



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Mecanismos de resistencia y acumulación de níquel en
Euglena gracilis fotosintética.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KARLA ADRIANA PEÑA SANABRIA



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JORGE DONATO GARCÍA GARCÍA

Ciudad Universitaria, Cd.Mx.

2017



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.

AGRADECIMIENTOS

Tutor

Dr. Jorge Donato García García

Jurado

Dr. Rodolfo Omar Arellano Aguilar

Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco

Dra. Luz María Lazcano Arriola

M. en C. Elizabeth Hernández Álvarez

Departamento de Bioquímica del INC

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Dra. Emma Saavedra Silva

Dra. Sara Rodríguez

Biol. Rosina Sánchez Thomas

Agradezco el apoyo, las sugerencias y las críticas constructivas que cada uno de ustedes me brindó en su debido momento; ya sea tanto en la realización de la fase experimental de este proyecto como en la elaboración y redacción de esta tesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. ANTECEDENTES	4
I. Los metales pesados. El níquel y sus usos.....	4
II. El níquel como contaminante en cuerpos de agua.....	5
III. Toxicidad del níquel.....	7
IV. Mecanismos de resistencia de níquel en diversos organismos.....	7
A. Generalidades.....	7
B. Mecanismos de resistencia de níquel en microorganismos.....	8
C. Plantas hiperacumuladoras de níquel y sus mecanismos de resistencia.....	9
V. <i>Euglena gracilis</i> como organismo de estudio.....	11
VI. Mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en <i>E. gracilis</i>	12
VII. Antecedentes de <i>E. gracilis</i> expuesta a níquel.....	13
5. HIPÓTESIS	14
6. OBJETIVOS	14
❖ General	14
❖ Particulares	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
I. Cultivo de <i>E. gracilis</i> fotosintética.....	15
II. Conteo celular y determinación de viabilidad	15
III. Medición de níquel.....	16
IV. Protocolo de exposición de <i>E. gracilis</i> al níquel en condición de alta densidad.....	16
V. Medición del consumo de oxígeno y fotosíntesis	17
VI. Determinación de contenido de clorofila	18
VII. Determinación de peso seco.....	18
VIII. Determinación de tioles	18

8. RESULTADOS	19
I. Exposición de <i>E. gracilis</i> a níquel en medio Hutner	19
A. <i>Susceptibilidad al níquel: Curva de crecimiento e IC₅₀ de crecimiento</i>	20
B. <i>Acumulación de níquel</i>	21
II. Exposición a bajo el Protocolo de alta densidad	22
A. <i>Susceptibilidad al níquel: Consumo de oxígeno, fotosíntesis y contenido de clorofila</i>	22
B. <i>Acumulación de níquel</i>	23
a. <i>Cursos temporales</i>	23
b. <i>Adsorción</i>	25
c. <i>Dosis-Respuesta de níquel</i>	26
d. <i>Efecto de diferentes cationes divalentes en la acumulación de níquel</i>	26
e. <i>Peso seco</i>	29
f. <i>Tioles</i>	29
9. DISCUSIÓN	31
10. CONCLUSIONES	35
11. PERSPECTIVAS	35
12. APORTE CIENTÍFICO Y ECOLÓGICO	36
13. MATERIAL SUPLEMENTARIO	37
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Abreviaturas

BSO	Butionina sulfoximina
Cys	Cisteína
DTNB	Di-tio-bis (ácido-2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EGTA	Ácido tetra-acético etilenglicol
γ -EC	Gamma-glutamil cisteína
GCL	Cisteína-glutamato Ligasa
GSH	Glutación
GR	Glutación reductasa
GS	Glutación sintetasa
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % de crecimiento
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio
KOH	Hidróxido de Potasio
OAS	O-acetilserina
OAS-TL	O-acetilserina tiol liasa
PCA	Ácido perclórico
PC	Fitoquelatina
PCS	Fitoquelatina sintasa
Poly-GSH	Polímeros de GSH (incluidas las fitoquelatinas)
Poly-P	Polifosfato
SAT	Serina acetiltransferasa
TFA	Ácido trifluoroacético

1. RESUMEN

El níquel (Ni) forma parte de un grupo de metales que a altas concentraciones resultan tóxicos para muchas formas de vida; su uso antropogénico lo ha catalogado como un contaminante más de los cuerpos de agua, comprometiendo la salud de los seres vivos, incluyendo la del propio ser humano.

