena gracilis* Z causa un retardo en el crecimiento (Devars, 2008).

### **3.6 Técnicas de remediación para la remoción de metales pesados**

En la actualidad existen diferentes tecnologías que mediante procesos químicos, físicos o biológicos tienden a reducir la toxicidad, movilidad o concentración de materiales o contaminantes presentes en el ambiente. En general estas tecnologías buscan alterar la estructura química del contaminante, aprovechando sus propiedades físicas o químicas como la volatilización, solubilidad, carga eléctrica, etc.

Algunos de los tratamientos térmicos o fisicoquímicos utilizados para la remediación de sitios contaminados resultan muy costosos e ineficientes a bajas concentraciones del metal o causan graves daños al ambiente, debido a las grandes cantidades de ácido que se deben utilizar para realizar una lixiviación química. En cambio es más sencillo y económico realizar una lixiviación efectuada por bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans* (Devars, 2008).

Muchas de las técnicas utilizadas son poco rentables, por lo que se requiere el desarrollo de tecnologías capaces de reducir la concentración de metales en cuerpos de agua a niveles aceptables y a costos accesibles. Por lo que en la actualidad, se ha utilizado el potencial de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes ambientales.

Las estrategias de biorremediación son alternativas simples, viables, competitivas en costos y eficiencia, además de ser amigables con el ambiente (Volke y Velasco, 2002); las cuales se han aplicado en el tratamiento de aguas residuales desde hace mucho tiempo (Devars, 2008).

### **3.7 Biorremediación**

El término biorremediación se define como la biotransformación, acumulación y concentración de contaminantes mediante el uso de organismos, lo cuales son capaces de realizar reacciones de oxido-reducción, secuestrar iones metálicos mediante procesos de adsorción o absorción; así como por la síntesis de compuestos como glutatión, fitoquelatinas (FQ) y ácidos orgánicos como respuesta a niveles tóxicos de metales pesados.

Los procesos de biorremediación se han utilizado con éxito para tratar suelos, lodos y aguas contaminados con compuestos orgánicos (hidrocarburos de petróleo, benceno y tolueno, clorofenoles, etc.) e inorgánicos como Cd, Cr (VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn de manera eficiente (Vidal, 2009). Además, ofrece ventajas sobre los procedimientos no biológicos para remover metales pesados, ya que los tratamientos de aguas contaminadas se realizan mediante la introducción de organismos diseñados o seleccionados para retener contaminantes. Estas técnicas se producen a costos relativamente bajos, ofrecen alta selectividad y afinidad por metales pesados, la capacidad de tratar grandes volúmenes de agua o residuos y sobre todo la capacidad de funcionar bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y presencia de otros iones (Devars, 2008).

La biorremediación se ha extendido a la utilización de muchos microorganismos con el fin de proponer nuevos modelos. Lo que implica que el modelo biológico en estudio debe tener la capacidad de disminuir la concentración de los metales pesados del medio. Por lo tanto, la capacidad de organismos utilizados en la biorremediación está relacionada con los mecanismos de resistencia que puedan expresar o utilizar para vivir en dichas condiciones.

### **3.8 Mecanismos de resistencia a metales pesados**

Actualmente se utilizan como modelo de estudio diferentes organismos (plantas, hongos, protozoarios y bacterias) para descontaminar ambientes alterados por metales pesados.

En general, estos organismos muestran diferentes mecanismos de resistencia contra los metales tóxicos como: 1) enlazamiento externo, 2) transporte disminuido, 3)

expulsión activa, 4) acumulación y compartimentación, 5) biotransformación y 6) la quelación externa, entre otros (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

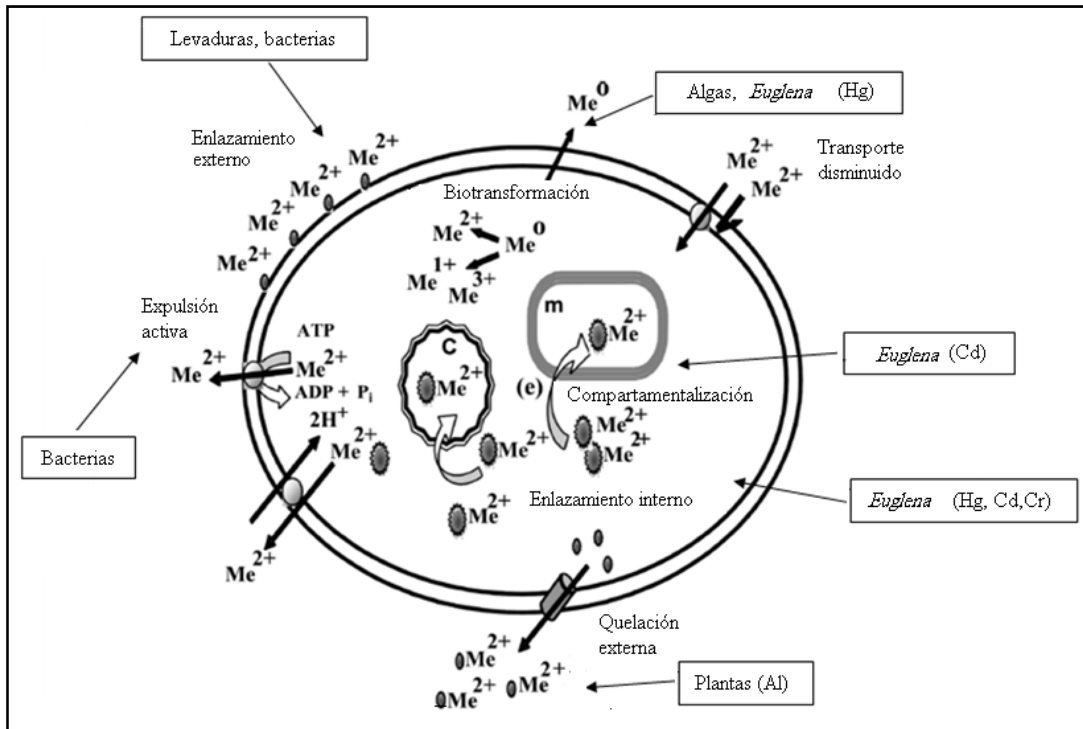


Figura 1. Mecanismos de resistencia a metales pesados que se han reportado para diferentes organismos. Modificado de Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007.

### **Enlazamiento externo**

Consiste en la unión del metal a la pared celular y a la cara externa de la membrana plasmática, con lo cual se impide el paso de éste hacia el interior celular. Se ha reportado que las microalgas producen sustancias orgánicas extracelulares como grupos amino, fosforilo, sulfidrilo y carboxilo que proveen a la superficie celular de sitios para el intercambio iónico (Mendoza, 2000).

### **Transporte disminuido**

La captación de metales esenciales o no esenciales a la célula puede estar mediada por sistemas de transporte de cierta especificidad o ser el resultado de una difusión pasiva. Por lo que la disminución en el transporte puede atribuirse a: 1) Alteración de la permeabilidad de la membrana: los cambios en la composición o arreglo molecular de la membrana previenen la difusión pasiva de iones, 2) Disminución en el número

de transportadores. Esto provoca una disminución en la captación de nutrimentos y compuestos esenciales (Devars, 2008),

Se ha descrito que en algas o bacterias se reduce el transporte del metal a través de la membrana celular (Cervantes y Moreno, 1999). Este mecanismo carece de interés biotecnológico, pues no conduce a la acumulación del metal (Cervantes *et al.*, 2006).

### ***Expulsión activa***

Consiste en la expulsión de las especies nocivas del citoplasma celular a través de sistemas que expulsan iones derivados de cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y zinc. Entre los que se encuentran: 1) Las proteínas facilitadoras de cationes (CDF), los cuales expulsan los sustratos al espacio periplásmico, asociado a un proceso quimiosmótico que involucra el intercambio con protones en el cual participan residuos de histidina, aspartato y glutamato, 2) Las ATPasas tipo P estos transportadores de metales son energizadas por la hidrólisis del ATP. Los transportadores de la familia RND, estas se asocian con una pareja de polipéptidos auxiliares: una proteína pequeña de la membrana externa y una proteína periplásmica que une (o fusiona) a las membranas interna y externa

También existen los sistemas de expulsión de aniones, se encuentran los transportadores que expulsan a los oxianiones derivados de arsénico y de cromo e incluyen tanto sistemas quimiosmóticos como relacionados con ATPasas (Cervantes *et al.*, 2006). El sistema de expulsión del oxianión tóxico cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) se identificó en plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* y de *C. metallidurans* que codifican la proteína ChrA (Cervantes *et al.*, 2001).

### ***Acumulación y Compartimentación***

Una vez que el metal pesado ha ingresado a la célula, éste permanece en el interior de la célula enlazado a compuestos celulares (metalotioninas y fitoquelatinas, citrato, malato, oxaloacetato, sulfuro, fosfato, polifosfatos) que inactivan al metal y son compartimentados en organelos (mitocondrias, cloroplastos o vacuolas) formando compuestos de alto y bajo peso molecular, lo que disminuye su toxicidad.

Existen reportes de que *Medicago sativa* (alfalfa) tiene la capacidad de acumular Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Ni (II) y Zn (II) (Peralta *et al.*, 2001). Las plantas de *Brassica juncea*



(mostaza de la India) pueden acumular Pb (II), Sr (II), Cd (II), Ni (II) y Cr (VI) Schiavon *et al*, (2008).

Se ha reportado que el cromato entra a la célula a través de los transportadores de sulfato y fosfato, mientras que el cromo trivalente no puede atravesar las membranas biológicas. Sin embargo, no se encontró diferencia entre la acumulación de Cr (III) y Cr (VI) en *Phaseolus vulgaris* y *Triticum aestivum* L. (Cervantes *et al.*, 2001). También en *Vigna radiata* (frijol) expuesto a Cr (III) y Cr (VI) se encontró que la acumulación de cromo fue mayor con Cr (III) que con Cr (VI); además se observó mayor disminución de la longitud de la raíz en los cultivos expuestos a cromo trivalente (Banerjee *et al.*, 2008).

### ***Biotransformación***

Consiste en la reducción, oxidación o alquilación del metal mediante enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, Existen reportes de que *Chlorella* es capaz de llevar a cabo la reducción química del  $Hg^{2+}$  a  $Hg^0$  mediante una actividad enzimática inducida por la luz.

La biotransformación de cromo hexavalente a la forma trivalente supuestamente menos tóxica por agentes biológicos ofrece una alternativa viable. Se ha descrito el potencial de varias cepas bacterianas para reducir cromato, con la finalidad de desarrollar procesos microbiológicos para la desintoxicación de aguas contaminadas (Ohtake *et al*, 1987; Cervantes 1991; Shakoori *et al*, 2000.) y se ha considerado económico, seguro y sostenible (Eccles, 1999).

Las células de *Enterobacter cloacae* H01 son capaces de reducir cromo hexavalente (cromato,  $CrO_4^{2-}$ ) anaeróbicamente mediante una actividad enzimática asociada a la membrana (Wang *et. al*, 1990).

### ***Quelación interna o externa***

Este mecanismo de quelación se lleva a cabo tanto en el interior como en el exterior de la célula para detoxificar los metales pesados, mediante un incremento en la síntesis de moléculas para inactivar al metal a través de la formación de complejos de alto y bajo peso molecular.

Con esto, el metal queda inmerso en una interacción química que lo mantiene en equilibrio electrónico (acomplejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo porque aun esta en el citoplasma de la célula y sigue siendo potencialmente tóxico.

Los metales pesados muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales como principales ligandos, como grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo, ácidos orgánicos como citrato, oxaloacetato y malato.

El incremento en la síntesis de moléculas con grupos tiol como cisteína (Cys), sulfuro ( $S^{-2}$ ), glutatión (GSH) y fitoquelatinas (FQ) en algas, protozoarios y hongos o metalotioninas en bacterias, hongos, invertebrados y mamíferos como una respuesta al estrés causado por metales. Estas moléculas son utilizadas para inactivar peróxidos, radicales libres y metales pesados (Avilés, 2001).

El GSH es una molécula clave en el balance del estado oxidativo de la célula, debido a que juega un papel doble en la protección contra metales; por una parte, secuestra al metal y es también precursor de FQ y por otro lado, protege contra el daño inducido por estrés oxidativo (Navarro, 2007; Devars, 2008). Está constituido por tres aminoácidos: glutámico (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly), unidos por enlaces peptídicos ( $\gamma$ -GluCysGly).

La forma reducida del GSH representa el mayor compuesto intracelular con grupos sulfidrilos transferibles (Avilés, 2001), se encuentra en mayor concentración que la forma oxidada (disulfuro de glutatión- GSSG).

Los ácidos orgánicos se han asociado con la hiperacumulación y tolerancia de una gran variedad de plantas y se han propuesto como importantes quelantes para Zn, Cd y Ni (Haydon y Cobbett, 2007). Existen reportes de que en presencia de aluminio *Lespedeza bicolor* secreta malato y citrato como mecanismo de resistencia (Ying *et al.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* muestra incremento en la concentración interna de citrato e incrementa la secreción de citrato (Feng *et al.*, 2001).

### 3.9 *Euglena gracilis*

*Euglena gracilis* es un organismo ampliamente distribuido en cuerpos de agua contaminados por metales debido a la descarga de efluentes industriales (cementeras, acereras y curtidoras entre otras) y drenajes ácidos de la actividad minera (Hargreaves *et al.*, 1975). En condiciones de laboratorio, *Euglena gracilis* tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo utilizando diversas fuentes de carbono como ácidos orgánicos (glutamato+malato o lactato), extractos de levadura o peptona y etanol.

*E. gracilis* es un organismo fotoheterotrófico, es decir, presenta actividad fotosintética y también tiene la capacidad de crecer en la oscuridad a través de la actividad mitocondrial (heterotrófico). *Euglena gracilis* tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de metales pesados y ha mostrado como mecanismos de resistencia la biotransformación de Hg y la acumulación de cadmio a través del aumento en la síntesis de moléculas con grupos tiol y su compartimentación en cloroplastos y mitocondrias (Devars *et al.*, 1998, 2000; Avilés *et al.*, 2003; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007); por lo que se le considera como un potencial biorremediador de cuerpos de agua contaminados.

Se ha propuesto que *Euglena gracilis* es capaz de reducir el  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  como mecanismo para detoxificar el mercurio, además de un incremento en el contenido de glutatión en la célula (Devars *et al.*, 2000). En células de *E. gracilis* expuestas por varias generaciones a una dosis ligera de mercurio se incrementó su resistencia a un estímulo posterior con cadmio (Avilés *et al.*, 2003). En estos estudios se encontró que existe la biotransformación del  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$ , la compartimentación del cadmio en mitocondrias y un aumento en los niveles de malato, cisteína, glutatión intracelular e intramitocondrial. La resistencia a un metal no suele conferir resistencia a otro metal diferente. Sin embargo, existen casos de co-tolerancia en diversos tipos de algas. En *Euglena gracilis* la pre-exposición a Hg confiere mayor resistencia a cadmio (Avilés *et al.*, 2003).

## 4 Antecedentes

---

Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo muestran que en cultivos en presencia de  $K_2CrO_4$ , *E. gracilis* fotosintética exhibe una reducción extracelular del cromato independiente del medio de cultivo (García-García *et al.*, 2009). En la cepa heterotrófica cultivada en medio GME (glutamato, malato, etanol) a pH 7.0 donde se produce una densidad celular de hasta  $35 \pm 8 \times 10^6$  células/mL debida a la adición de etanol (Jasso-Chávez *et al.*, 2010), se encontró que el etanol y el glutamato son los principales sustratos utilizados (90 y 60% consumido, respectivamente), mientras que el malato solo se consume un 40%. Sin embargo, en células cultivadas en presencia de cromato, el consumo del malato es <20%, incluso los resultados mostraron una concentración de malato mayor a la inicial (Fig. 2).

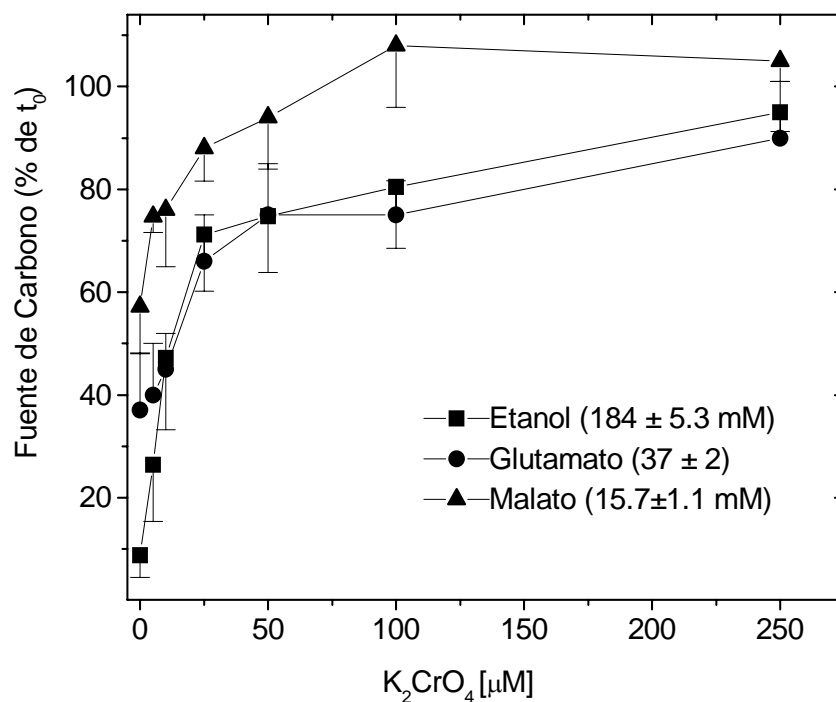


Figura 2. Efecto del cromo sobre el consumo de la fuente de carbono en *E. gracilis* heterotrófica. Modificado de Jasso-Chávez *et al.*, 2010.

## 5 Justificación

---

En la actualidad, el constante incremento en la concentración de cromo en suelos y sistemas acuáticos ha causado graves problemas de toxicidad no sólo en mamíferos (Sudhakar *et al.*, 1991), sino también en los sistemas acuáticos.

Debido a que los métodos convencionales para el tratamiento de residuos tóxicos de cromo requieren grandes cantidades de productos químicos y energía, resultan inadecuados para los residuos generados a pequeña escala, mientras que la biotransformación de cromo (VI) a cromo (III), supuestamente menos tóxico, mediante agentes biológicos ofrece una alternativa viable para desintoxicar ambientes contaminados. Se ha descrito el potencial de varias cepas bacterianas para reducir cromo con la finalidad de desarrollar procesos de desintoxicación microbiológica de aguas contaminados (Ohtake *et al.*, 1987; Shakoori *et al.* 2000), ya que son considerados económicos, seguros y viables.

Por lo anterior, surge la necesidad de encontrar microorganismos con la capacidad de sobrevivir en ambientes contaminados por cromo, para su potencial uso en biorremediación.