En la naturaleza existen organismos capaces de resistir concentraciones altas de diversos contaminantes. El protista fotosintético *Euglena gracilis* se ha encontrado en cuerpos de agua provenientes del drenaje ácido de minas y ríos contaminados. Actualmente se sabe que *E. gracilis* es resistente a una variedad de metales pesados, entre ellos el Ni. Asimismo se ha reportado que este protista puede remover con alta eficiencia metales pesados como Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} por medio mecanismos de adsorción, quelación extracelular, biotransformación y acumulación (quelación intracelular y compartimentación); sin embargo, en este microorganismo fotosintético no se ha caracterizado la capacidad para remover Ni. El presente trabajo se enfocó en determinar la susceptibilidad y la capacidad de acumulación de en *E. gracilis*, bajo la hipótesis de que el Ni puede usar transportadores de metales esenciales divalentes para entrar a la célula y que el protista podría inactivar al Ni a través del mecanismo de quelación intracelular con metabolitos con grupos tiol que forman parte de la vía de síntesis del GSH.

Los resultados muestran que *E. gracilis* es capaz de resistir altas concentraciones de Ni durante 8 días en medio Hutner; sin embargo, su crecimiento se ve afectado por arriba de $500 \mu\text{M Ni}^{2+}$, siendo la IC_{50} de crecimiento de $426 \mu\text{M Ni}^{2+}$. El uso de un protocolo de alta densidad celular y agitación constante permitió observar que *E. gracilis* es capaz de acumular $<1000 \text{ mg Ni/Kg}^{-1} \text{ DW}$ en condiciones ácidas ($\text{pH}=3$) y en ausencia de cationes divalentes en el medio. Mediante este protocolo también se pudo determinar que el Mg^{2+} y Cu^{2+} afectan la acumulación de Ni a concentraciones sub-milimolares. La máxima capacidad de acumulación de Ni se alcanzó a las 24 horas posteriores a la exposición del metal. Y en estas condiciones se observó que el consumo de oxígeno disminuyó un 50% con $500 \mu\text{M Ni}^{2+}$ y alrededor de un 85% con $1000 \mu\text{M Ni}^{2+}$; además la fotosíntesis disminuyó un 80% con $500 \mu\text{M Ni}^{2+}$ y 90 % con $1000 \mu\text{M Ni}^{2+}$. Interesantemente, en los cursos temporales se observó que el contenido de Ni previamente acumulado disminuyó gradualmente en las células expuestas a 500 y $1000 \mu\text{M Ni}^{2+}$ pasadas las 24 horas, de manera que a las 72 horas el contenido de metal intracelular disminuyó un 80% con 500 Ni^{2+} y un 90% con 1000 Ni^{2+} respecto al acumulado a las 24 horas. En este último tiempo del curso temporal, se observó también una disminución en el contenido de los tioles Cys, $\gamma\text{-EC}$ y GSH; por lo que en la sección de discusión de la presente tesis se analiza el papel que juega el metabolismo del GSH como mecanismo de resistencia y acumulación en *E. gracilis*.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio ambiente con metales pesados es un problema que ha ido en aumento como resultado de las actividades antropogénicas (Cobbina, Duwiejuah, Quansah, Obiri, & Bakobie, 2015) como es su uso indiscriminado en varias aplicaciones industriales, agrícolas, domésticas y tecnológicas (Bradl, 2005) así como del mal manejo de los desechos de estas aplicaciones (Komilis, Bandi, Kakaronis, & Zouppouris, 2011; Smith, 2009).

Esta situación ambiental resulta un problema a nivel mundial, que abarca desde niveles económicos, ecológicos y de salud pública, ya que afecta a los cultivos agrícolas, a la biomasa del suelo y su fertilidad, y contribuye a la bioacumulación de metales en la cadena alimenticia (Gratão, Prasad, Cardoso, Lea, & Azevedo, 2005).

Actualmente, con la finalidad de proteger tanto a la población humana como al medio ambiente en general, se están intentando restaurar los sitios contaminados con metales pesados, removiendo estos metales o disminuyendo la concentración de las especies tóxicas por medio de tecnologías físicas, químicas y biológicas.

Los métodos físicos incluyen procesos de filtración con membranas (nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, etc.) y técnicas de adsorción (Ahmaruzzaman, 2011; Goharshadi & Moghaddam, 2015; Qdais & Moussa, 2004). Mientras tanto, los métodos químicos incluyen a la coagulación o floculación que se llegan a utilizar en combinación con la flotación y la filtración, la precipitación-floculación, la electroflotación, la coagulación electrocinética, y el intercambio iónico entre otros. (Belkacem, Khodir, & Abdelkrim, 2008; Charerntanyarak, 1999; Dąbrowski, Hubicki, Podkościelny, & Robens, 2004; El Samrani, Lartiges, & Villiéras, 2008; Ölmez, 2009; Shim *et al.*, 2014). Sin embargo, los métodos fisicoquímicos suelen ser costosos y muchas veces llegan a producir lodos concentrados con partículas grandes, generándose de esta manera una contaminación secundaria con los subproductos del tratamiento de los sitios contaminados iniciales (Ahmaruzzaman, 2011; Singh & Agrawal, 2008). Los métodos biológicos, por otro lado, normalmente suelen ser una alternativa de bajo costo y más amigable con el ambiente (Ahmaruzzaman, 2011; Fu & Wang, 2011).

Una de las alternativas biológicas que se ha propuesto para este problema es la biorremediación y consiste en emplear sistemas biológicos naturales o mejorados genéticamente para degradar, transformar o eliminar sustancias peligrosas presentes en suelos, agua y aire. Los métodos de biorremediación son comúnmente aplicados a tratamientos de efluentes industriales, porque muchos microorganismos como las bacterias, levaduras, algas y hongos son capaces de acumular diferentes contaminantes (Ahmaruzzaman, 2011).

El protista fotosintético *E. gracilis* posee la capacidad de resistir altas concentraciones de metales pesados como el Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} y metales esenciales como Zn^{2+} y el Cu^{2+} y actualmente ya han sido caracterizados algunos de los principales mecanismos de remoción de estos metales (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007). Así también, se ha documentado que este protista puede resistir Ni^{2+} (Ahmed & Häder, 2010) sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito su capacidad de remoción, ni ningún mecanismo asociado a la resistencia de este metal pesado.

En el presente trabajo buscamos determinar si *E. gracilis* es capaz de acumular Ni^{2+} y si esto sucede, cuál es su principal mecanismo de acumulación.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la biorremediación se posiciona como una alternativa económica y ecológicamente viable para la restauración de sitios contaminados con metales pesados, toma relevancia la búsqueda, estudio y la caracterización de los organismos que sean capaces de resistir y acumular metales pesados. De manera que, al dar a conocer esta información y junto con el apoyo de la ingeniería genética, se logren optimizar las técnicas de bioremoción de este tipo de contaminantes ambientales. En este sentido, esta tesis busca aportar conocimiento sobre el organismo de estudio *E. gracilis*, acerca de su resistencia y acumulación de Ni.

4. ANTECEDENTES

I. Los metales pesados. El Níquel y sus usos.

El término *metales pesados* hace referencia a una clasificación de los metales con una densidad en el rango de 3.5-5 mg/cm^3 , lo cual es controversial porque incluye a metales, semimetales (metaloides) o radionúclidos que muchas veces no comparten alguna otra característica fisicoquímica. A pesar de tener una amplia definición química, se considera a los metales pesados como contaminantes inorgánicos peligrosos por la toxicidad que generan en los sistemas biológicos a concentraciones relativamente bajas, además de su persistencia en el medio ambiente, por lo que bajo esta definición se pueden considerar metales pesados a: Ag, Al, Am, As, Au, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, La, Mg, Mn, Ni, Pb, Pd, Pt, Ra, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sn, Tc, Te, Th, Ti, U, W, Y y Zn (Bhat & Khan, 2011).