Las algas y protistas como *Euglena gracilis* pertenecen a un selecto grupo de organismos con una capacidad demostrada para resistir y acumular metales pesados (Rodríguez-Zavala *et al.* 2007). De hecho, *E. gracilis* es capaz de acumular cadmio, zinc, plomo, mercurio y cromo, entre otros. Así, *Euglena gracilis* es un modelo de estudio que ha sido propuesto como un potencial biorremediador de aguas contaminadas, además de que su capacidad de adaptación a diferentes medios de cultivo facilitan su utilización en el laboratorio.

Se debe considerar que en la literatura y la mayoría de los trabajos publicados, únicamente se determina la toxicidad del cromo en algunos organismos y son pocos los trabajos sobre el estudio de los mecanismos de resistencia en *E. gracilis* heterotrófica en presencia de cromo, esto es importante porque los mecanismos son específicos para cada metal y dependen del organismo.

## 6 Hipótesis

---

La exposición a Cr (VI) en cultivos de *Euglena gracilis* originará un incremento en la síntesis de grupos tiol, la inducción de la secreción de malato y la expresión de una enzima capaz de reducir el cromato a Cr(III) que resultará menos tóxico a la célula.

## 7 Objetivo general

---

Determinar los mecanismos de resistencia de *Euglena gracilis* para contender contra la toxicidad del cromo.

### 7.1 Objetivos particulares

Determinar la toxicidad del Cr (VI) y Cr (III) en cultivos de *Euglena gracilis* en presencia y ausencia de malato.

Medir la sensibilidad a cromo (IC<sub>50</sub>).

Cuantificar la reducción de Cr (VI) en el medio de cultivo.

Determinar los mecanismos de resistencia:

- **Compartimentación:** Cuantificar la acumulación de cromo intracelular e intramitocondrial en células cultivadas en presencia de Cr (VI) y Cr (III).
- **Biotransformación:** Determinar la existencia de una enzima con capacidad de reducir al Cr (VI) a Cr (III).
- **Enlazamiento extracelular:** Cuantificar la secreción de malato.
- **Enlazamiento intracelular:** Determinar el contenido de moléculas con grupos tiol (Cys, GSH,  $\gamma$ -EC y tripanotión) en presencia de Cr (VI) y Cr (III).

## 8 Metodología

---

### 8.1 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo se modificó del protocolo original (Greenblatt y Schiff, 1959; Jasso-Chávez *et al.*, 2010). A continuación se indica la composición, en g / L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.1;  $\text{MgSO}_4$ , 0.17;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.04;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.04;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0008;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.004 y  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.003. La fuente de carbono estuvo compuesta por 34 mM de glutamato, 15 mM de malato y 177 mM de etanol. El medio se esterilizó por autoclave 45 minutos a 20 libras de presión y antes de sembrar las células se adicionó una solución de vitaminas al medio, en mg / L, tiamina, 0.1;  $\text{FeCl}_3$ , 0.5; y cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ ),  $2 \times 10^{-5}$ ; y también se adicionó  $\text{CaCl}_2$  (0.043 g / L). Las vitaminas y el calcio fueron previamente esterilizadas por filtración (diámetro de poro de filtro 0.22  $\mu\text{m}$ ).

### 8.2 Condiciones de cultivo

Se utilizaron cultivos axénicos de *Euglena gracilis* heterotrófica mantenidos en la oscuridad durante varios años, a partir de los cuales se realizaron curvas con cromo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio GME (glutamato, malato y etanol) y 100 mL GE (glutamato y etanol) a pH 7.0, incubados en la oscuridad con agitación orbital a 125 rpm y 25 °C; en estos cultivos se determinó densidad celular, viabilidad, cromo intracelular, el contenido de ascorbato y moléculas con grupos tiol.

También se realizaron cultivos de 1 L tanto en medio GME y GE en presencia y ausencia de Cr (VI) y Cr (III) para el aislamiento de fracciones sub-celulares en las que se realizaron ensayos enzimáticos (ver esquema 1). Las células en medio GME fueron transferidas y cultivadas por al menos 18 generaciones en medio GE antes de realizar los experimentos, considerando un tiempo de duplicación para *E. gracilis* de 16 h, calculado a partir un cultivo GME control (Jasso-Chávez *et al.*, 2010).

### **8.3 Efecto del malato sobre el crecimiento celular y la toxicidad de cromo**

Se realizaron cultivos de *Euglena gracilis* heterotrófica en medio GME y GE, con la adición de diferentes concentraciones de Cr (VI) (de 5 a 250  $\mu\text{M}$ ) a partir de una solución 100 mM  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  y con Cr (III) a partir de una solución de 100 mM  $\text{CrCl}_3$ . Las concentraciones de Cr (III) utilizadas en el medio GE fueron de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , mientras que en medio GME se utilizó una sola concentración de 250  $\mu\text{M}$  de Cr (III).

Los cultivos se iniciaron con una concentración de  $0.6 \times 10^6$  células/mL y se mantuvieron por 7 días hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se contaron al 7º día de cultivo utilizando una cámara de Neubauer (previamente 100  $\mu\text{L}$  de las células se inmovilizaron con HCl al 0.2%).

Se determinó la viabilidad celular utilizando azul tripano al 0.5% (p/v) después de incubar 100  $\mu\text{L}$  de células por 5 min a temperatura ambiente.

Las células se cosecharon por centrifugación ( $\sim 50 \times 10^6$  células) en medio GME y GE expuestas a Cr (VI) y Cr (III), se lavaron tres veces por centrifugación con una solución que contiene 120 mM KCl, 20 mM MOPS y 0.5 mM EGTA a pH 7.2 (Buffer KME) y después del tercer lavado el pellet se resuspendió en 1 mL del mismo buffer. Estas células se almacenaron a  $-72^\circ\text{C}$  con 1mM de DTT para la determinación de la acumulación de cromo y el contenido de metabolitos (ascorbato y grupos tiol).

### **8.4 Determinación de cromo (VI) en el medio de cultivo**

Para la cuantificación de Cr (VI) se utilizó una reacción colorimétrica con difenilcarbazida (DFC). Este reactivo se preparó disolviendo 100 mg de difenilcarbazida 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 las soluciones A y B (García-García *et al*, 2009).

Al 7 día de cultivo, se tomaron alícuotas de 0.5 mL del sobrenadante de cada uno de los cultivos en los medios GME y GE expuestos a  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  y se mezclaron con 0.5 mL de difenilcarbazida, se homogenizó la mezcla y se midió la absorbancia de la mezcla a 540 nm. Para la calibración, se utilizó un estándar comercial de 0.1% Cr (VI) (Sigma, México). Se determinó que la reacción es lineal hasta los 50 nmol Cr (VI).



### **8.5 Determinación de la acumulación de cromo intracelular e intramitocondrial**

Para la determinación de cromo intracelular se utilizaron  $\sim 50 \times 10^6$  células cosechadas por centrifugación y almacenadas a  $-72^\circ \text{C}$  con 0.5 mM de DTT (estos cultivos fueron utilizados también para determinar el efecto del cromo sobre la densidad celular).

Después de cada uno de los lavados con KME, se tomó un 1 mL del sobrenadante para cuantificar el cromo desprendido durante cada uno de los lavados y con ello verificar que el cromo cuantificado era solo cromo intracelular y no el adsorbido a la membrana celular. Las muestras fueron almacenadas a  $-72^\circ \text{C}$ .

También se tomó una alícuota de la fracción mitocondrial aislada (30-40 mg de proteína), a partir de un cultivo de células cultivadas en ausencia (control) y en presencia  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  o  $\text{CrCl}_3$  (ver aislamiento de fracciones sub-celulares) para cuantificar el cromo compartimentado en la mitocondria.

Las células o las mitocondrias aisladas, se rompieron mediante una digestión ácida con  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$  (1:3) y calentamiento durante 2 horas a  $100^\circ \text{C}$ . Las muestras se llevaron a 5 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q. El cromo 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 (García-García *et al*, 2009). 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.

Se debe mencionar que esta técnica no discrimina entre  $\text{Cr}^{6+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$ , por lo que la lectura obtenida se reporta como cromo total de la muestra ( $\text{Cr}_{\text{Total}}$ ).

### **8.6 Aislamiento de fracciones sub-celulares**

Se realizaron cultivos de 1 L con un inóculo de  $0.6 \times 10^6$  células/mL en medio GME (control y expuestos a  $25 \mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) y en medio GE (células control y células+ pulso con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{CrCl}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente). Los cultivos de células+pulso se cultivaron por 5 días hasta llegar a la fase estacionaria temprana y al día 5 se adicionó un pulso de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{CrCl}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se mantuvo así por 48h.

Los cultivos de células control, expuestas a Cr (VI) o Cr (III) se cosecharon a los 7 días y se lavaron dos veces por centrifugación con un buffer que contiene 250 mM sacarosa, 10 mM Hepes y 1 mM EGTA a pH 7.2 (buffer SHE). El botón celular (aprox.  $1 \times 10^9$  células) se resuspendió en 50 mL de buffer SHE + 0.1% BSA deslipidada, se transfirió 25 ml de esta suspensión celular a un vaso de precipitados, las células se rompieron por sonicación utilizando tres pulsos de 12 segundos con intervalos de 1 min con un sonicador (Branson Sonifier 450) al 75% de intensidad máxima, con una punta de 1 cm de diámetro. El homogeneizado fue centrifugado a 280 g durante 10 min para separar los organelos liberados (sobrenadante 1) de las células rotas por la sonicación (pellet). El pellet se desechó, mientras que el sobrenadante 1 fue centrifugado a 8000 g para separar la fracción mitocondrial (pellet 2) y la fracción citosólica y microsomal (sobrenadante 2).

El sobrenadante (2) fue centrifugado a 105 000 g durante 45 minutos a 4 ° C, mientras que el pellet (la fracción mitocondrial) se lavó con 25 mL de buffer SHE, se centrifugó otra vez y se resuspendió en un volumen mínimo de buffer SHE en presencia de BSA al 0.2%, y se guardó a -72°C para cuantificar proteína y cromo intramitocondrial.

El sobrenadante 3 (fracción citosólica) y el pellet (fracción membranal) obtenidos de esta centrifugación, se resuspendieron y se lavaron con 30 mL de una solución con 50 mM Hepes y 10 mM de  $MgCl_2$  por centrifugación a 105, 000g durante 30 minutos a 4 °C (Jasso-Chávez *et al.*, 2010).

Las mitocondrias fueron utilizadas para experimentos de acumulación de cromo intramitocondrial y junto con la fracción citosólica y membranal se utilizaron en fresco para realizar los ensayos enzimáticos.

El contenido de proteína en la mitocondria, el citosol y la fracción membranal se determinaron utilizando el método de Biuret utilizando BSA como estándar (Jasso-Chávez *et al.*, 2001).

## ***Ensayos enzimáticos***

### **8.7 Actividad de la enzima cromato reductasa**

Se aisló la fracción citosólica y membranal de células control y células cultivadas con 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en medio GME (ver aislamiento de fracciones sub-celulares), así como de células+pulso 100  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{CrCl}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio GE.

Para determinar si *E. gracilis* contaba con una enzima capaz de reducir el cromato, se realizó un experimento en el que se utilizó inicialmente NADH, o cisteína o ascorbato como donadores de electrones, pero se encontró que los primeros dos produjeron una alta reducción espuria, sin embargo; se encontró que la reducción espuria producida por el ascorbato solo ocurría a bajas concentraciones de Cr (VI), por lo que se realizó un experimento paralelo sin proteína (como control) y los valores se restaron de los obtenidos con la proteína.

Se realizó un ensayo enzimático para cuantificar la reducción de cromato, utilizando la fracción citosólica y membranal de células control y cultivadas en 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (2-5 mg proteína), se resuspendió en 450  $\mu\text{L}$  de buffer KME + 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , se adicionó 5 $\mu\text{M}$  de PMS, 200  $\mu\text{M}$  de ascorbato como donador de electrones y se incubó a 25°C en agitación constante (125 rpm). La reacción se inició mediante la adición de 200 $\mu\text{M}$  de ascorbato y 100  $\mu\text{M}$  Cr (VI), la reducción se midió a varios tiempos y se detuvo con la adición de 0.5 mL DFC disuelto en ácido sulfúrico.

Para determinar la naturaleza proteica de la reducción de Cr (VI), la fracción citosólica de células expuestas a 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  se incubó en: ácido, a 80 ° C, con 1.8 M de urea o con 1 mg/mL de proteasa durante 10 minutos y se determinó la actividad para reducir cromato.

El Cr (VI) remanente se cuantificó por espectrofotometría a 540 nm.

La actividad de esta enzima y la determinación de los parámetros cinéticos se llevaron a cabo mediante la incubación de 50  $\mu\text{L}$  de las fracciones citosólicas y membranales (2-5 mg de proteína) en 0.45mL de buffer KME +10 mM  $\text{MgCl}_2$ , utilizando ascorbato como donador de electrones y a diferentes concentraciones de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (5,10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) durante 10 min a 25°C y en agitación constante (125 rpm).

## **8.8 Cuantificación de ascorbato**

Para la determinación de ascorbato intracelular se utilizaron  $\sim 50 \times 10^6$  células que fueron cosechadas por centrifugación y almacenadas a  $-72^\circ \text{C}$  con 0.5 mM de DTT (estos cultivos se utilizaron también para determinar el efecto del malato sobre la densidad celular y la toxicidad a cromo). Las células se rompieron con 3% (v/v) de ácido perclórico (PCA) frío, se agitaron en un vortex durante 1 minuto, se centrifugaron a  $4^\circ \text{C}$  a 20000 g en una microcentrífuga. El sobrenadante se ajustó a un pH de 5.5-6 con 3 M KOH/0.1 M Tris y fue centrifugado nuevamente. Los sobrenadantes (extractos celulares) se incubaron con un exceso de  $\text{NaBH}_4$  durante 10 minutos para asegurar la reducción total de ascorbato y se utilizó inmediatamente para determinar el contenido de ascorbato total, mediante el uso de ascorbato oxidasa comercial, como se muestra a continuación:



El oxígeno consumido por la ascorbato oxidasa se estimó polarográficamente utilizando un electrodo de tipo Clark y una solubilidad del oxígeno de 420 nano átomos gramo de oxígeno  $\text{mL}^{-1}$  (210 mM  $\text{O}_2$ ) a 2240 m de altitud y  $25^\circ \text{C}$  (Jasso-Chávez y Moreno Sánchez, 2003).

## **8.9 Determinación de la secreción de malato**

Para cuantificar la secreción de malato se tomaron alícuotas de las curvas en medio GE durante diferentes días del crecimiento, se centrifugaron para descartar las células y el sobrenadante fue congelado a  $-72^\circ \text{C}$  hasta su uso.

Para la secreción de malato en tiempos cortos, se incubaron células control de 7 días de cultivo lavadas con KME en presencia y ausencia de 100  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) y Cr (III), se incubaron en un buffer que contiene 50 mM Hepes, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  a pH 7.0 y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Se centrifugaron para descartar las células y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación malato.

La concentración de malato intracelular se determinó usando  $\sim 50 \times 10^6$  células, las muestras fueron tratadas con PCA como se describió antes (cuantificación de ascorbato). El contenido de malato se determinó por espectrofotometría a 340 nm, añadiendo 20-50  $\mu$ L de cada uno de los sobrenadantes en 2 mL de buffer 400 mM de hidrazina y 400 mM de glicina a pH 9.0, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$  y 10 U de malato deshidrogenasa comercial.

La malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L-malato a oxaloacetato en presencia de  $\text{NAD}^+$  de acuerdo a la siguiente reacción:



### **8.10 Determinación de la actividad de las enzimas dependientes de malato en fracciones sub-celulares de *E. gracilis***

Las actividades de las siguientes enzimas:  $\text{NAD}^+$ -lactato deshidrogenasa soluble (LDH),  $\text{NAD}^+$ -malato deshidrogenasa (MDH) y la  $\text{NADP}^+$ -enzima málica (EM), se determinaron siguiendo el consumo o la generación de  $\text{NAD(P)H}$  a 340 nm utilizando 0.1-0.25 mg de proteína citosólica o membranal.

Para la LDH fueron utilizados como sustratos 0.5 mM  $\text{NADH}$  y 10 mM de piruvato en 1 mL de KME a pH de 7.2.



La malato deshidrogenasa se determinó mediante el uso de 0.5 mM  $\text{NAD}^+$  y 10 mM malato en 1 mL de 400 mM de hidrazina y 400 mM buffer glicina a pH 9.0.



Para la enzima málica se utilizó 0.5 mM  $\text{NADP}^+$  y 10 mM de malato como sustratos en 1 mL de buffer KME



La actividad de la malato sintasa (MS) se determinó en 1 mL de buffer con fosfato 0.1 M a pH 8,0, siguiendo el incremento en la absorbancia a 412 nm de la reacción del DTNB con la coenzima A liberada mediante la reacción, se utilizaron como sustratos 0.2 mM de acetil-CoA y 1mM glioxilato.