El Ni existe como un elemento natural en nuestro planeta; ocupando el 24° lugar como elemento más abundante la corteza terrestre (ATSDR, 2015). Los minerales que se utilizan como fuentes de Ni, aparecen en tres formas: sulfuros, silicatos y minerales de hierro niquelífero. Existen alrededor de ocho minerales de Ni, pero las más comunes son la garnierita y la pentlandita. El Ni es usado principalmente en su forma metálica y combinado con otros metales y no metales como aleaciones (WHO, 2005). Tiene una gran demanda en la industria debido a

que proporciona a las aleaciones dureza, tenacidad y ligereza, así como cualidades anticorrosivas, eléctricas y térmicas. Uno de los principales usos que se le da a este metal es la creación de acero inoxidable para producir herramientas, maquinaria, armamento, y electrodomésticos. El Ni también se utiliza en la galvanoplastia, la electroformación, para la producción de monedas, joyería y prótesis médicas y en menor proporción para la producción de baterías de Ni-Cd como catalizador, en pigmentos y en fertilizantes de fosfato (Emsley, 2011; Garrett, 2000). En la Fig.1 se resumen los principales usos del Ni en porcentajes.

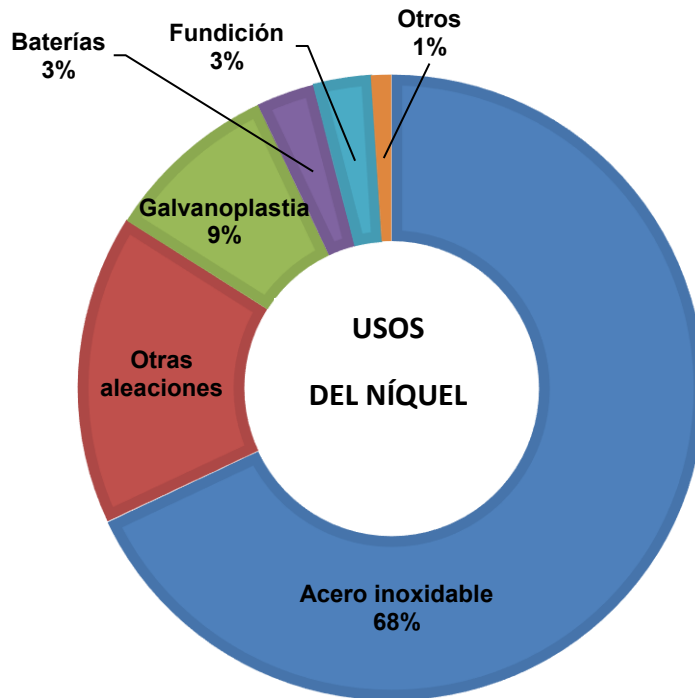


Fig.1. Principales usos del níquel.
Modificado de: International Nickel Study Group (www.insg.org)

II. El níquel como contaminante en cuerpos de agua.

La producción y procesamiento del Ni y sus derivados, el reciclaje de productos que contienen Ni, la eliminación de residuos con Ni (como las baterías Ni-Cd) en depósitos de basura y cuerpos de agua (Fan, Shu, Yang, & Chen, 2006; Garrett, 2000; Huang, Li, & Xu, 2010) así como también la aplicación irracional de fertilizantes minerales que contienen este metal, ocasionan que el Ni se convierta en un contaminante del medio ambiente. La actividad de industrias como la minería, la refinación de minerales de Ni, la industria galvanoplástica y la producción de baterías Ni-Cd son las fuentes principales de contaminación por Ni y en menor extensión lo son los procesos naturales (Sinha & Pandey, 2003).

En el agua los niveles naturales de Ni son relativamente bajos; en aguas oceánicas el Ni se encuentra en un rango de 0.228- 0.693 µg/L (concentración equivalente a $2.3-7 \times 10^{-4}$ ppm y $4-12 \times 10^{-9}$ mM), mientras que en cuerpos de agua dulce generalmente se encuentra en concentraciones menores a 2 µg/L (2×10^{-3} ppm/ 3.4×10^{-5} mM) (WHO, 2005). Sin embargo, la deposición húmeda y seca del Ni atmosférico, la escorrentía superficial de residuos industriales, municipales y agrícolas, así como la lixiviación directa de las rocas y los sedimentos puede producir concentraciones significativas de Ni en el agua, en donde está presente tanto en formas disueltas como en forma de partículas insolubles en suspensión (Denkhaus & Salnikow, 2002; Hertel *et al.*, 1991; Sinha & Pandey, 2003).

En la Tabla. 1 se muestran cuatro cuerpos de agua, con las concentraciones de Ni que fueron determinadas en ppm. Si se comparan los valores de Ni que se detectaron en los cuerpos de agua mexicanos con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, y que para este metal el límite es de 2 ppm) es posible observar que los tres cuerpos de agua de México cumplen con dicha norma, aparentemente no existe un problema ambiental en estos ríos en cuanto a las concentraciones de Ni que poseen. En el último ejemplo de la Tabla 1, el Río Luján en Argentina, los autores que realizaron las mediciones concluyen que el valor de 0.260 ppm se encuentra por encima de los lineamientos argentinos establecidos en aguas superficiales para la protección de la vida acuática. Dicho límite máximo de Ni permitido en Argentina es 0.02-0.06 ppm (Castañé, Sánchez-Caro, & Salibián, 2015). Por consiguiente, los 3 Ríos mexicanos que se muestran en la Tabla 1 estarían por encima de dicho límite argentino, lo cual nos hace pensar que la normatividad mexicana es bastante laxa respecto al Ni y que las concentraciones en las que este metal se encuentra en algunos cuerpos de agua sí resultan ser contaminantes.

Tabla 1. Concentraciones de Ni como contaminante de cuerpos de agua contaminados en México y Argentina.

Cuerpo de agua	Concentración de Ni ²⁺ (ppm)
Río Agua Prieta (Sonora, México).	0.2-1.16 (Villalba Atondo <i>et al.</i> , 2013)
Laguna de las ilusiones (Villa Hermosa, México).	0.1 (Gamboa-Rodríguez <i>et al.</i> , 2012)
Laguna San Andrés (Tamaulipas, México).	1.8 (Vazquez, 1993)
Río Luján (Buenos Aires, Argentina).	0.018-0.260 (Castañé <i>et al.</i> , 2015)

III. Toxicidad del níquel.

El Ni es un metal esencial para algunas especies de microorganismos, plantas e inclusive para animales a concentraciones traza (Bartha & Ordal, 1965; Das, Das, & Dhundasi, 2008; Denkhaus & Salnikow, 2002; Fabiano, Tezotto, Favarin, Polacco, & Mazzafera, 2015; Macomber & Hausinger, 2011). No obstante, dependiendo de las cantidades de Ni que se absorben en los organismos pueden llegarse a presentar síntomas de toxicidad.

En ensayos *in vitro* se ha reportado la inhibición de la actividad de metaloenzimas de diversos microorganismos que poseen cofactores de Fe, Zn, Cu, Co por Ni, así como la inhibición de otras enzimas no metálicas que poseen residuos catalíticos de cisteína o histidina (Macomber & Hausinger, 2011).

En diferentes especies de plantas, el Ni es capaz de inhibir enzimas del ciclo de Calvin (Bassham, Benson & Calvin, 1950) de la vía de biosíntesis de clorofila (Assche & Clijsters, 1990), así como también de desencadenar daños por estrés oxidativo (Baccouch, Chaoui, & Ferjani, 1998).