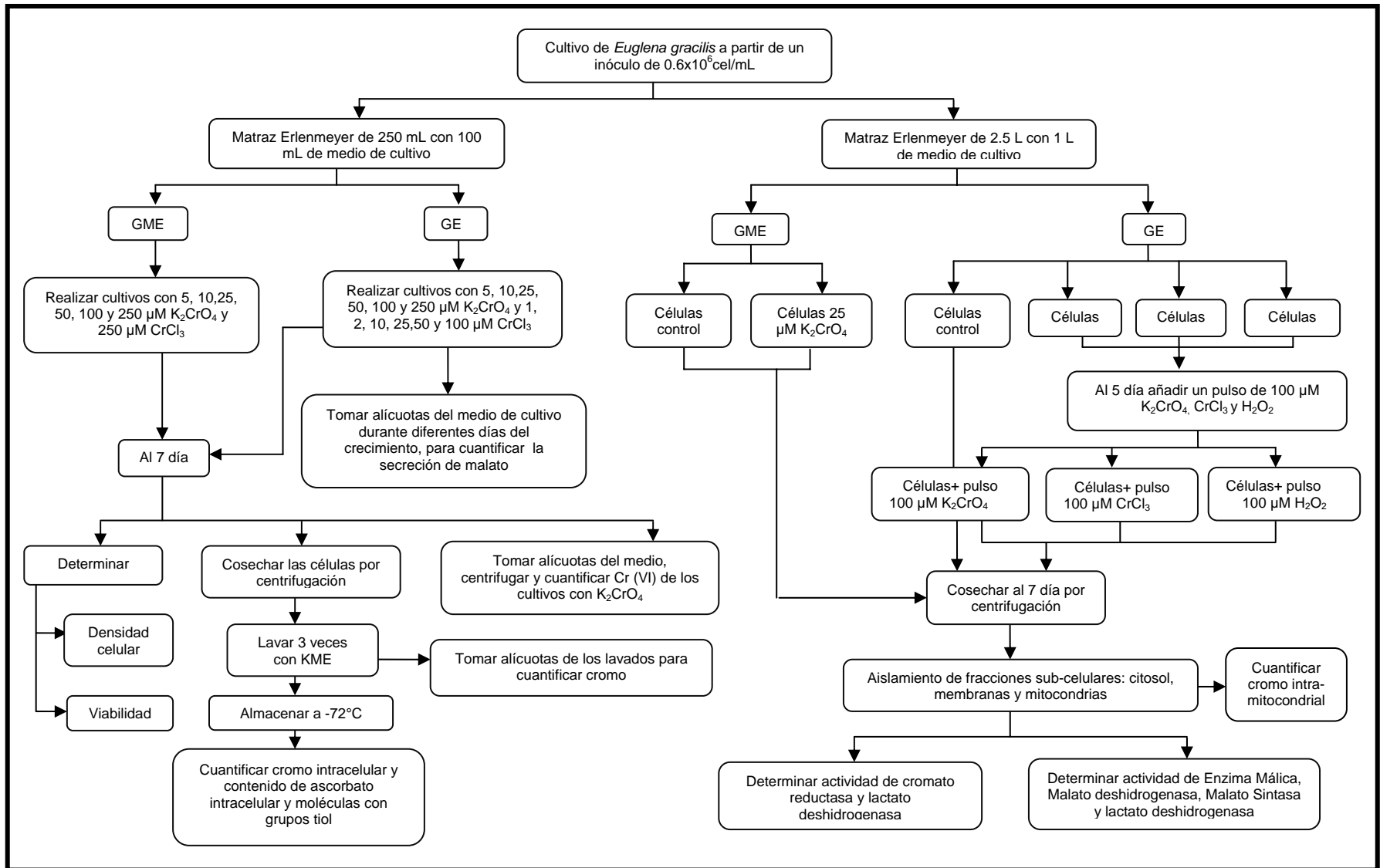
### **8.11 Cuantificación de moléculas con grupos tiol**

Para la determinación de moléculas con grupos tiol se utilizaron  $\sim 50 \times 10^6$  células que fueron cosechadas por centrifugación y almacenadas a  $-72^\circ \text{C}$  con 0.5 mM de DTT (estos cultivos fueron utilizados también para determinar el efecto del malato sobre la densidad celular).

Una vez descongeladas las muestras, se tomó una alícuota de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células, se añadió el 0.1% (w / v) de Tritón X-100 y se incubaron con un exceso de  $\text{NaBH}_4$  durante 10 minutos. Después, se adicionó PCA al 3% (p/v). Los lisados se centrifugaron a 20 000 g a  $4^\circ \text{C}$  durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró (filtro de 45  $\mu\text{m}$ ) y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante al equipo de HPLC equipado con una columna C18 de fase reversa (4.6 x 150 mm, Alltech Deerfiel, III, EE.UU). La columna se equilibró con un buffer compuesto por ácido trifluoroacético al 99% (v/v) y acetonitrilo al 1% (v/v). Los compuestos tiol fueron derivatizados post-columna con DTNB y detectados a 412 nm. El coeficiente de extinción molar DTNB a pH de 8.0 utilizado fue de  $13.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Se utilizaron estándares internos de la Cys, el GSH, la  $\gamma\text{-EC}$  y  $\text{T(SH)}_2$  para hacer la identificación de cada uno de los picos obtenidos de la muestras.

Esquema 1. Metodología



## 9 Resultados

### 9.1 Efecto del malato sobre el crecimiento celular y la toxicidad de cromo

El efecto del malato sobre la duplicación celular de *Euglena gracilis* se determinó al día 7 del cultivo en ambos medios. Se encontró que la densidad celular del cultivo control en medio GME fue de  $29 \pm 6.6 \times 10^6$  células/mL pero la ausencia de malato redujo cuatro veces la densidad celular hasta  $7.2 \pm 3.7 \times 10^6$  células/mL ( $n=13$ ). La duplicación celular disminuyó notablemente conforme aumentó la concentración de cromato, incluso las células ya no se duplicaron con  $250 \mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , contrario al efecto prácticamente inocuo que se observó con  $250 \mu\text{M}$  de Cr (III) en presencia de malato (Fig. 3).

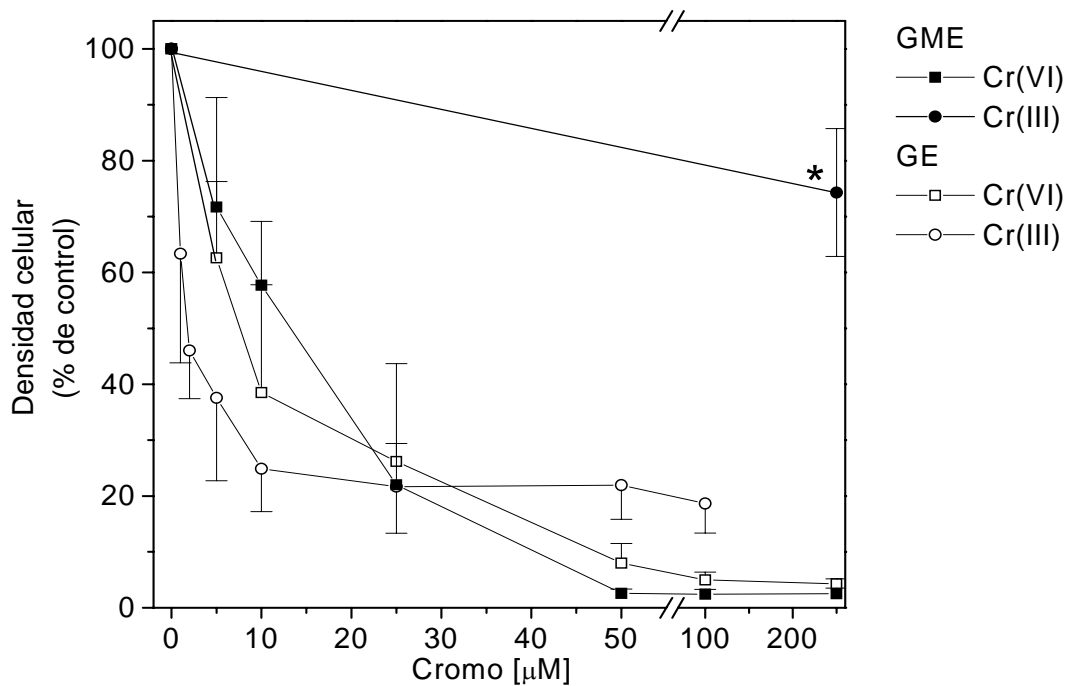


Figura 3. Efecto del malato sobre el crecimiento y la toxicidad a cromo en cultivos de *Euglena gracilis* heterotrófica. El valor de 100% corresponde a la máxima densidad celular alcanzada al 7 día en los cultivos control GME ( $29 \pm 6.6 \times 10^6$  células/mL) y GE ( $7.2 \pm 3.7 \times 10^6$  células/mL). Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ). \*  $P < 0.05$  vs células +  $100 \mu\text{M}$  Cr (III) en medio GE.



Los datos de duplicación celular al 7 día se usaron para calcular la concentración de cromo a la cual la densidad celular se inhibe un 50% ( $IC_{50}$ ). Se determinó que para el Cr (VI) en presencia de malato (medio GME) la  $IC_{50}$  fue de  $17 \pm 0.9 \mu M$ , mientras en ausencia de malato (medio GE) fue de  $13 \pm 2.4 \mu M$ . De forma interesante, se encontró que en medio GME la  $IC_{50}$  fue  $> 250 \mu M$  para el Cr (III), similar a lo reportado por Jasso-Chávez *et al*, (2010); mientras que el valor de  $IC_{50}$  para éste en ausencia de malato disminuyó 30-40 veces, pues la  $IC_{50}$  fue de  $1.8 \pm 0.3 \mu M$  (Fig. 3).

En células GME cultivadas con  $250 \mu M$  de  $CrCl_3$  se encontró un efecto inhibitorio mínimo en cuanto a la duplicación celular y no hubo cambios respecto al consumo de la fuente de carbono (Fig. 3), lo que coincide con lo reportado por Jasso-Chávez *et al*. (2010). Lo anterior correlaciona con la aseveración de que el Cr (III) es menos tóxico al menos en presencia de malato. En cambio en ausencia de malato las células cultivadas con Cr (VI) fueron más sensibles y el Cr (III) resultó ser altamente tóxico para *Euglena gracilis*.

La viabilidad celular de *Euglena gracilis* al día 7 de cultivo en medio GME control y hasta  $50 \mu M$  de Cr (VI) fue  $< 95\%$ , para  $100$  y  $250 \mu M$  de Cr (VI) la viabilidad fue del 94 y 80% respectivamente; mientras en cultivos con  $250 \mu M$  de Cr (III) la viabilidad fue mayor al 90%.

En medio GE  $100$  y  $250 \mu M$  de Cr (VI) la viabilidad celular fue de 87 y 80% respectivamente. Sin embargo, en cultivos GE en presencia de  $50$  y  $100 \mu M$  Cr (III), la viabilidad fue de 94 y 86%, lo que sugirió que en ausencia de malato el cromo inhibió la velocidad de duplicación celular y la muerte celular en los cultivos con cromo (III) fue menor que en aquellos expuestos a cromato.

## **9.2 Efecto de la ausencia de malato en el Cr (VI) remanente en el medio de cultivo**

En los cultivos en presencia de malato (GME) con  $5$  y  $10 \mu M$   $K_2CrO_4$  no se encontró Cr (VI) remanente en el medio de cultivo, mientras que con  $25$  y  $50 \mu M$   $K_2CrO_4$  solo se encontró un 20 y 60% del Cr (VI), respectivamente. A concentraciones altas de cromato, el Cr (VI) remanente fue mayor al 80% similar a lo reportado por Jasso-Chávez *et al*.(2010).

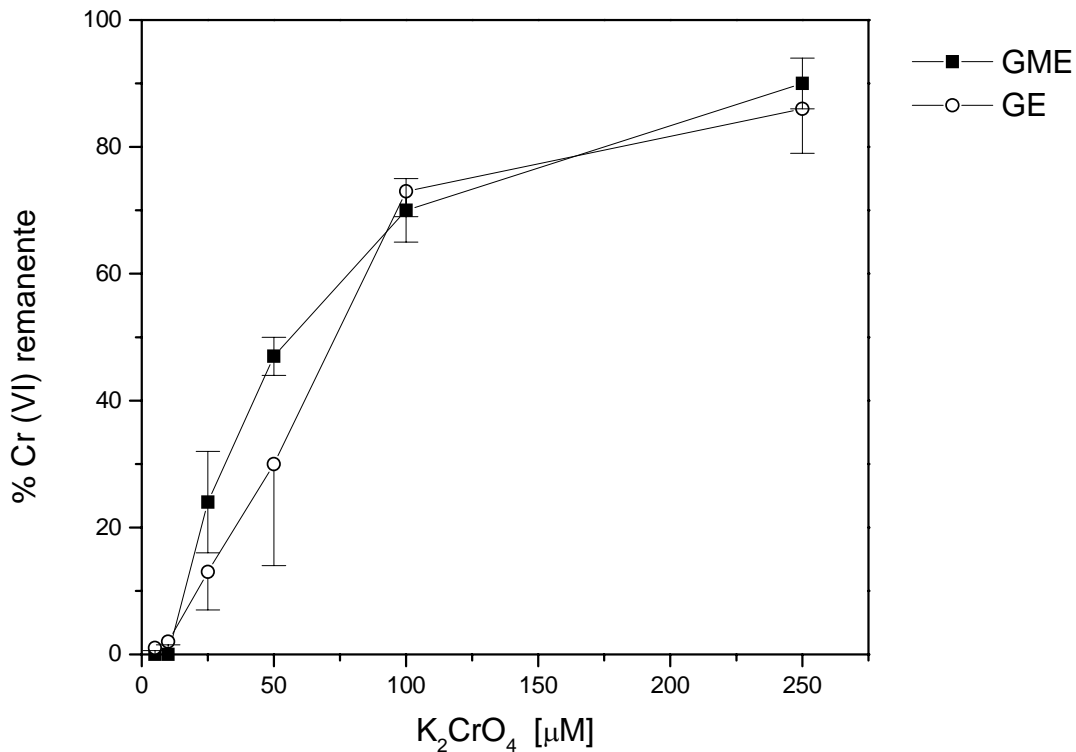


Figura 4. Efecto de la ausencia de malato en el Cr (VI) remanente al 7 día de cultivo. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos.

No obstante, se encontró que el Cr (VI) remanente fue menor en los cultivos GE con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de cromato, comparado con los GME (Figura 4). Se observó que hay un efecto notable en la disminución del % de Cr (VI) remanente en el medio de cultivo a bajas concentraciones de cromato, lo que sugirió una alta acumulación de Cr (VI) dentro de la célula.

Para verificar la estabilidad del cromato en el medio de cultivo GME y GE a pH 7.0, se adicionó 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  a un matraz libre de células, donde la concentración de cromato se mantuvo constante hasta el día 7.

### **9.3 Efecto de la ausencia de malato en la acumulación de cromo intracelular**

En la Fig. 5 se muestra el cromo desprendido de la membrana celular durante cada uno de los lavados con buffer KME (después de cosechar los cultivos al 7 día), esto

se realizó como control para asegurar que el cromo cuantificado era solo intracelular y no el adsorbido a la membrana celular.

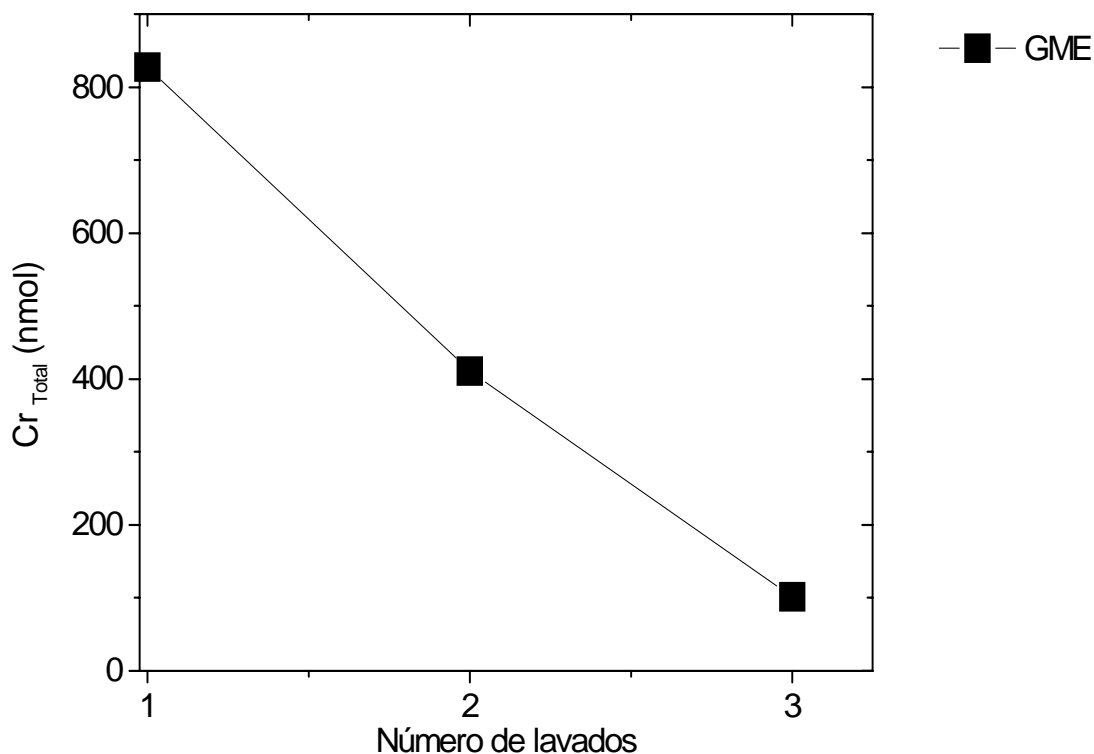


Figura 5. Cromo adsorbido a la membrana celular. Los datos mostrados son la media de al menos dos experimentos independientes.

Se observó que el cromo cuantificado en cada uno de los lavados con EGTA disminuyó conforme se incrementó el número de lavados (Fig. 5), lo que indica que con estos tres lavados se desprendió por completo el cromo adsorbido a la membrana celular de *Euglena gracilis*.

Se evaluó el efecto de la ausencia de malato sobre la acumulación intracelular de cromo. En la figura 6 se muestra que en ausencia de malato la acumulación intracelular de cromo en células expuestas a altas concentraciones de  $K_2CrO_4$  se incrementó, lo que se correlaciona con la disminución del % de Cr (VI) remanente del medio de cultivo.

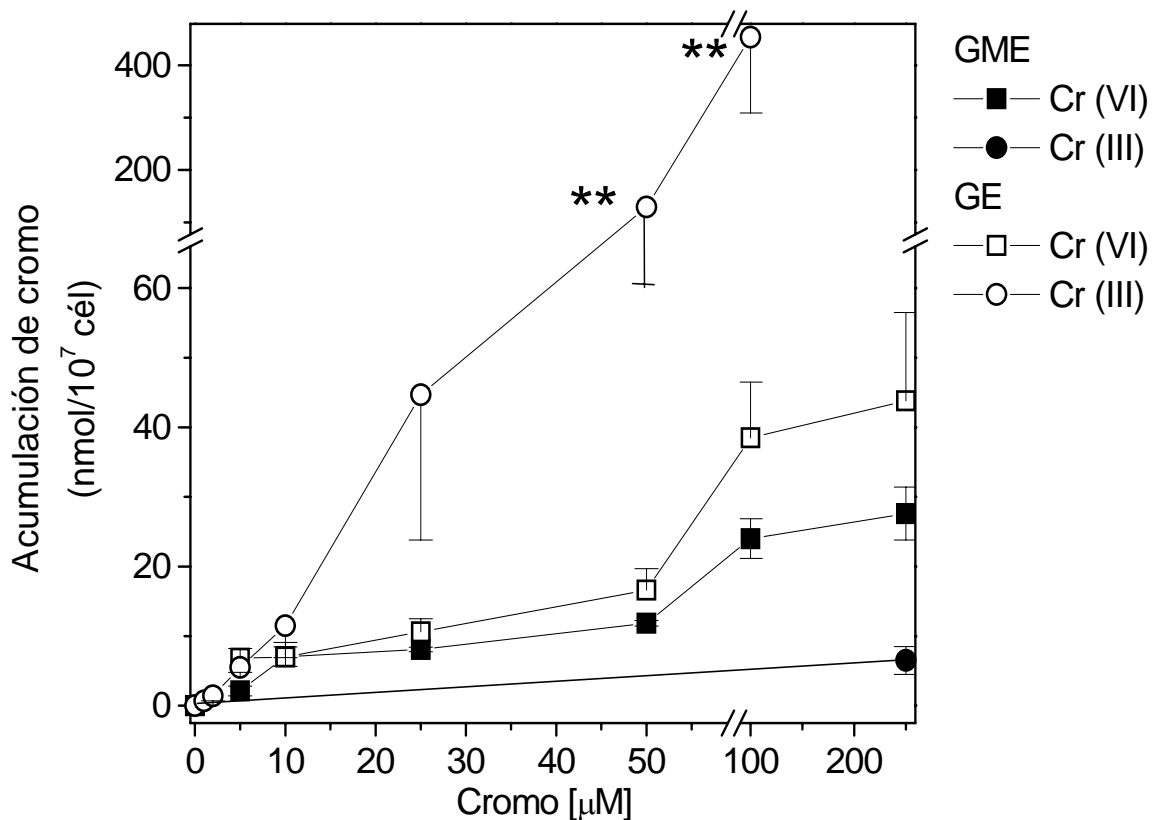


Figura 6. Acumulación de cromo total en *Euglena gracilis*. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes.  $**P < 0.05$  para la acumulación células GE con Cr (III) vs. la acumulación en células GE con Cr (VI) y en células GME con Cr (III).