En seres humanos, el efecto adverso más común es una reacción alérgica de la piel en aquellos que son sensibles al Ni (Das *et al.*, 2008). Excediendo niveles críticos, el Ni puede provocar problemas pulmonares y renales graves, además de malestares gastrointestinales (Borba, Guirardello, Silva, Veit, & Tavares, 2006). La acumulación de Ni en el cuerpo a través de la exposición crónica puede desencadenar el desarrollo de fibrosis pulmonar, enfermedades cardiovasculares y renales e incluso inducir una actividad cancerígena (Kasprzak, Sunderman, & Salnikow, 2003).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012) con base en estudios con animales de laboratorio y con datos de trabajadores expuestos a Ni, ha clasificado a todos los compuestos de Ni como carcinógenos humanos y al Ni metálico como posible carcinógeno.

Los mecanismos de daño por Ni en los seres humanos implican reacciones de oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Recientemente se ha demostrado que este metal puede llegar a ocasionar efectos en la reparación de ADN, así como también en la metilación de histonas, resultando en el último caso ser un daño epigenético (Macomber & Hausinger, 2011).

IV. Mecanismos de resistencia de níquel en diversos organismos

A. Generalidades.

La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en ecosistemas naturales, en adición a su toxicidad potencial, ha conducido durante la evolución de la vida al desarrollo de la homeostasis de metales pesados. Este fenómeno se debe a un proceso

de adaptación al medio, debido al desarrollo o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula. Dentro de la amplia diversidad biológica, existen organismos resistentes y organismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos específicos de desintoxicación codificados genéticamente, los cuales pueden ser constitutivos o inducidos por la presencia del metal; mientras que los tolerantes se protegen con defensas generales no específicas. Tanto los organismos resistentes como los tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados ó como biomonitores de concentraciones tóxicas, respectivamente (Gutiérrez, Martín-González, Díaz, & Ortega, 2003; Marrero-Coto, Díaz-Valdivia, & Coto-Pérez, 2010).

Dentro de los mecanismos de resistencia para contrarrestar los efectos nocivos de los metales tóxicos, se encuentran los siguientes: a) la acumulación intracelular mediante la unión de los metales a moléculas que neutralizan su toxicidad, b) la precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancias excretadas, c) la unión de los cationes metálicos en las membranas o paredes celulares, d) las transformaciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos tóxicas y e) los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones (Cervantes *et al.*, 2006; Vargas, Álvarez, & Cervantes, 1998).

B. Mecanismos de resistencia de níquel en microorganismos.

De acuerdo a un análisis genómico comparativo, el mecanismo más extendido para la acumulación de Ni en las eubacterias y arqueas utiliza un sistema de casete de unión a ATP (sistema ABC), tales como NikABCDE, mientras que el mecanismo más común en eucariotas (también distribuido ampliamente en las bacterias) implica miembros de la familia de transportadores de Ni/Co (Nicot). Además, los transportadores no específicos de Ni son utilizados por algunos microorganismos para facilitar la transferencia del metal a través de la membrana citoplasmática (Zhang, Rodionov, Gelfand, & Gladyshev, 2009). De esta manera, en bacterias Gram negativas, arqueas e inclusive en organismos eucariontes como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, los cationes metálicos: Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , se acumulan rápida e inespecíficamente a través del sistema de captura de magnesio CorA, conocido como sistema de transporte inorgánico de iones metálicos (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

El transporte de metales pesados por transportadores de Mg^{2+} se ha demostrado tanto para *S. cerevisiae* como para *S. pombe*. De manera que, se ha reportado la inhibición del transporte de Ni causada por magnesio principalmente, seguido de los metales: Zn, Mn y Ca, en vacuolas de *S. cerevisiae* (Nishimura, Igarashi, & Kakinuma, 1998). De forma similar, se ha reportado que

el exceso de Mg^{2+} en el medio, disminuye 20 veces la acumulación de Ni^{2+} en *S.pombe* (Eitinger, Degen, Bohnke, & Muller, 2000).

Joho *et al.* (1995) aislaron una cepa mutante de *S. cerevisiae* resistente a Ni y observaron que más del 70% de los iones de Ni internalizados estaban distribuidos en las fracciones vacuolares; lo que sugiere un papel importante de este orgánulo como compartimiento desintoxicante. Así también, demostraron que las vacuolas de estas levaduras resistentes a Ni, contenían grandes cantidades del aminoácido histidina (His); por lo cual los autores sugirieron una posible formación de complejos de iones de His-Ni en el secuestro de Ni al interior de las vacuolas.