En la figura 6 se muestra que la acumulación intracelular de cromo fue 63% mayor en las células cultivadas con Cr (III) en medio GE comparado con los cultivos en medio GME. En los cultivos en medio GME con 250  $\mu\text{M}$  de Cr (III) la acumulación fue de sólo 6.5 nmol cromo/10<sup>7</sup> células, lo que explicó la baja inhibición (15%) de inhibición sobre la densidad celular en presencia de  $\text{CrCl}_3$ . Sorprendentemente, la acumulación de cromo en células en cultivadas en medio GE fue de  $454 \pm 145$  nmol Cr/10<sup>7</sup> células, esto fue 70 veces más que en medio GME.

#### **9.4 Efecto de la ausencia de malato en la compartimentación de cromo**

Con base en los valores de cromo intracelular determinados experimentalmente y debido a los antecedentes de que el Cr (VI) en forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$  puede usar los transportadores de  $\text{SO}_4^{2-}$  y entrar en las mitocondrias, fue importante determinar si la acumulación de cromo intramitocondrial es un mecanismo de resistencia frente a una exposición a cromo en *Euglena gracilis* heterotrófica. En la tabla 2, se muestra que la acumulación de cromo en mitocondrias de células cultivadas en medio GE + 25  $\mu\text{M}$  de cromato fue de 3 nmol/mg de proteína, similar a lo reportado (Jasso-Chávez *et al.*, 2010). En cambio, en células más el pulso 100  $\mu\text{M}$  de cromato, el cromo intramitocondrial compartimentado aumentó hasta  $14.4 \pm 3.2$  nmol/mg de proteína.

**Tabla 2. Compartimentación de cromo en mitocondrias aisladas de células cultivadas en GME y GE con Cr (VI) o Cr (III)**

Contenido de cromo (nmol/mg proteína)		
	Medio GME	Medio GE
Mitos Control	-	-
Mitos-25 $\mu\text{M}$ Cr(VI)	$2.3 \pm 0.7$	3.0 (n=1)
Mitos-250 $\mu\text{M}$ Cr(III)	$1.5 \pm 0.2$	-
Mitos Control + pulso 100 $\mu\text{M}$ Cr(VI)	-	$14.4 \pm 3.2$
Mitos Control + pulso 100 $\mu\text{M}$ Cr(III)	-	$41 \pm 16$
Volumen intramitocondrial*	0.7-0.9 $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína	

<sup>\*</sup>(Avilés *et al.*, 2003)

Además, en mitocondrias de células GE expuestas a 100  $\mu\text{M}$  por 48 horas (células+ pulso 100  $\mu\text{M}$  de cromo (III)) se encontró un aumento en el cromo intramitocondrial de  $41 \pm 16$  nmol/mg proteína, esto se relacionó con una mayor acumulación intracelular de cromo en esta condición.

De forma inesperada se encontró 1.5 nmol Cr (VI) /mg proteína en mitocondrias aisladas de células control expuestas a un pulso de 100 $\mu\text{M}$  Cr (VI).

Los datos mostrados en la figura 6 y en la tabla 2, muestran que *E. gracilis* heterotrófica tiene la capacidad de acumular cromo y compartimentarlo. Considerando un volumen intramitocondrial de 0.9  $\mu\text{L}$ / mg proteína, la concentración de cromo total dentro de este organelo podría alcanzar concentraciones de hasta 4 mM.

Aunque se obtuvo una alta capacidad de acumulación de cromo por célula en medio GE (Fig.6), el porcentaje de cromo (VI) removido no aumentó debido a la baja densidad celular obtenida en estas condiciones (Tabla 3).

**Tabla 3. Eficiencia de la acumulación de cromo en *Euglena gracilis* heterotrófica**

Cromo ( $\mu\text{M}$ )	Cromo Acumulado (%)			
	Medio GME		Medio GE	
	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)
1	ND	ND	ND	68 (2)
2	ND	ND	ND	24 $\pm$ 6
5	100 $\pm$ 34	ND	88 $\pm$ 6	31 $\pm$ 7
10	100 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	ND	57 $\pm$ 11	22 $\pm$ 8
25	25 $\pm$ 5	ND	15 $\pm$ 5	30 $\pm$ 13
50	2.5 $\pm$ 0.8	ND	3.5 $\pm$ 0.4	43 $\pm$ 19 <sup>b</sup>
100	2.1 $\pm$ 0.2	ND	2.6 $\pm$ 0.3	64 $\pm$ 20 <sup>b</sup>
250	0.97 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.1	N.D.

La eficiencia en la acumulación de cromo fue calculado considerando el cromo total intracelular/100 mL de cultivo. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos, excepto cuando se indica entre paréntesis. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs GE; <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs Cr (VI). ND: No determinado.

Respecto a los cultivos con Cr (III) en medio GE, pese a que se determinó que la duplicación celular fue muy sensible a éste (Fig. 3), siempre se obtuvo más de  $1.4 \times 10^6$  células/mL en todas las concentraciones evaluadas; lo que se evidenció en el aumento del 50% de cromo total removido en los cultivos con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CrCl}_3$  (Tabla 3).

A pesar de la alta capacidad de acumulación de cromo intracelular (Tabla 3 y Fig. 6), los datos de acumulación no se correlacionan con el Cr (VI) remanente en el medio.

Es decir, en los cultivos GME con 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , el cromo remanente en el medio de cultivo fue del 20% pero solo 25% se acumuló intracelularmente. Debido a que el Cr (VI) no se reduce espontáneamente en el medio de cultivo a pH 7.0, como también se reportó previamente (Jasso-Chávez *et al.*, 2010), se sugirió que un alto porcentaje de Cr (VI) se redujo extracelularmente dependiente de las células.

### **9.5 Efecto de la ausencia de malato en la actividad de la enzima cromato reductasa**

Los resultados anteriores, donde se mostró que el % de cromo (VI) desaparecido fue mayor al acumulado intracelularmente y que en la ausencia de células en el cultivo el Cr (VI) fue estable, lo que sugirió una reducción del Cr (VI) extracelular debido a las células, por lo que fue importante determinar la existencia de una enzima extracelular capaz de reducir al cromato.

Se determinó que en la fracción citosólica de células control, el Cr (VI) se redujo un 30% pero en células cultivadas con 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  esta reducción se incrementó un 25% con respecto al citosol de células control (Fig.7).

La técnica utilizada para aislar ambas fracciones (citosólica y membranal) puede favorecer la contaminación de la fracción membranal por citosol, por lo que se determinó la actividad de lactato deshidrogenasa (enzima citosólica) en ambas fracciones como marcador y se encontró un 20% de contaminación por citosol en la fracción membranal.

La reducción de cromato determinada en la fracción membranal de células control y de células cultivadas con 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  fue similar, pero la capacidad de reducir al cromato encontrada en la fracción membranal (Fig. 7) se atribuyó a la contaminación cruzada por la fracción citosólica. De manera simultánea, la fracción citosólica fue incubada en ácido, o a 80 ° C, o con 1.8 M de urea o con 1 mg/mL de proteasa; lo que causó una reducción en la actividad de un 75, 80, 100 y 100% respectivamente (n = 2). Lo que permitió confirmar que la reducción de cromato es ocasionada por una enzima.

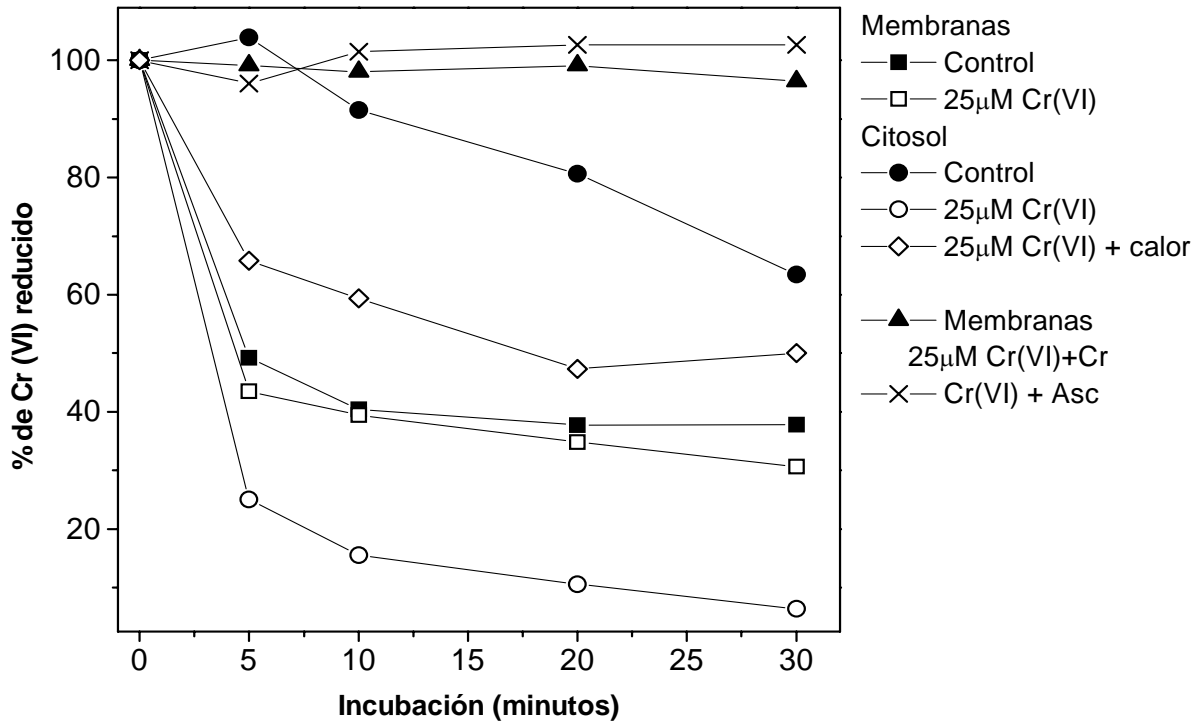


Figura 7. Actividad de cromato reductasa determinada como % de cromo (VI) reducido en la fracción membranal y citosólica de células control y células cultivadas con 25  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$

Por otra parte, en células cultivadas durante 5 días y expuestas a 100  $\mu\text{M}$  de cromato durante 48 horas (células GE+pulso Cr (VI)) se detectó un aumento 4 veces mayor en la actividad de ambas fracciones (Fig. 8). Los resultados indican que en presencia de altas concentraciones extracelulares de cromato fueron inducidas tanto una enzima citosólica como una enzima unida a la membrana. Bajo estas condiciones experimentales se determinaron los parámetros cinéticos a diferentes concentraciones de cromato hasta 250  $\mu\text{M}$  y con la fracción citosólica de las células control. Se obtuvo un valor de  $K_m=70 \pm 2 \mu\text{M}$  de cromato y  $V_m = 7 \pm 0.1 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min.} \times \text{mg prot})^{-1}$ .

En las células de GE+ pulso 100  $\mu\text{M}$  Cr (VI), variando las concentraciones de cromato hasta 1000  $\mu\text{M}$ , en la fracción citosólica se determinó una  $K_m= 200 \pm 90 \mu\text{M}$  de cromato y  $V_m = 162 \pm 35 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min.} \times \text{mg prot})^{-1}$ . Para la fracción



membranal los parámetros cinéticos fueron menos reproducibles, se determinó  $K_m = 230 \pm 306 \mu\text{M}$  de cromato y  $V_m = 79 \pm 48 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min.} \times \text{mg prot})^{-1}$ . De forma interesante, en células cultivadas durante 5 días y expuestas a  $100 \mu\text{M}$  de Cr (III) durante 48 horas (células GE+pulso Cr (III)), se encontró un aumento de la actividad de la cromato reductasa en ambas fracciones. La fracción citosólica mostró (con un máximo de  $1 \text{ mM}$  cromato como sustrato) una  $K_m = 92 \mu\text{M}$  de cromato y  $V_m = 162 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min.} \times \text{mg prot})^{-1}$ . Mientras la fracción membranal mostró una actividad de  $110 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min.} \times \text{mg prot})^{-1}$  con  $1 \text{ mM}$  de cromato, sin embargo no se alcanzó la saturación.

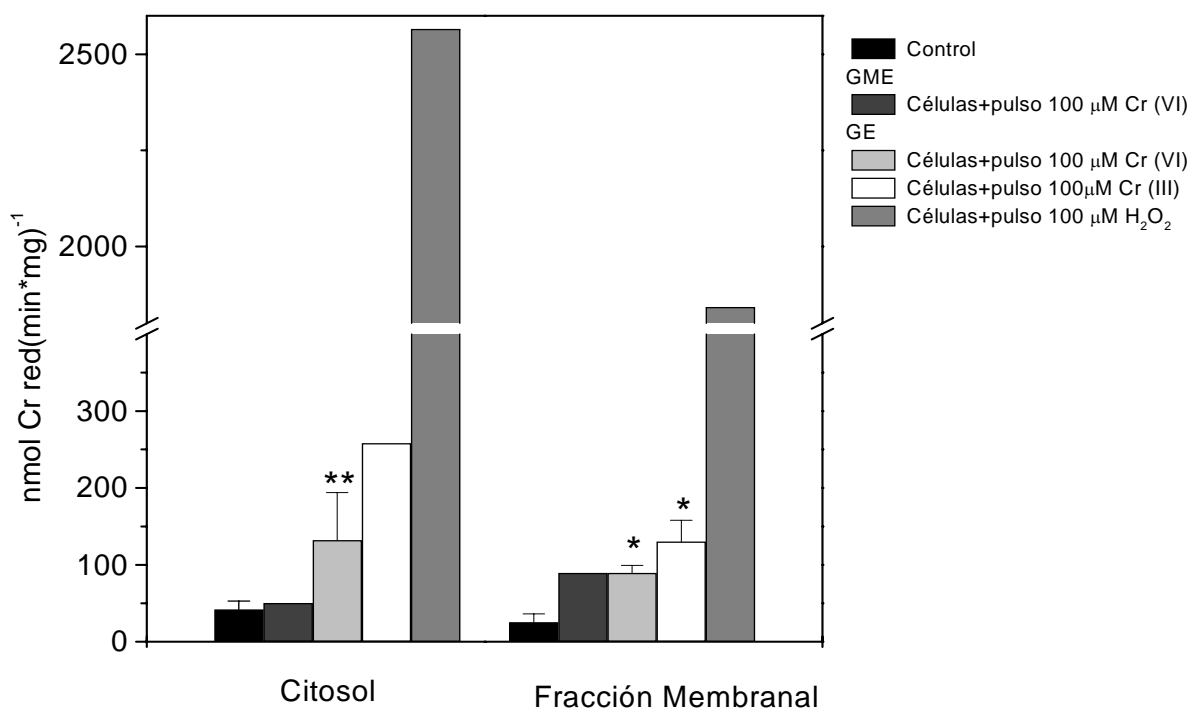


Figura 8. Actividad de la Cromato reductasa de *Euglena gracilis* heterotrófica. La actividad fue determinada en la fracción citosólica y membranal usando  $1 \text{ mM}$  de Cr (VI) como sustrato. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ )  $**P<0.05$  para la actividad citosólica en células GE+pulso Cr (VI) vs la actividad citosólica en células control GE. Prueba T-student para muestras no apareadas:  $* P<0.05$  para la actividad en la fracción membranal de células GE+pulso Cr (VI) o GE+pulso Cr (III) vs. la fracción membranal en células GE control.

En un intento por determinar el papel fisiológico de la enzima responsable de la reducción del Cr (VI), se determinó la actividad de cromato reductasa en células

control cultivadas en medio GE durante 5 días y expuestas a un pulso de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La actividad de cromato reductasa en la fracción citosólica se incrementó 100 veces, se obtuvo una  $K_m = 363 \mu\text{M}$  y  $V_{max} = 2575 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min} \times \text{mg prot})^{-1}$  con un máximo de 1 mM cromato como sustrato. En cuanto a la fracción membranal se alcanzó  $1841 \text{ nmol Cr (VI)}_{\text{reducido}} (\text{min} \times \text{mg prot})^{-1}$ .

Las diferencias en los valores de  $K_m$  sugirieron que no fue sólo una enzima la involucrada en la reducción de cromato, sino tal vez un conjunto de enzimas con la capacidad de tomar al ascorbato como sustrato. Lo anterior descartó la presencia de una enzima cromato reductasa específica y sugirió que la enzima encontrada puede ser una ascorbato peroxidasa.

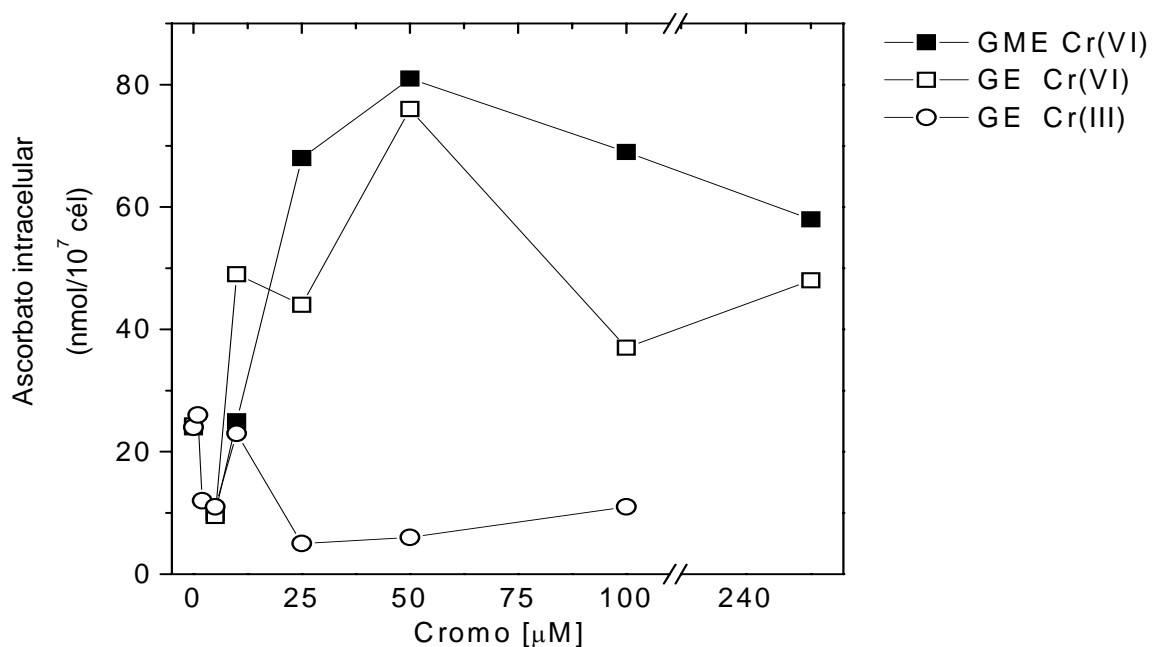


Figura 9. Efecto del cromo en el contenido de ascorbato intracelular en *Euglena gracilis heterotrófica*. Los datos mostrados son la media de 2 experimentos

El contenido de ascorbato intracelular en células control cultivadas en medio GME y GE fue de  $24.3 \pm 9 \text{ nmol}/10^7$  en ambas condiciones, mientras que en células en presencia de  $50 \mu\text{M}$  de Cr (VI), el ascorbato intracelular fue 3 veces mayor en ambas condiciones. Sin embargo, el ascorbato intracelular disminuyó en cultivos con Cr (III), incluso con  $50 \mu\text{M}$  de Cr (III) el ascorbato se reduce un 75% (Fig.9).

## **9.6 Determinación de la secreción de malato**

Los datos sobre el consumo de malato en presencia de altas concentraciones de cromo, donde se encontró una concentración mayor a la inicial (Jasso-Chávez *et al.*, 2010) sugirieron que *Euglena gracilis* podría sintetizar y secretar malato como mecanismo de tolerancia contra el cromo. Además, la mayor acumulación de cromo en células cultivadas en medio GE sugirió que el malato puede ser un agente quelante de Cr (III) fuera de la célula.

Se encontró que *Euglena gracilis* al día 7 de cultivo secretó una gran cantidad de malato, cuando las células se cultivaron en presencia de Cr (III) y también con Cr (VI), pero solo a concentraciones mayores a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (Fig.10A). Sin embargo, al calcular el malato por 100 mL de cultivo se observó que los cultivos con Cr (III) secretaron hasta  $252\pm 91$   $\mu\text{mol}$ , mientras que con Cr (VI) la secreción fue tan solo de  $66\pm 23$   $\mu\text{mol}$  (Fig.10A, recuadro). No obstante, se determinó que la secreción en ambas condiciones se produjo principalmente durante los tres primeros días de cultivo (Fig.10B). Además, se determinó que la secreción de malato se realizó a tiempos muy cortos como una respuesta rápida contra el cromo, se encontró que fue similar entre cultivos expuestos a Cr (III) y Cr (VI), pero 3 veces mayor en células control incubadas sin cromo (Fig. 10B, recuadro).

## **9.7 Determinación de la actividad de las enzimas dependientes de malato**

Se determinaron las actividades de tres enzimas dependientes de malato: la malato deshidrogenasa dependiente  $\text{NAD}^+$ , localizada tanto en el citosol como en la mitocondria; la enzima málica dependiente de  $\text{NADP}^+$  se encuentra principalmente en el citosol y la malato sintasa en partículas microsomales y mitocondria (Begin-Heick, 1972). También se determinó la actividad de lactato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ . En la figura 11, se muestra que la actividad de lactato deshidrogenasa en células control no disminuyó respecto a la determinada en células cultivadas en presencia de cromo, lo que coincide con lo reportado por Jasso-Chávez *et al.*, 2010.

Las actividades de las enzimas dependientes de malato se incrementaron de manera significativa en células expuestas a Cr (VI) y Cr (III) con respecto a las células control (Fig. 11).

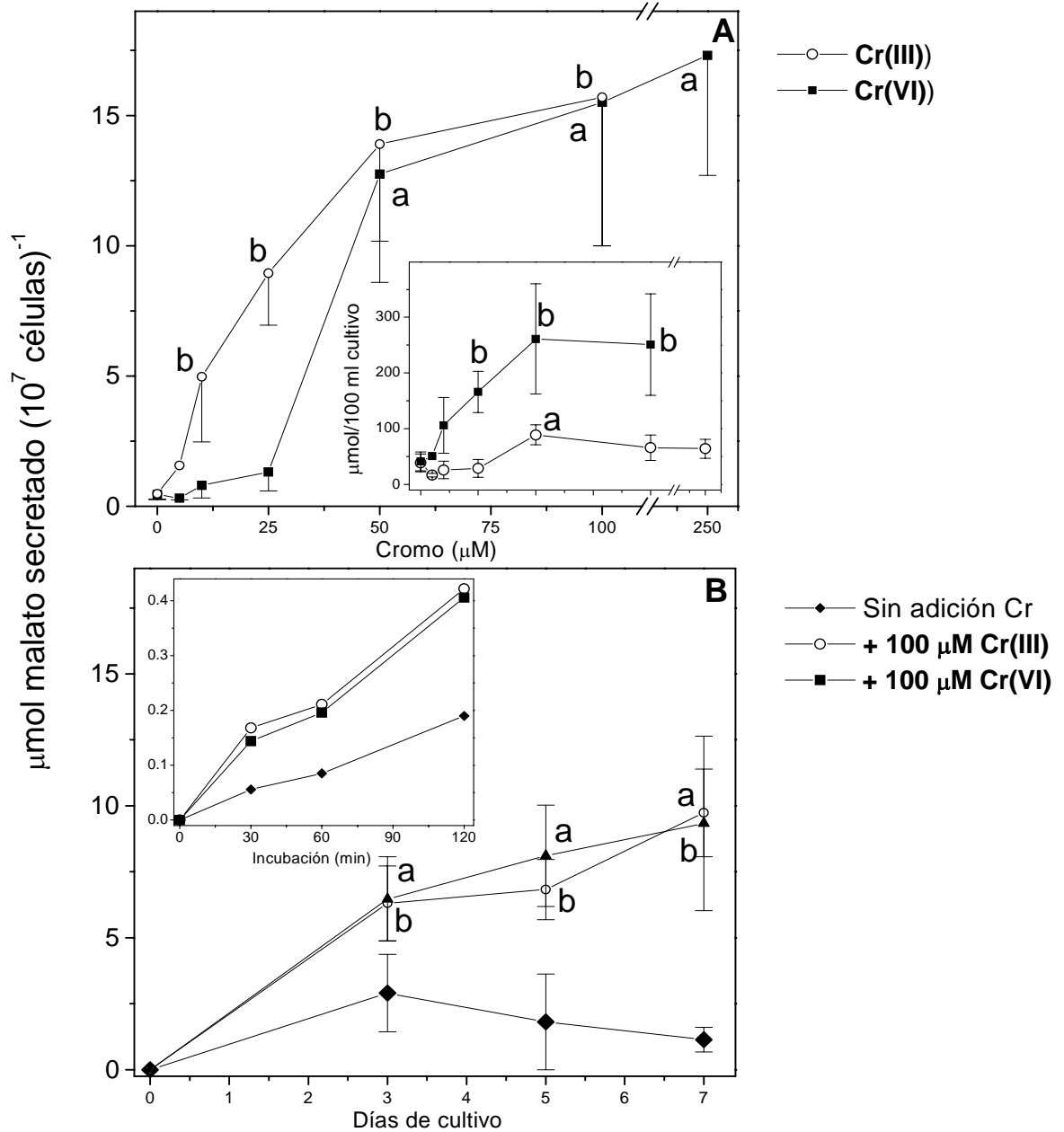


Figura 10. Secreción de malato por *E. gracilis* heterotrófica expuesta a cromo. A) Secreción de malato en cultivos expuestos a las concentraciones de cromo indicadas. Inserto, Secreción de malato por 100 mL de cultivo o (B) en los diferentes días del cultivo; Inserto, se determinó la secreción de malato a diferentes tiempos en las células control incubadas en ausencia o en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) o Cr (III). Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ) Prueba T-Student para muestras no apareadas: a, b:  $P < 0.05$  vs cultivos sin cromo.

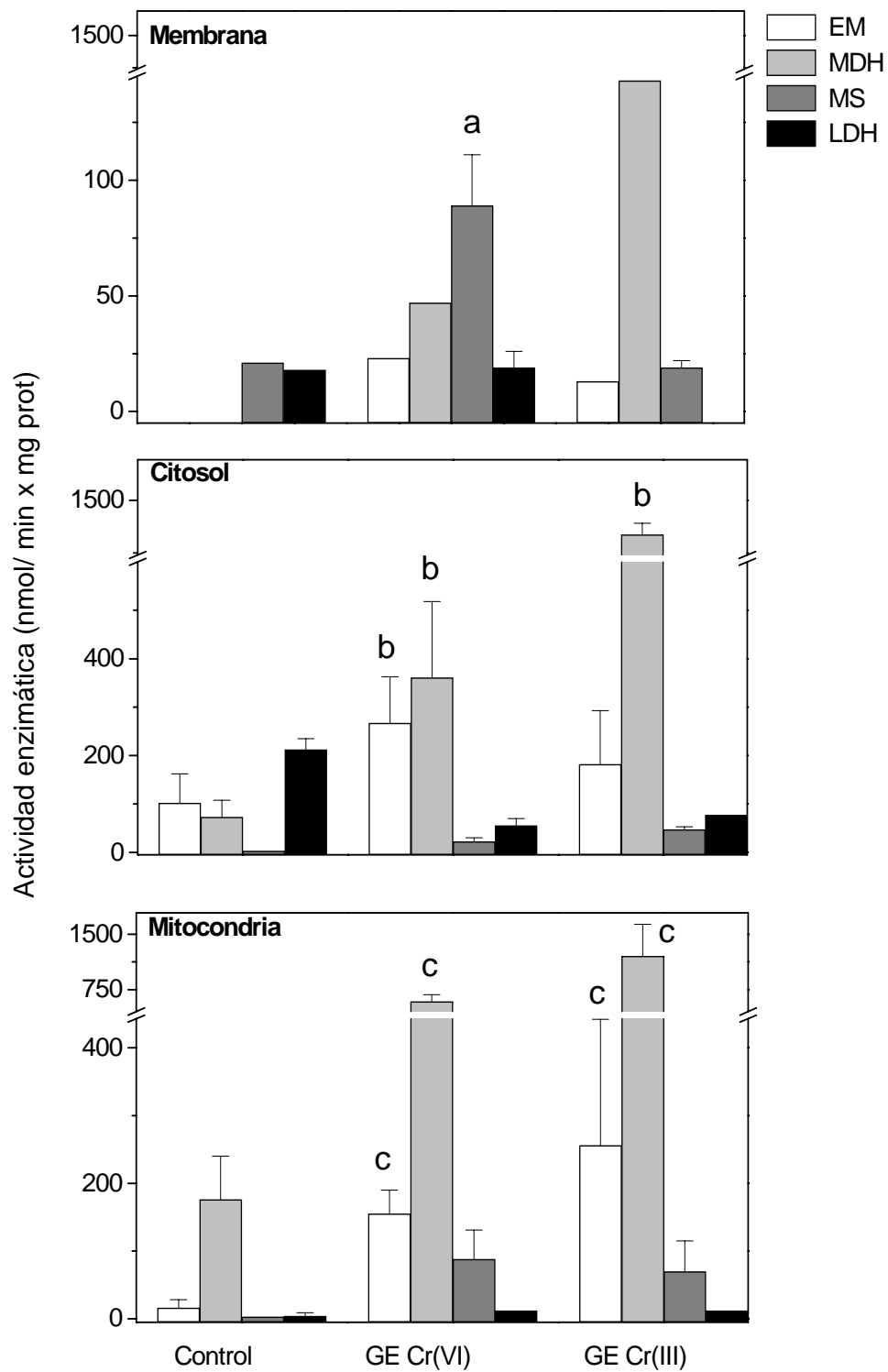


Figura 11. Actividades específicas de las enzimas dependientes de malato en *Euglena gracilis* heterotrófica expuesta a Cr (VI) y Cr (III). EM, Enzima málica; MDH, malato deshidrogenasa; MS, malato sintasa; LDH, lactato deshidrogenasa. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 preparaciones diferentes Prueba T-Student para muestras no apareadas: a, b, y c  $P < 0.05$  vs control.

## 9.8 Efecto de la ausencia de malato en la síntesis de moléculas con grupos tiol

El incremento en la síntesis de moléculas con grupos tiol es un mecanismo ampliamente descrito en *E. gracilis* frente a una exposición a metales como el cadmio y cromo (Avilés, 2001; García, 2008), ya que pueden formar enlaces coordinados con grupos químicos donadores de electrones como la Cys, el GSH, la  $\gamma$ -EC y  $T(SH)_2$  para inactivar al metal; por esta razón fue importante determinar los niveles de tioles bajo estas condiciones experimentales.

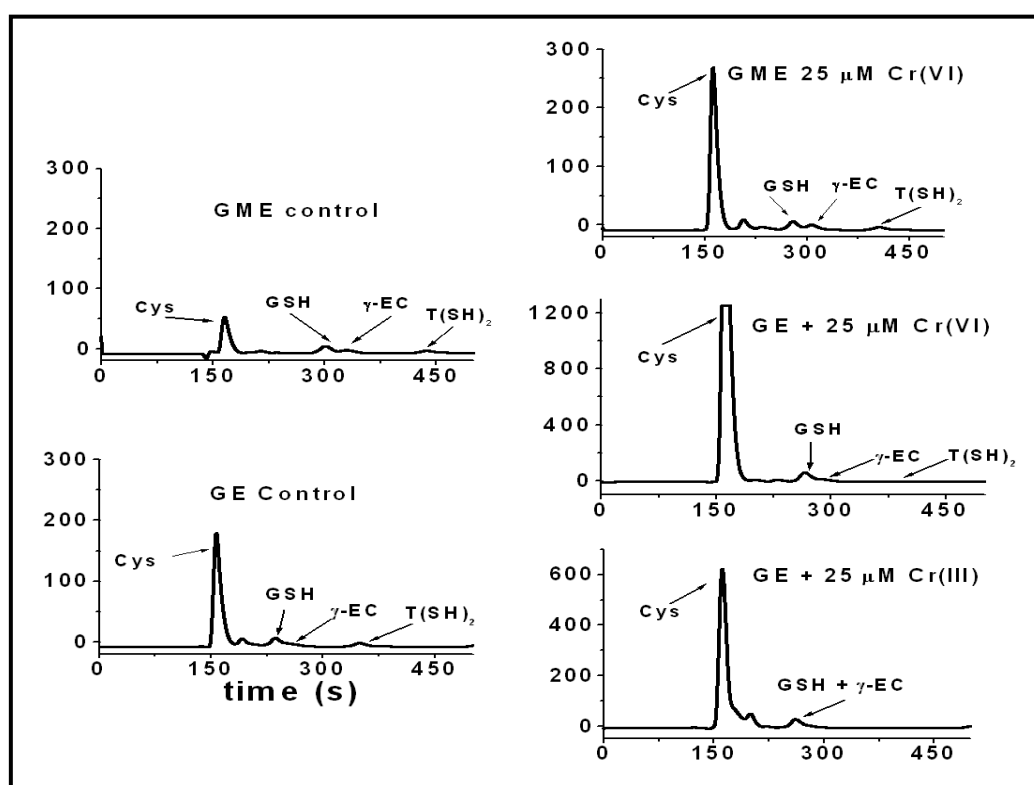


Figura 12. Perfiles de elución de cisteína, glutatión,  $\gamma$ -glutamil cisteína, tripanotión de extractos ácidos de células control cultivadas en medio GME y GE y expuestas a Cr (VI) y Cr (III).

En medio GME, la cisteína aumentó casi 10 veces, mientras que el  $\gamma$ -CE + GSH se incrementó dos veces en células cultivadas en presencia de 25  $\mu$ M Cr (VI) con respecto a las células control, en cambio con 100 y 250  $\mu$ M  $K_2CrO_4$  todas las moléculas con grupos tiol disminuyeron. (Fig. 12 y Tabla 4). En células control

cultivadas en ausencia de malato (medio GE) se observó un incremento de 3 veces en la Cys y  $\gamma$ -CE + GSH comparado con células control GME, lo que sugirió que los metales traza como el zinc, cobre y hierro del medio de cultivo podrían estar causando estrés oxidativo a las células, ahora sin el papel protector del malato como agente quelante.

El contenido de Cys se mantuvo constante hasta 25  $\mu$ M  $K_2CrO_4$ , pero con 50  $\mu$ M de  $K_2CrO_4$  la Cys disminuyó mientras que el  $\gamma$ -CE + GSH y  $T(SH)_2$  aumentaron 5 veces cada uno, respecto al control (Tabla 4). Esto sugirió que hay un flujo hacia la síntesis de  $\gamma$ -CE + GSH y  $T(SH)_2$  a partir de Cys.

**Tabla 4. Contenido en las moléculas con grupos tiol en *Euglena gracilis* heterotrófica expuesta a Cr (VI)**

Cr(VI) $\mu$ M	GME			GE		
	(nmol /10 <sup>7</sup> células)					
	Cys	GSH+ $\gamma$ EC	$T(SH)_2$	Cys	GSH+ $\gamma$ EC	$T(SH)_2$
0	12.5 $\pm$ 2	3.8 $\pm$ 0.5	0.84 $\pm$ 0.1	17 $\pm$ 12	9.3 $\pm$ 2.8	0.5 $\pm$ 0.14
5	34 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	4.6	1.6	21 $\pm$ 19	17 $\pm$ 15	0.50 $\pm$ 0.4
10	87 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.1	21.5 $\pm$ 10	11 $\pm$ 4.5	2.4 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup>
25	118 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.1	23 $\pm$ 14	14 $\pm$ 8	1.8 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>
50	43 $\pm$ 22	6.8 $\pm$ 1.4	0.5 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 8	40 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 2.8
100	17 $\pm$ 4	7.0 $\pm$ 0.6	0.6	13 $\pm$ 10	8 $\pm$ 6	2.8 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>
250	1.3 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.4	0.65 $\pm$ 0.2	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	3.3 $\pm$ 2.9

Los valores se presentan con desviación estándar de al menos 6 cultivos diferente. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  par Cys en células control vs Cys en células con Cr (VI) en medio GME; <sup>b</sup>  $P < 0.01$  para GSH+ $\gamma$ EC en células control vs GSH+ $\gamma$ EC en células con Cr (VI) en medio GME o GE, <sup>c</sup>  $P < 0.05$  para  $T(SH)_2$  en células control vs  $T(SH)_2$  en células con Cr(VI) en medio GE.