En bacterias, existen otros mecanismos de acumulación de Ni descritos; por ejemplo *Pseudomonas putida* S4 acumula Ni en su periplasma, posiblemente acompañado con una proteína de 18 kDa (Tripathi & Srivastava, 2006). Por el contrario, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* acumula Ni intracelular que, según análisis de rayos X de energía dispersiva, se encuentra en forma de Ni metálico, lo cual además sugiere la actividad de un mecanismo oxidoreductor (Sar, Kazy, & Singh, 2001).

Otra respuesta bacteriana común frente a concentraciones elevadas de un metal tóxico es sintetizar un sistema de expulsión específico, reduciendo así la concentración interna del metal. Las bombas expulsoras de Ni mejor caracterizadas son las de organismos que exhiben hiperresistencia a este metal, normalmente aislados de suelos ricos en Ni; ya sean contaminados o de origen natural; como por ejemplo las bacterias *Cupriavidus metallidurans* y *Alcaligenes xylooxidans* que han sido obtenidas de sitios contaminados de Ni (Grass, Große, & Nies, 2000; Schmidt & Schlegel, 1994). No obstante, también existen bombas expulsoras de Ni presentes en bacterias no extremófilas, como es el caso de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori* (Macomber & Hausinger, 2011). Por ejemplo, la bomba de eflujo RcnA se identificó por primera vez en *E. coli* y expulsa tanto Ni como Co afuera del citoplasma; existen homólogos putativos de esta bomba expulsora de Ni en alfa, beta, y gamma proteobacterias, cianobacterias y arqueas (Rodríguez, Effantin, & Mandrand-Berthelot, 2005).

Finalmente, otro mecanismo de resistencia a Ni menos frecuente en la naturaleza es la reducción de Ni^{2+} al Ni elemental (Ni^0), lo cual se ha observado en la bacteria *Thiocapsa roseopersicina* cuando se crece en gas hidrógeno, mecanismo vinculado a una mayor tolerancia de Ni (Zadvornyy *et al.*, 2010). En plantas, algas y protistas, la reducción de Ni^{2+} a Ni^0 está poco documentada.

C. Plantas hiperacumuladoras de níquel y sus mecanismos de resistencia.

En 1948 Minguzzi y Vergnano, dos botánicos italianos, descubrieron plantas que acumulaban Ni; ellos observaron que las plantas de la especie *Alyssum bertolonii* crecían en suelos ultramáficos enriquecidos con Ni (suelos serpentinos) y sus hojas secas contenían ~1%

de Ni, concentración que era de 100 a 1000 veces mayor que en otras plantas que crecían a los alrededores (Freeman *et al.*, 2004). Posteriormente, se determinaron las concentraciones de Ni en más de 2,000 especímenes de herbario (Brooks, Lee, Reeves, & Jaffré, 1977) y basándose en esa información se redefinió el término hiperacumulador, previamente introducido por Jaffré *et al.* (1976), para describir a plantas que contienen >1000 mg/Kg (0.1%) de Ni en hojas secas (Freeman *et al.*, 2004).

Hasta el momento, uno de los mecanismos de resistencia en plantas hiperacumuladoras de Ni descritos en la literatura científica es el que involucra al metabolismo del glutatión (GSH). En la especie hiperacumuladora de Ni *Thlaspi goesingense* la vía de la asimilación de azufre, que engloba a la biosíntesis de cisteína (Cys) y glutatión (GSH), está relacionada con su mecanismo de tolerancia a Ni; se ha reportado en esta especie una alta actividad de la enzima serina acetiltransferasa (SAT) y un aumento en la concentración de su producto O-acetilserina (OAS), acompañadas de una alta actividad de la enzima glutatión reductasa (GR), lo cual mantiene altos los niveles GSH (Freeman *et al.*, 2004). Los autores concluyen que estas características confieren a las plantas una mayor resistencia al estrés oxidativo