Cuando las células se cultivaron en medio GME en presencia de 250  $\mu$ M Cr (III), no hubo incremento en las moléculas con grupos tiol, como se reporto previamente tanto en la cepa fotosintética como en la heterotrófica (García-García *et al.*, 2009; Jasso-Chávez *et al.*, 2010). Sin embargo, en ausencia de malato (medio GE) los cultivos expuestos a Cr (III), presentaron un incremento de 2.7, 2.3 y 7.5 para Cys,  $\gamma$ -CE +

GSH y T(SH)<sub>2</sub> respectivamente, en comparación con las células control (Tabla 5). Lo anterior se correlaciona con la gran cantidad de cromo acumulado en células cultivadas en medio GE expuestas a Cr (III) y da un indicativo de la toxicidad del Cr (III) para *Euglena gracilis* en ausencia de malato (Fig. 6).

**Tabla 5. Contenido en las moléculas con grupos tiol en *Euglena gracilis* heterotrófica expuesta a Cr (III)**

	GME			GE		
	(nmol /10 <sup>7</sup> células)					
Cr(III) $\mu$ M	Cys	GSH+ $\gamma$ EC	T(SH) <sub>2</sub>	Cys	GSH+ $\gamma$ EC	T(SH) <sub>2</sub>
0	12.5 $\pm$ 5	3.8 $\pm$ 1.1	0.84 $\pm$ 0.3	19 $\pm$ 7	4.2 $\pm$ 1.8	0.34 $\pm$ 0.15
1	----	----	----	31 $\pm$ 20	5 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
2	----	----	----	31 $\pm$ 4	13 $\pm$ 10	1.9 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>
5	----	----	----	24 $\pm$ 7	18 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>
10	----	----	----	36 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 1.9
25	----	----	----	41 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 8	3.1 $\pm$ 2.8
50	----	----	----	67 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 11	2 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
100	----	----	----	68 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.3
250	17 $\pm$ 4	5.7 $\pm$ 2.6	1.2	----	-----	-----

Los valores se presentan con desviación estándar, de al menos 6 cultivos diferentes. <sup>a</sup> P<0.05 para Cys en células control vs Cys en células con Cr (III) en medio GE; <sup>b</sup> P<0.01 para GSH+ $\gamma$ EC en células vs GSH+ $\gamma$ EC en células con Cr (III) en medio GE o GME; <sup>c</sup> P<0.01 para T(SH)<sub>2</sub> en células control vs T(SH)<sub>2</sub> en células con Cr(III) en medio GE. ----, No determinado.



## 10 Discusión

---

El objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia que utilizó *E. gracilis* en presencia de Cr (VI) y Cr (III) y determinar si puede considerarse como biorremediador en aguas contaminadas por cromo.

### 10.1 Toxicidad a cromo en *E. gracilis*

En cultivos de *E. gracilis* a un pH de 3.5 se demostró que el malato fue el principal sustrato para su crecimiento (Jasso y Moreno, 2003; Rodríguez-Zavala *et al*, 2006). En cambio, si *Euglena gracilis* se cultiva en medio glutamato, malato y etanol a pH 7.0, el etanol y el glutamato se consumen preferentemente sobre el malato. Sin embargo, en los cultivos expuestos a cromato, el consumo de malato fue aún menor, incluso parecía incrementarse a altas concentraciones de cromato (Fig. 2, Jasso-Chávez *et al.*, 2010).

En este trabajo se utilizó la combinación de glutamato, malato y etanol como sustratos a pH 7.0, para cultivar a las células en medio GME (glutamato-malato-etanol) y GE (glutamato-etanol) para evaluar el efecto de la ausencia de malato sobre el cultivo. En estas condiciones se logró obtener una densidad celular de  $29 \pm 6.6 \times 10^6$  células/mL, mientras la densidad celular en medio glutamato-etanol control fue de  $7.2 \pm 3.7 \times 10^6$  células/mL.

La ausencia de malato en el medio de cultivo (GE) disminuyó un 75% la densidad celular comparada con el medio con malato (GME), lo que indicó que al menos en condiciones control el malato se utilizó para duplicación celular. Sin embargo, cuando las células se cultivaron a pH 3.5 en ausencia de malato, la densidad celular solo disminuyó un 30% (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006).

Cuando las células se cultivaron en presencia de Cr (VI), la densidad celular disminuyó notablemente conforme se incrementó la concentración de cromato, tanto en ausencia como en presencia de malato. Esta inhibición en el crecimiento celular se explicó porque el cromato resulta muy tóxico debido a que entra a las células a través de los transportadores de sulfato, contrario al efecto prácticamente inocuo del cromo (III) que se atribuye a su menor solubilidad y a su incapacidad para atravesar

membranas biológicas (De flora *et al.*, 2000). En cuanto a las células expuestas a 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{CrCl}_3$ , se observó un efecto inhibitorio del 15% sobre la densidad celular similar a lo reportado (Jasso-Chávez *et al.*, 2010) y no se modificó el consumo de la fuente de carbono con respecto a las células control. Pero en ausencia de malato, la  $\text{IC}_{50}$  para el Cr (III) se redujo 30-40 veces.

## **10.2 El Cr (VI) remanente en el medio de cultivo**

El pH del medio de cultivo permitió mantener estable al cromato (Jasso-Chávez *et al.*, 2010), por lo que al cuantificar el cromo remanente en el medio después de 7 días, se encontró que la ausencia de malato provocó una rápida reducción extracelular del Cr (VI). *E. gracilis* en medio GE fue capaz de reducir un 14% de 250  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) presente en el medio (Fig. 4), lo que significa que se redujo 440 nmol de Cr (VI) por mg de peso seco (considerando que  $1 \times 10^7$  células de *E. gracilis* equivalen a 3.7 mg de peso seco, Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Mientras *Chlorella sp.*, un alga verde obtenida de estanques donde se descargan los residuos de las curtidoras, fue capaz de reducir un 97% de cromo cuando se cultivó en 192  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Rehman y Shakoori, 2001). Lo que indica que la bio-reducción en algas es una respuesta común a la exposición de metales pesados.

## **10.3 Acumulación intracelular**

La acumulación intracelular de cromo se incrementó cuando las células se cultivaron en altas concentraciones de Cr (VI), sobretodo en medio GE, no obstante la acumulación fue mayor en los cultivos con Cr (III) en ausencia de malato (Fig.5). Es común que los medios de cultivo de plantas y algas sean principalmente minerales esenciales y glucosa en algunos casos, sin la presencia de ácidos orgánicos que podrían quelar al Cr (III) y evitar su absorción.

En cultivos de *Salsola kali* durante 15 días, las raíces acumularon 462 nmol (160 nmol Cr/mg peso seco) cuando en el medio se adicionó 385  $\mu\text{M}$  Cr (VI), la acumulación fue 10-20 veces mayor que con Cr (III). Sin embargo, se constató que el Cr (III) causó efectos más tóxicos que el Cr (VI) sobre el tamaño de la raíz (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). Considerando que la máxima acumulación en *E. gracilis* cultivada en medio GE

más 250  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) fue de 12 nmol Cr /mg peso seco, esto fue considerablemente menor que el cromo acumulado por *Salsola kali*. Lo que sugirió que la captación de cromo por *E. gracilis* es varias veces menor que la velocidad de reducción de cromo.

En plántulas de apio la acumulación de Cr (III) fue dependiente de la dosis, a 100  $\mu\text{M}$  Cr (III) las raíz fue la parte de mayor acumulación (0.23 nmol Cr/g de peso fresco), esta baja acumulación fue suficiente para afectar la longitud de la raíz y la síntesis de clorofila (Scoccianti *et al.*, 2006). Sin embargo, en el polen de kiwi germinado la acumulación de Cr (III) fue mayor que con Cr (VI) y dependiente del calcio exógeno en el medio, la acumulación fue de 86 y 11.5 nmol Cr /mg de peso seco con 150  $\mu\text{M}$  Cr (III) y Cr (VI), respectivamente (Scoccianti *et al.*, 2008).

La acumulación de Cr (III) en el polen de kiwi fue similar a los resultados en *E. gracilis*, así como el patrón lineal que se observó en la acumulación de Cr (III), mientras que la captación de Cr (VI) siguió un modelo logarítmico (Fig. 6).

Los datos de acumulación en *E. gracilis* mostraron una alta capacidad de acumulación de cromo por célula en medio GE, pero su eficiencia de remoción de Cr (VI) por cultivo fue baja debido a que la toxicidad del metal disminuyó notablemente la densidad celular. Sin embargo, con Cr (III) la eficiencia de remoción se incrementó un 50% en los cultivos mayores a 25 $\mu\text{M}$   $\text{CrCl}_3$ , ya que siempre se obtuvo más de  $1.4 \times 10^6$  células/mL, a pesar de que las células fueron más sensibles (Tabla 3).

Algunas algas y plantas son capaces de acumular metales en el cloroplasto, mientras que *Euglena gracilis heterotrófica* en presencia de cadmio es capaz de compartimentar este metal en la mitocondria (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007). Los resultados mostraron que la compartimentalización en mitocondrias de células GE+pulso 100  $\mu\text{M}$  Cr (VI) y Cr (III), se incrementó de manera significativa comparada con las mitocondrias de células GME expuestas a cromo. Además en mitocondrias aisladas de células control expuestas a un pulso de 100 $\mu\text{M}$  Cr (VI).se encontró 1.5 nmol Cr (VI) /mg proteína, esto sugiere que no todo el Cr (VI) en el interior de la célula se reduce instantáneamente a Cr (III) como ha sido sugerido en otros trabajos.

#### **10.4 Reducción enzimática del Cr (VI)**

Se ha descrito que la reducción de Cr (VI) a Cr (III) es un paso importante en la desintoxicación de ambientes contaminados por cromo (Cervantes *et al.*, 2001).

Algunas bacterias resistentes a cromo como: *Pseudomonas putida* (Park *et al.*, 2000), *Enterobacter cloacae* (Wang *et al.*, 1990), *Pseudomonas spp.* (McLean y Beveridge, 2001) y algas como *Chlorella spp.* son capaces de reducir el Cr (VI) a Cr (III) enzimáticamente (Yewalkar *et al.*, 2007) a través de una proteína soluble o unida a la membrana, dependiendo las condiciones de cultivo.

En este trabajo, se determinó una baja actividad de la cromato reductasa en medio GE tanto en la fracción citosólica como membranal de células control, pero la contaminación cruzada de la fracción membranal por la fracción citosólica (debido a la actividad de LDH-NAD<sup>+</sup>, datos no mostrados) sugirió que la actividad de cromato reductasa en *E. gracilis* era citosólica. Esta actividad fue sensible a temperatura, urea y proteinasa K, lo que indicó su naturaleza proteica.

Sin embargo, cuando se añadió un pulso de 100  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) y Cr (III) a un cultivo control, la actividad de cromato reductasa se incremento de 4-5 veces tanto en la fracción citosólica como en la membranal. También se determinó que la actividad enzimática se incrementó 10 veces en la fracción citosólica de células GE+pulso 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a Cr (III), mientras en la fracción membranal la actividad fue de 1841 nmol Cr (VI)<sub>reducido</sub> (min. x mg prot)<sup>-1</sup>. Los datos sugieren que la expresión de la cromato reductasa no fue específica a cromato, sino una enzima dependiente de ascorbato implicada en reducir el estrés oxidativo causado por Cr (III) como ocurre con cadmio (Castro-Guerrero *et al.*, 2008.).

El análisis cinético de los datos reportados para la cromato reductasa, mostró que los valores de Km y Vm fueron diferentes en cada condición, lo que sugirió que no solo se indujo un incremento en la actividad de una enzima como respuesta al estrés causado por cromo, sino un conjunto de enzimas como respuesta al estrés. Para determinar si la cromato reductasa unida a la membrana fue diferente a la enzima citosólica, es necesario realizar otros experimentos.

Se determinó que el ascorbato intracelular se incrementó en las células cultivadas en presencia de Cr (VI) pero no en Cr (III). Está documentado que la reacción química entre el Cr (VI) y ascorbato conduce a la generación de Cr (V) y posteriormente el daño del ADN (Stearns *et al.* 1994). Sin embargo, experimentos in vivo demuestran que el ascorbato no aumenta la unión Cr-ADN (Yuann *et al.*, 1999) y la actividad de ascorbato peroxidasa se incrementa tanto en la planta *Jatropha curcas* expuesta a Cr

(VI) (Yadav *et al.*, 2010) como en *E. gracilis* heterotrófica expuesta a cadmio (Castro-Guerrero *et al.*, 2008). Lo que sugiere que el ascorbato está disponible y saturante para esta reacción. Por lo tanto, parece que *E. gracilis* heterotrófica logró contender contra el estrés oxidativo inducido por Cr (VI) mediante un incremento en el contenido de ascorbato o en las moléculas con grupos tiol, mientras que el Cr (III) sólo indujo la síntesis de moléculas con grupos tiol o inhibió la vía de síntesis de ascorbato, como se reporto para los cloroplastos de *Pisum sativum* (Pandey y Shyam, 2009).

### **10.5 Secreción de malato y enzimas dependientes de malato**

Esta ampliamente reportada la capacidad de algunas plantas para excretar ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico y málico) bajo diversos estímulos ambientales como: una deficiencia de nutrientes (particularmente fósforo), anoxia o frente a la exposición a cationes tóxicos ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) para disminuir sus concentraciones en la rizosfera o la potencial acumulación de metabolitos tóxicos en el citoplasma (Ryan *et al.*, 2001; Kinraide, 2005).

En este trabajo, se determinó por primera vez que un protozoario heterotrófico fue capaz de secretar malato en respuesta no solo a  $\text{Cr}^{3+}$  sino también a una exposición a  $(\text{CrO}_4)^{2-}$  (Fig. 10).

Se propone que la actividad de la cromato reductasa unida a la membrana se detectó frente a una exposición a concentraciones altas de cromato y Cr (III) (Fig. 3).

La reducción de Cr (VI) a Cr (III) fue más rápida que el transportador de sulfato transportando cromato al interior de la célula, por lo que el  $\text{Cr}^{3+}$  parece ser la señal para que la célula inicie la secreción de malato (Esquema 2). En la secreción de ácidos orgánicos, estos probablemente son secretados como aniones (formas disociadas del protón) y no como ácidos. A pesar de la gran diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (interior negativo) se puede garantizar que el gradiente electroquímico para los aniones orgánicos favorece su movimiento pasivo fuera de la célula (Ryan *et al.*, 2001).

Se propone que en plantas, el transporte de malato al exterior de la célula es el paso limitante y que en la cebada (*Hordeum vulgare*) su expresión aumenta durante la tolerancia a aluminio (Delhaize *et al.*, 2004). Sin embargo, la rápida secreción de malato en *E. gracilis*, sugiere que el transporte de malato no es limitante (fig. 10B,

recuadro), probablemente porque *E. gracilis* es cultivada habitualmente en presencia de malato y el consumo rápido de malato a pH 3.5, sugiere que el transportador puede estar exacerbado (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003).

Tashiro *et al.*, (2007) utilizando  $^1\text{H}$  y  $^{27}\text{Al}$  espectroscopía de RMN, han demostrado que la principal forma de un complejo de Al-malato está formado por dos iones malato y dos iones Al (III). Este podría ser el mismo caso del complejo malato-Cr (III). De hecho, el Cr (III) parece tener una capacidad muy grande para formar compuestos organo-Cr (III) como  $\text{NAD}^+\text{-Cr (III)}$  y la reducción del citocromo c mediada por Cr (VI) produce aductos citocromo c-Cr (III) (Puzón *et al.*, 2005), así como también con ácidos orgánicos (acético, oxálico, cítrico y ascórbico), aminoácidos (alanina y aspártico), proteínas (albúmina y caseína) y componentes como extracto de levadura y peptona utilizados en los medios de cultivo (Remoundaki *et al.*, 2007).

La formación inmediata de un complejo estable órgano Cr-(III) sugiere que esos complejos son bastante comunes y que probablemente representan una parte integral de los ciclos naturales de cromo.

Las actividades de las enzimas que intervienen en la producción malato, fueron inferiores a las actividades reportadas previamente para *Euglena gracilis*, aunque cabe mencionar que la metodología para romper las células era más suave y al parecer su localización y actividades están regulados por la fuente de carbono (Bégin-Heick, 1972). Sin embargo, se encontraron cambios significativos entre las actividades de las células control y las células expuestas al cromo (Fig. 11).

A pesar de que la función fisiológica de la enzima málica parece estar implicada en la descarboxilación de malato, existe evidencia de que en *Corynebacterium glutamicum* la reacción podría producirse en sentido reverso cuando el metabolismo de lactato esta activo y se alcanzan altas concentraciones de piruvato (Gourdon *et al.*, 2000). Condiciones similares se pueden encontrar en *E. gracilis* cuando en la fase estacionaria de crecimiento el metabolismo de lactato es esencial, la concentración de piruvato en *E. gracilis* en esta etapa es de 1 mM (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003).

El aumento de la actividad de la enzima málica parecía no ser por la síntesis de malato, pero sí debido a la descarboxilación de malato para la producción de NADPH, como se ha demostrado en *P. fluorescens* expuesto a la toxicidad de aluminio (Lemire

*et al.*, 2008). De hecho, *P. fluorescens* adapta su metabolismo para aumentar la síntesis de NADPH mediante un aumento de las actividades de la enzima málica y otras enzimas para la producción NADPH y por la disminución en la producción de NADH contra el estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2007).

Esta podría ser la razón por la cual en *E. gracilis* disminuyó la lactato deshidrogenasa y la NADH deshidrogenasa mitocondrial no sensible a rotenona se incrementó en presencia de cromo (Fig.11, Jasso-Chávez *et al.*, 2010). La síntesis de malato por la NAD<sup>+</sup>-MDH, la malato sintasa y la descarboxilación del malato por la NADP<sup>+</sup>-enzima málica, no forman parte de un ciclo fútil debido a las actividades de MDH-NAD<sup>+</sup> son más altas que la actividad de la enzima málica, debido a que el contenido intracelular de malato tanto en células control y las células expuestas a cromo se incrementan hasta 140-170 nmol malato/10<sup>7</sup> células.

### **10.6 Síntesis de moléculas con grupos tiol**

Cuando las células se cultivaron con Cr (III) en presencia de malato no hubo un incremento en las moléculas con grupos tiol, similar a lo reportado previamente (Jasso-Chávez *et al.*, 2010) como también se ha descrito en *E. gracilis* fotosintética (García-García *et al.*, 2009) debido a que la acumulación fue mínima. Pero la ausencia de malato en el medio de cultivo y la acumulación de cromo aumentó de manera exponencial (Fig. 6), hubo un incremento en Cys,  $\gamma$ -EC + GSH y T(SH)<sub>2</sub> como respuesta de las células para contender contra el cromo (Tabla 4). El incremento en las moléculas con grupos tiol es una respuesta común contra los metales pesados en *E. gracilis* (Devars *et al.*, 1998; 2000; Avilés *et al.*, 2003; 2005; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; 2006a, b). El aumento de las moléculas con grupos tiol ha sugerido que la acumulación es mediada por la unión del metal con los grupos-SH (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

En plantas cultivadas en presencia de Cr (III), determinaron una gran acumulación y una menor proporción del metal libre, debido a la conjugación de poliaminas. En particular la putrescina libre, es la poliamina que presenta el mayor incremento (Scoccianti *et al.*, 2006). La putrescina es el precursor de la espermidina, un componente del tripanotión (Colloti y Llari, 2010). Por lo anterior, el cromo en *E. gracilis* también podría inducir la síntesis de poliaminas, que a su vez pueden ser

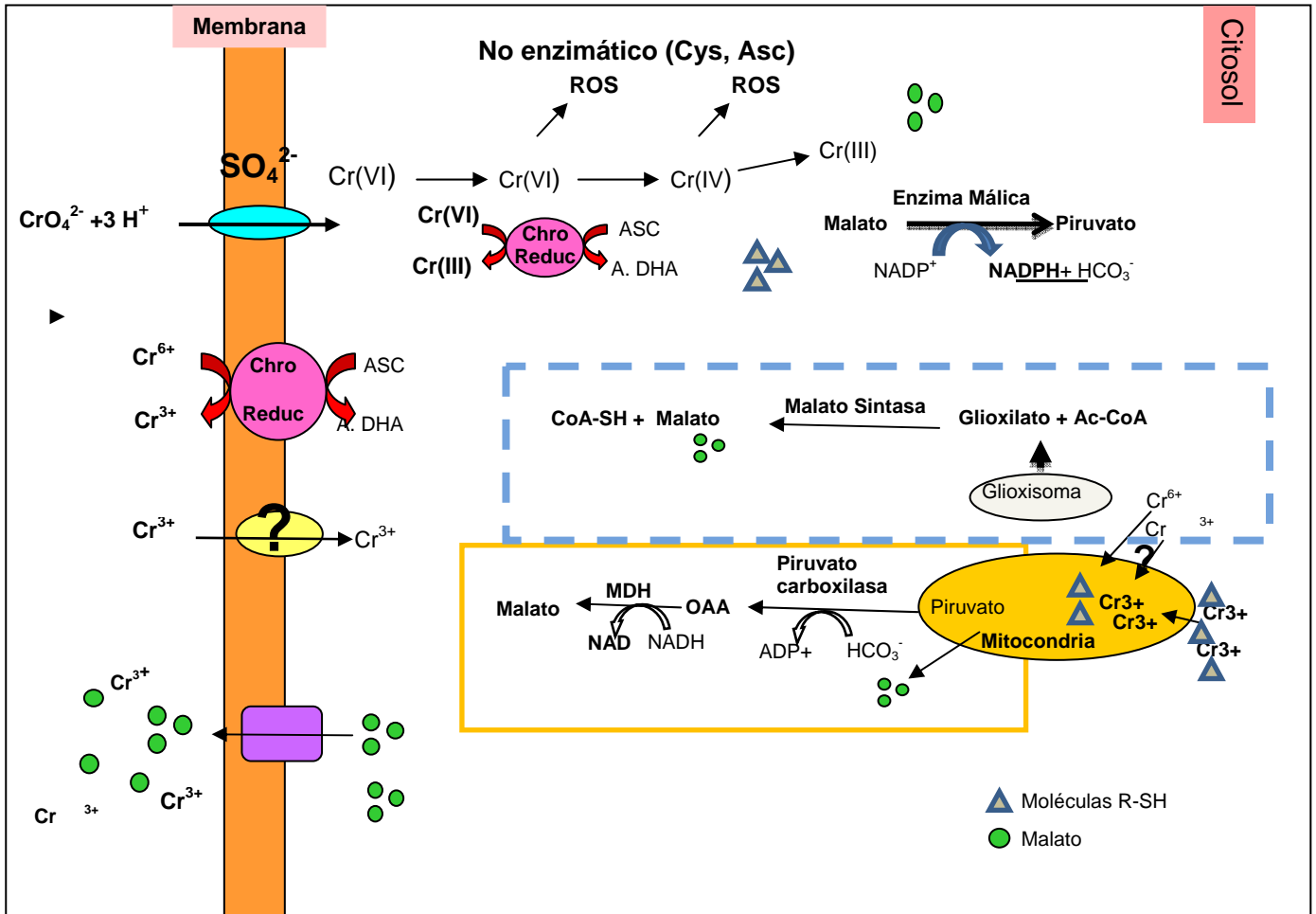
utilizadas para la síntesis de tripanotión , debido al aumento de esta molécula en las células cultivadas en medio GE (Tablas 4 y 5).

Los datos obtenidos en este trabajo demostraron que *E. gracilis* es capaz de utilizar diversos mecanismos simultáneamente frente a una exposición a Cr (VI) y a Cr (III), que la ausencia de moléculas carboxiladas o la presencia de moléculas con grupos tiol facilitarán la entrada, la acumulación intracelular y la inactivación del metal pesado.

Los diferentes mecanismos que se determinaron en *E. gracilis*: acumulación y compartimentación de cromo, la sobreexpresión de la cromato reductasa citosólica y membranal, la quelación por monotioles y la secreción de malato para inactivar al Cr (III) son parte importante de las estrategias que puede expresar este protozooario frente a una exposición a cromo; pues el cromato presente en el medio entrará a la célula a través de los transportadores de sulfato, y una vez dentro será reducido a Cr (III) por la enzima citosólica y el resto de los compuestos oxido-reductores presentes en el citosol, el incremento en la síntesis de monotioles participara en la quelación del Cr (III) para inactivarlo y finalmente la secreción de malato ayudará a quelar al Cr (III) extracelular (Esquema 2). La expresión de estos mecanismos de resistencia, le permitirá a la célula contender de manera eficiente contra los efectos tóxicos del cromato.



Esquema 2 .Mecanismos de resistencia propuesto para *Euglena gracilis* heterotrófica expuesta a cromo.



Mecanismos de resistencia en *E. gracilis* heterotrófica para contender contra la toxicidad del cromo: i) la ausencia de un ácido orgánico puede aumentar la acumulación de metales pesados en las células y la compartimentalización en la mitocondria, ii) la sobre-expresión en la actividad de la cromato reductasa en el citosol y en la fracción membranal, iii) la secreción activa de malato para quelar al Cr(III) extracelularmente y iv) Incremento en las moléculas con grupos tiol y ascorbato.

## 11 Conclusiones

---

En este trabajo se demostró que *Euglena gracilis* es capaz de expresar diferentes mecanismos de resistencia de manera simultánea frente a una exposición a cromo, dependiendo de la composición del medio de cultivo y con ello utilizarse como un potencial biorremediador.

Además, se estableció que el Cr (III) puede ser tan tóxico como el Cr (VI) o más para *Euglena gracilis* según la composición del medio de cultivo.

Los mecanismos de resistencia a cromo en *E. gracilis* aquí determinados fueron:

i) La eficiente acumulación y compartimentación de Cr (III) en ausencia de malato.

ii) La sobreexpresión de la actividad de una enzima dependiente de ascorbato, capaz de reducir al cromato en la fracción citosólica y membranal en células cultivadas en ausencia de malato.

iii) La secreción de malato para inactivar al Cr (III) extracelularmente. Mecanismo descrito por primera vez en un protozooario heterotrófico, la secreción se realiza en respuesta a no solo a Cr<sup>3+</sup> sino también frente una exposición a (CrO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup>.

iv) Un mayor incremento en la síntesis de monotioles (Cys, GSH, γ-EC y T(SH)<sub>2</sub>) para enlazar e inactivar al Cr (III) intracelularmente en ausencia de malato.

Se concluyó que en función de la composición del medio *E. gracilis* podría ser considerado como un potencial biorremediador de aguas contaminadas por cromo.

## **12 Apéndice**

---

### **12.1 Normatividad para metales pesados**

En la NOM-147-SEMARNAT/SS-2005 (Metales Pesados), NOM-CCA-001-ECOL-1993, NOM-067-ECOL-1994 y algunas leyes se establecen algunos criterios para prevenir y disminuir la contaminación por el manejo inadecuado de materiales y residuos potencialmente tóxicos.

También se establecen las concentraciones máximas de metales pesados que resultan tóxicas para el ser humano y los límites máximos permisibles de metales pesados en alimentos para consumo humano.

El objetivo de estas normas es evitar efectos adversos en la población o el ambiente como consecuencia de una exposición a alimentos, aguas y suelos contaminados por metales pesados. También se busca recuperar los ambientes contaminados e integrarlos a actividades sustentables.

### **12.2 Normatividad para metales pesados en aguas residuales y su uso**

Debido al incremento de metales pesados en las aguas residuales utilizadas para irrigar cultivos (Méndez *et al.*, 2003), se han creado normas para evitar el incremento en la contaminación de las zonas aledañas y los efectos tóxicos que puede causar en plantas y animales.

En la NOM-001-ECOL-1996, NOM-CCA-031-ECOL/1993, NOM-004-SEMARNAT-2002 se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales y de servicios para su tratamiento y descarga en los sistemas de drenaje y su posterior descarga en aguas nacionales (Tabla 2). Los grandes volúmenes de lodos o biosólidos contribuyen de manera importante a la contaminación de la atmósfera, aguas nacionales y suelos; por lo que han sido utilizados en la agricultura si cumplen con los límites máximos permisibles de contaminantes establecidos en la NOM-004-SEMARNAT-2002 para atenuar sus efectos contaminantes en el medio ambiente. Por otro lado, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece los criterios para determinar las concentraciones de metales pesados en tierras de cultivo y evitar la contaminación en cultivos.

**Tabla 6. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros**

Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros																		
Parámetros (*)	Ríos						Embalses naturales y artificiales				Aguas costeras				Suelos			
(mg/L)	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (B)		Uso público urbano (C)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		Estuarios (B)		Uso en riego agrícola (A)	
	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.4
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.05	0.1
Cianuros	1.0	3.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	2.0	3.0
Cobre	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4	6.0	4	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4	6.0
Cromo	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0
Mercurio	0.01	0.02	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.005	0.01
Níquel	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
Plomo	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	0.2	0.4	5	10
Zinc	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20

(\*) Medidos de manera total. P.D. = Promedio Diario P.M.= Promedio Mensual

Fuente: Modificada de NOM-001-ECOL-1996.

**Tabla 7. Límites máximos permisibles de metales pesados para suelos y biosólidos para uso agrícola e industrial**

Contaminante	NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004		NOM-004-SEMARNAT-2002	
	Suelos		Lodos y biosólidos	
	Uso agrícola /residencial/comercial	Uso industrial	Excelente	Buenos
	(mg/kg)		mg/kg en base seca	
Arsénico	22	260	41	75
Bario	5 400	67 000	-	-
Berilio	150	1900	-	-
Cadmio	37	450	39	85
Cobre	-	-	1 500	4 300
Cromo (VI)	280	510	1 200	3 000
Mercurio	23	310	17	57
Níquel	1 600	20 000	420	420
Plata	390	5 100	-	-
Plomo	400	800	300	840
Selenio	390	5 100	-	-
Talio	5.2	67	-	-
Vanadio	78	1000	-	-
Zinc	-	-	2 800	7 500

Fuente: NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, NOM-004-SEMARNAT-2002

### **12.3 Normatividad para metales pesados en alimentos**

La contaminación por metales pesados en alimentos afecta la salud humana a diferentes niveles, desde una leve intoxicación hasta diversos tipos de cáncer, por lo cual debe existir un riguroso control a lo largo de la cadena de producción de alimentos.

La contaminación se por metales pesados origina por el uso de aguas residuales para el riego de cultivos vegetales para consumo humano o forrajes para el ganado; por contacto de los vegetales con aguas superficiales contaminadas; debido a la ingestión de animales que han consumido forrajes y agua contaminada y que son utilizados para consumo humano o por la filtración de metales pesados a los mantos acuíferos.

Por lo que se han establecido los límites máximos permisibles de metales pesados en agua, alimentos de origen vegetal y animal para consumo humano (Tabla 4).

Sin embargo, no existen normas que establezcan las concentraciones de metales pesados toxicas en chiles, espinacas, cacahuate, arroz, cebada maltera y café; productos vegetales de alto consumo para algunas regiones del país en los cuales se han reportado altos niveles de metales como cadmio y cromo.

La contaminación por metales pesados en alimentos envasados y sometidos a tratamiento térmico se debe a un inadecuado control durante el proceso, por lo que la NOM-130-SSA1-1995 establece los valores máximos permisibles (en mg/kg) para Pb (0.2-1.0), As (0.2-1.0), Cd (0.1-0.2 y Sn (100 a 250), pero no se considera el cromo que es un contaminante altamente tóxico.

**Tabla 8. Límites máximos permisibles de metales pesados en alimentos para consumo humano.**

		ESPECIFICACIONES						
		Límite Máximo Permissible						
		(mg/kg)						
NOM-027-SSA1-1993 MX-FF-001-SCFI-2009 NOM-031-SSA1-1993 NOM-129-SSA1-1995	Productos de la pesca: pescados, moluscos bivalvos cefalópodos y gasterópodos secos, ahumados, frescos, refrigerados y congelados.	Cd			0.5			
		Hg			1.0			
		Hg metil mercurio			0.5			
		Pb			1.0			
NMX.-FF-115-SCFI-2010	Flor de Jamaica	Pb, Hg, As, Cd, Cr			0.01			
NOM-004-ZOO-1994	Carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, por lo que ahora se denominará grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos	As	Hígado			1.4-2.0		
			Riñón			1.4-2.0		
			Músculo			0.5-0.7		
		Cd	Hígado			10.0		
			Riñón			5.0		
			Músculo			2.0		
		Cu	Hígado			60.0		
			Riñón			10.0		
			Músculo			2.0		
		Pb	Hígado			2.0		
			Riñón			2.0		
			Músculo			0.5		
Hg	Hígado			1.4				
	Riñón			1.4-2.0				
	Músculo			0.7-0.5				
NOM-127-SSA-1-1994	Agua	Zn	Cr	Al	As	Pb	Cd	Hg
		mg/L						
		5	0.05	0.2	0.05	0.025	0.005	0.001

Fuente: NOM-027-SSA1-1993, NOM-031-SSA1-1993, NOM-004-ZOO-1994, NOM-127-SSA-1-1994, NOM-129-SSA1-1995, MX-FF-001-SCFI-2009, NMX.-FF-115-SCFI-2010

## 13 Índice de figuras

---

Figura 1. Mecanismos de resistencia a metales pesados que se han reportado para diferentes organismos. Modificado de Rodríguez-Zavala <i>et al.</i> , 2007.....	18
Figura 2. Efecto del cromo sobre el consumo de la fuente de carbono en <i>E. gracilis</i> heterotrófica. Modificado de Jasso-Chávez <i>et al.</i> , 2010.....	23
Esquema 1. Metodología .....	34
Figura 3. Efecto del malato sobre el crecimiento y la toxicidad a cromo en cultivos de <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica. ....	35
Figura 4. Efecto de la ausencia de malato en el Cr (VI) remanente al 7 día de cultivo.....	37
Figura 5. Cromo adsorbido a la membrana celular.. ....	38
Figura 6. Acumulación de cromo total en <i>Euglena gracilis</i> .....	39
Figura 7. Actividad de cromato reductasa determinada como % de cromo (VI) reducido en la fracción membranal y citosólica de células control y células cultivadas con 25 $\mu$ M $K_2CrO_4$ .....	43
Figura 8. Actividad de la Cromato reductasa de <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica.....	44
Figura 9. Efecto del cromo en el contenido de ascorbato intracelular en <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica. ....	45
Figura 10. Secreción de malato por <i>E. gracilis</i> heterotrófica expuesta a cromo.....	47
Figura 11. Actividades específicas de las enzimas dependientes de malato en <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica expuesta a Cr (VI) y Cr (III).. ....	48
Figura 12. Perfiles de elución de cisteína, glutatión, $\gamma$ -glutamil cisteína, tripanotión de extractos ácidos de células control cultivadas en medio GME y GE y expuestas a Cr (VI) y Cr (III).....	49
Esquema 2 .Mecanismos de resistencia propuesto para <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica expuesta a cromo.....	60



## 14 Índice de tablas

---

Tabla 1. Requerimientos nutricionales de algunos cultivos .....	8
Tabla 2. Compartimentación de cromo en mitocondrias aisladas de células cultivadas en GME y GE con Cr (VI) o Cr (III) .....	40
Tabla 3. Eficiencia de la acumulación de cromo en <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica .....	41
Tabla 4. Contenido en las moléculas con grupos tiol en <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica expuesta a Cr (VI) .....	50
Tabla 5. Contenido en las moléculas con grupos tiol en <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica expuesta a Cr (III).....	51
Tabla 6. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros .....	63
Tabla 7. Límites máximos permisibles de metales pesados para suelos y biosólidos para uso agrícola e industrial .....	64
Tabla 8. Límites máximos permisibles de metales pesados en alimentos para consumo humano. ....	66

## 15 Abreviaturas

---

$\gamma$ -EC	gamma glutamil cisteína	GSH	Glutación reducido
$\mu$ g	Microgramos	GSSG	Disulfuro de glutatión
Ag	Plata	Hg	Mercurio
Al	Aluminio	K	Potasio
As	Arsénico	kg	Kilogramo
ATP	Adenosin Trifosfato	LDH	NAD <sup>+</sup> -lactato deshidrogenasa
B	Boro	MDH	NAD <sup>+</sup> -Malato deshidrogenasa
B <sub>1</sub>	Vitamina B <sub>1</sub>	Mg	Magnesio
B <sub>12</sub>	Vitamina B <sub>12</sub>	mg	Miligramos
Ca	Calcio	min	Minuto
Cd	Cadmio	Mn	Manganeso
Co	Cobalto	MoO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Molibdato
Cr	Cromo	MS	Malato Sintasa
Cu	Cobre	Na	Sodio
Cys	Cisteína	Ni	Níquel
DNA	Acido desoxirribonucleico	P	Fósforo
DTNB	Ácido Ditionitrobenzoico	Pb	Plomo
DTT	Ditiotreitol	PCA	Acido perclórico
EGTA	Acido etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetiléter)- N,N,N',N'-tetraacético	ppm	Partes por millón (mg/L)
EM	NADP <sup>+</sup> -Enzima Málica	prot	Proteína
Fe	Hierro	ROS	Especies reactivas de oxigeno
FQ	Fitoquelatinas	Se	Selenio
GE	Medio glutamato, etanol	-SH	Grupo sulfidriilo
Glu	Glutámico	Sn	Estaño
Gly	Glicina	T(SH) <sub>2</sub> :	Tripanotión reducido
GME:	Medio-glutamato, malato, etanol	T:	tonelada
		Zn	Zinc

---

## 16 Bibliografía

---

Avilés R. C., 2001. Mecanismos de Resistencia a cadmio en *Euglena gracilis* heterotrófica. Trabajo de grado (Maestro en ciencias, Especialidad en biología experimental), UNAM, Facultad de ciencias

Avilés C., Loza-Tavera H., Terry, N., Moreno-Sánchez R., 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 180: 1–10.

Banerjee A., Nayak D., Chakraborty D., Lahiri, S., 2008. Uptake studies of environmentally hazardous  $^{51}\text{Cr}$  in *Mung beans*. *Environ. Pollut.* 151, 423–427.

Baqueiro Cárdenas E. R., Borabe L. Goldaracena Islas C. G., Rodríguez Navarro J., 2007. Los moluscos y la contaminación. *Rev Mex Biodiver* . pp 1-7. ISSN:1870-3453

Barnhart J., 1997. Occurrences, uses and properties of chromium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26, S3–S7.

Bégin-Heick. N., 1972. The localization of enzymes of intermediary metabolism in *Astasia* and *Euglena*. *The biochem. J.* 134: 607-616.

Bonomelli C., Bonilla C., Valenzuela A., 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, 38:1179-1186

Cajuste J. L., Vázquez A. A., Siebe G. C., Alcántar G.G., De la Isla de Bauber M.L., 2001. Cadmio, níquel y plomo en agua residual, suelo y cultivos en el valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Agro* 35:267-274

Cajuste J.L, Carrillo R., Laird R.J.1991. The distribution of metals from freshwater in the mexican Valley of Mezquital. *Water, Air and Soil Pollution.* 57-58:189-180

Cano R. I., Pérez G J. A, Gutiérrez V. M., Gardea T. J. L., 2002. Remoción y recuperación de cromo (III) de soluciones acuosas por biomasa de sorgo. *Rev Mex Ing Q*, 1:97-103

Carrillo R. y Cajuste J.L., 1992. Heavy metals in soils and alfalfa (*Medicago Sativa L.*) irrigated with three sources of wastewater. *J Environ Science and Health.* A27:1771-1783

Castro D. J., 2008. A 30 años del cierre de Cromatos de México 60 mil toneladas de residuos aún nos envenenan.

Castro D.J, 2006. Residuos peligrosos y cultura en México, el caso de intoxicación por cromo en Tultitlán .Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Antropología e Historia. México, 70pp

Castro Guerrero N. A., 2007, Caracterización bioquímica y papel fisiológico de la oxidasa alterna en *Euglena gracilis*, Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias Bioquímicas). Facultad de Química, UNAM.

Castro-Guerrero N. A., Rodríguez-Zavala J. S., Marín-Hernández A., Rodríguez-Enríquez S., Moreno-Sánchez R., 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under  $\text{Cd}^{2+}$  stress in *Euglena*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40:227-235

- Cervantes C. y Moreno-Sánchez R., 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos; *AGT Editor*, pp. 4-8
- Cervantes C., Espino-Saldaña A.E., Acevedo-Aguilar F., León-Rodríguez I.L., Rivera-Cano M.E., Ávila-Rodríguez M., Wróbel-Kaczmarczyk K., Wróbel-Zasada K., Gutiérrez-Corona J.F., Rodríguez-Zavala J.S., Moreno-Sánchez R., 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Latinoam Microbiol*; 48: 203-210
- Cervantes C, Vaca S. 1991. Cromatos: Resistencia y detoxificación en bacterias. *Rev. Latin. Microbiol* 33, 71-76
- Cervantes C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbio. Rev.* 25: 335–347.
- Colotti G., Llari A., 2010. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Aminoacids* DOI10.1007/s00726-010-0630-3.
- Cruz L. A., 2008. Efecto protector de antioxidantes en la toxicidad por dicromato de potasio en células LLC-PK1. Tesis de Licenciatura (Química de Alimentos), Facultad de Química, UNAM
- De flora S., Wetterhahn K.E., 1989. Mechanism of chromium (VI) metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep*; 7:169-244
- De Flora, S., 2000. Thresold mechanism and site specifity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinog.* 21:533-541
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H., 2004 Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proceed Nat Acad Scien USA.* 101: 15249-15254.
- Devars, S., Hernández, R., Moreno-Sánchez, R., 1998. Enhanced heavy metal tolerance in *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 128–135.
- Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R., 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 174: 175–180.
- Devars Ramos Silvia, 2008, Mecanismos de tolerancia a metales pesados en *Euglena gracilis*, Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias Biológicas), Facultad de Ciencias. UNAM.
- Eccles H., 1999. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends Biotechnol.* 17: 462-5.
- Feng Ma J., Ryan P R, Delhaize E., 2001, Aluminium tolerance in plantas and the complexing role of organic acids, *TRENDS Plant Sci.* 6: 272-278
- Franchini I., Mutti A., Cavatorta A., Corradi A., Cosi A., Olivetti G., Borghetti A., 1978. Nephrotoxicity of chromium. Remarks on an experimental and epidemiological investigation. *Contrib Nephrol.* 10:98-110
- García García J. D., 2008, Mecanismos de resistencia y acumulación de cromo en el protista *Euglena gracilis*, Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Bioquímicas), Facultad de Química. UNAM.

- García-García J. D., Rodríguez-Zavala J. S., Jasso-Chávez R., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R., 2009. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 191: 431-440.
- Gardea-Torresdey J. L., De la Rosa G., Peralta-Videa J. R., Montes M., Cruz-Jiménez G., Cano-Aguilera I., 2005. Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 48: 225–232.
- González C. F., Ackerley D. F., Lynch S. V., Matin A. 2005. ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 280:22590-22599
- Gourdon P., Baucher M.F., Lindley N.D., Guyonvarch A., 2000. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:2981-7.
- Graniel C. E., Carrillo C. M. E., 2006. Calidad del agua del río Zanatenco en el estado de Chiapas. *Ingeniería Revista Académica.*10: 35-42
- Greenblatt C.L, Schiff J.A., 1959. A pheophytin-like pigment in dark-adapted *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 6:23-28.
- Guzmán García X., Martínez López A., Rodríguez Medina L, González Márquez H., Vázquez Botello A., 2007. Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea Virginica* por exposición y depuración al cadmio. *Hidrobiol.* 17:41-48
- Hargreaves J.W., Lloyd E.J.H., Witton B.A., 1975. Chemistry and vegetation of highly acidic streams. *Freshwat. Biol.* 5:563-576.
- Haydon J. M., Cobett S C. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *Research Review New Phytol.* 174: 499–506
- International Plant Nutrition Institute. Requerimientos Nutricionales de los cultivos. Disponible:[http://www.ipni.net/ppiweb/ltams.nsf/\\$webindex/C7CAE45A06EC30D803256B22006C3F4D](http://www.ipni.net/ppiweb/ltams.nsf/$webindex/C7CAE45A06EC30D803256B22006C3F4D)
- Jasso-Chávez R., Torres Márquez M. E., Moreno-Sánchez R., 2001. The membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 390: 295-303.
- Jasso-Chavez R., Moreno-Sánchez R., 2003. Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *J Europ Biochem* 270; 4942-4951.
- Jasso-Chávez R., Pacheco-Rosales A., Lira-Silva E., Gallardo-Pérez, J. C., García, N., Moreno-Sánchez R. 2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat. Toxicol.* 100 :329–338
- Kinraide T. B., Parker D. R., Zobel R. W., 2005. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *J. Exp. Bot.* 56:1853-1865
- Ledezma V. P. A., 2006. Actividad Genotóxica de afloramientos externos del confinamiento de residuos de cromo de “Cromatos de México” en Lechería, Edo. de México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM

- Lemire J., Kumar P., Mailloux R., Cossar K., Appanna V.D., 2008. Metabolic adaptation and oxaloacetate homeostasis in *P. fluorescens* exposed to aluminum toxicity. *J Basic Microbiol* 48:252-9.
- Manzanares Acuña E., Vega Carrillo H. R., Escobar León M. C., Letechipía de León C, Guzmán Enríquez L. J., Hernández Dávila V. M., Salas Luévano M. Á.. 2005. Evaluación de Riesgos ambientales por plomo en la población de Vetagrande, Zacatecas, Unidad Académica De Estudios Nucleares, UAZ. UaEN/RI-02-PbVG/INE-02/03081204
- McLaughlin M.J., Singh B.R. 1999. Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers. *Dordrecht, The Netherlands*.
- McLean J., Beveridge T.J., 2001. Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl Environ Microbiol.* 67; 1076-1084.
- Melo Sánchez F.M, Márquez Estrada C., Juárez Juárez M., Martínez Martínez F.J., Miranda Reyes P., Esquivel Ruiz L.F, Juárez Juárez M., 2000. Análisis de metales pesados en las aguas residuales del río San Javier y repercusión en la salud e impacto ambiental. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; en:<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/mexicon/R-0057.pdf>
- Mendoza Cózatl D. G.,2000. Distribución Intracelular del cadmio en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones fotoheterotróficas. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus Iztacala.
- Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R. 2005. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Bioch Biophysic* 1706; 88-97.
- Mendoza-Cózatl D., Rangel-González E, Moreno-Sánchez R. 2006a. Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch Environ Contamin Toxicol.* 51; 521-528.
- Mendoza-Cózatl D., Rodríguez-Zavala J.S., Rodríguez-Enríquez S., Mendoza-Hernández G., Briones-Gallardo R., Moreno-Sánchez R., 2006b. Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complex of *Euglena gracilis*. *J FEBS* 273; 5703-5713.
- Merino B., 2008. Cromatos de México o la historia de un conflicto surgido de la ignorancia. *El principio del fin de Cromatos de México*. (Planeta Azul): <http://www.planetaazul.com.mx/www/2008/07/28/cromatos-de-mexico-o-la-historia-de-un-conflicto-surgido-de-la-ignorancia/>
- Mertz W., 1992. Chromium in Human Nutrition: American Institute of Nutrition pp.626-633
- Metcalf y Eddy, 1991. Wastwater Engineering. Treatment disposal and reuse. George Tchobanoglous and Frank Burton (Editores). Mc Graw Hill. Inc. Singapore. pp 600
- Navarro Aviño J.P., Aguilar Alonso I., López Moya J.R., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16:10-25.
- Norma Mexicana. NMX-FF-001-SCFI-2009. Productos de la pesca y la acuicultura-ostión en concha vivo (Litoral Pacífico).
- Norma Mexicana. NMX-FF-115-SCFI-2010, productos agrícolas destinados para consumo humano-flor (cáliz) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).

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

Norma Oficial Mexicana NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados.

Norma Oficial Mexicana. NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales

Norma Oficial Mexicana. NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental.- lodos y biosólidos.-especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.

Norma Oficial Mexicana. NOM-004-ZOO-1994, Control de residuos tóxicos en carne.

Norma Oficial Mexicana. NOM-027-SSA1-1993, bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados.

Norma Oficial Mexicana. NOM-031-SSA1-1993, bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

Norma Oficial Mexicana. NOM-066-ECOL-1994, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la galvanoplastia.

Norma Oficial Mexicana. NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Norma Oficial Mexicana. NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

Norma Oficial Mexicana. NOM-CCA-001-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las centrales termoeléctricas convencionales

Ohtake H., Cervantes C., Silver S., 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J Bacteriol.* 169; 3853-6.

Páez-Osuna F., 1999a. La Contaminación y polución costera. *Ciencia y Desarrollo XXV*, 144:60-65.

Páez-Osuna F. 1999b. Contaminación por metales en las Costas de México. *Ciencia y Desarrollo XXV*, 146: 69-73.

Páez-Osuna F., Ruiz-Fernández A.C., Botello A.V., Ponce-Vélez G., Osuna-López J.I., Frías-Espericueta M.G., López-López G., Zazueta-Padilla H.M. 2002. Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total Pasha in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. *Mar pollut bull.* 44:1303-1308.

- Palacios Fest M.R., Park E.L., González Porta J., Palacios Fest M.R., Dix R.G., 2003. Química de conchas de ostrácodos: una alternativa para medir la contaminación por metales en sistemas acuáticos. *Rev Mex Cien Geol.* 20:139-153.
- Panda S.K., Choudhury, S., 2005. Chromium stress in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 95–102.
- Pandey V, Dixit V, Shyam R., 2009. Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. *Protoplasm* 236; 85-95.
- Park C.H., Keyhan M., Wielinga B., Fendorf S., Matin A., 2000. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl Environ Microbiol.* 66; 1788-1795.
- Peralta J.R., Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gómez E., Arteaga S., Rascón E., 2001. Uptake and effect of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*). *Bull Environ Contam Toxicol.* 66:727–734
- Pérez O. Ma. A., García M. R., Vázquez A. A., Colinas L.T., Pérez G. M. y Navarro G. H., 2008. Concentration of Pb, Cd, Ni, and Zn in polluted soils and their transference to *Broccoli Heads Sustentabilidad de la agricultura en la región pampeana* 26:20216
- Prieto García F., Prieto Méndez J., Callejas Hernández J.; Román Gutiérrez A. D., Méndez Marzo M. A., 2010. Bioacumulación de arsénico en las etapas de desarrollo de la cebada maltera (*Hordeum distichon L.*), *Agric. Téc. Méx.*, 1:37-44
- Prieto Méndez J., González Ramírez C. A., Roman Gutiérrez A. D., Prieto García F., 2009. Contaminación y Fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Trop Subtrop Agroecosys* 10:29-44
- Puzon GJ, Roberts AG, Kramer DM, Xun L. 2005. Formation of soluble organochromium(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics. *Environ Science Techno* 39:2811-2817.
- Ramírez A, 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la facultad de medicina UNMSN* 63: 51-64
- Ramos B., R., L. Cajuste, D. Flores y García N., 2001. Metales pesados, sales y sodio en suelos de chinampa en México. *Agrociencia* 35: 385-395.
- Rehman A., Shakoori A.R., 2001. Heavy metal resistance *Chlorella* spp., isolated from tannery effluents, and their role in remediation of hexavalent chromium in industrial waste water. *Bulletin Environ Contaminat Toxicol.* 66: 542–547.
- Reilly Conor, 2002 Metal contamination of food. Its significance for Food Quality and Human Health. 3 Edition, BlackWell Science, Australia
- Remoundaki E., Hatzikioseyan A., Tsezos M., 2007. A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for treatment of chromium-containing waste water. *J Chem Technol Biotechnol.* 82:802-808.
- Rodríguez-Serrano M., Martínez-de la Casa N., Romero-Puertas M.C., del Río L.A., Sandalio, L.M., 2008. Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas* 17(3):139-146.



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. Toxicol Hazard Substan Environ Engineer* 42; 1365-78.

Rodríguez-Zavala J.S., Cruz-Ortiz M.A., and Moreno-Sánchez R., 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53:36-42.

Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Moreno-Sánchez, R. 2010. Increase synthesis of alpha-tocopherol, paramylon and tyrosine by *E. gracilis* under conditions of high biomass production. *J. Appl. Microbiol.*109: 2160-2172 .

Ryan PR, Delhaize E, Jones DL. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev in Plant Physiol Plant Molec Biol* 52:527–60.

Santos S. E., Yarto R. M., Gavilán García I. Castro Díaz J., Gavilán García A., Rosiles R., Suárez S., López Villegas T., 2006. Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, Mexico. *J Mex Chem Societ* 50:57-63

Schiavon M., Pilon-Smits E. A.H., Wirtz M., Rüdiger Hell, Malagoli M., 2008. Interactions between Chromium and Sulfur Metabolism in *Brassica juncea*, *J. Environ. Qual.* 37:1536-1545

Scoccianti V, Crinelli R, Tirillini B, Mancinelli V, Speranza A. 2006. Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere* 64; 1695–1703.

Scoccianti V., Iacobucci M., Paoletti M.F., Fraternali A., Speranza A.. 2008. Species-dependent chromium accumulation, lipid peroxidation, and glutathione levels in germinating kiwifruit pollen under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Chemosphere* 73:1042-1048.

Shakoori A.R., Makhdoom M., Haq RU., 2000. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 348-51.

Sharma, D.C., Sharma, C.P., Tripathi, R.D., 2003. Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere* 51:63–68

Singh R., Mailloux R.J., Puisseux-Dao S., Appanna V.D., 2007. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 189: 6665-6675

Sobrinho Figueroa A., Cáceres Martínez C., Rosas Cedillo R., 2007. Evaluación del riego por consumir moluscos contaminados con cadmio, cromo y plomo. *Hidrobiol*, 17:48-58.

Stearns D.M., Courtney K.D., Giangrande P.H., Phieffer L.S., Wetterhahn K.E., 1994. Chromium(VI) reduction by ascorbate: role of reactive intermediates in DNA damage *in vitro*. *Environ Health Perspect* 3:21-25.

Sudhakar G., Jyothi B., Venkateswarlu V., 1991. Metal pollution and its impact on algae in flowing waters in India. *Archives Environ Contam Toxicol* 21:556-66.

Tashiro M., Furihata K., Fujimoto T., Machinami T., Yoshimura E., 2007. Characterization of the malate-aluminum(III) complex using <sup>1</sup>H and <sup>27</sup>Al NMR spectroscopy. *Magnet Resonan Chem* 45; 518-21.

Vázquez-Sauceda M.L., Aguirre-Guzmán G., Sánchez-Martínez G., Pérez-Castañeda R., Rábago Castro J., 2006 Contenido de metales pesados en agua, sedimentos y

ostiones de la Laguna de San Andrés, en Tamaulipas, México. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia.-UAT.

Vidal Álvarez M., 2009. Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo ( $Pb^{2+}$ ), en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia minima*, Trabajo de grado (Maestra en Ciencias), Instituto de Ecología, A.C.

Volke Sepúlveda T., Velasco J.A., 2002, Tecnologías de remediación para suelos contaminados, *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*, México, 64 pp

Wang P.C., Mori T., Toda K., Ohtake H., 1990. Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J Bacteriol* 172:1670-1672.

Yadav SK, Dhote M, Kumar P, Sharma J, Chakrabarti T, Juwarkar AA., 2010. Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *J Hazard Material* 180: 609-615.

Yewalkar S.N., Dhumal K.N., Sainis J.K. 2007. Chromium (VI)-reducing *Chlorella spp.* isolated from disposal sites of paper-pulp and electroplating industry. *J Appl Phycol* 19: 459–465.

Ying Dong X., Fang Shen R., Fu Chen R., Liang Zhu Z., Feng Ma J., 2008. Secretion of malate and citrate from roots is related to high Al-resistance in *Lespedeza bicolor*. *Plant Soil* 306:139–147

Yuann J.M., Liu K.J., Hamilton J.W., Wetterhahn K.E., 1999. *In vivo* effects of ascorbate and glutathione on the uptake of chromium, formation of chromium(V), chromium-DNA binding and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver and kidney of osteogenic disorder shionogi rats following treatment with chromium(VI). *Carcinogen* 20: 1267-1275.

Zayed A., Terry N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* 249: 139–156.

Zecua Lechuga D. A., 2007. Estudio Toxicológico de Pb, Cr y Cd para evaluar riesgos en la salud de una población, Trabajo de grado (Química Farmacéutica Biológica), Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec.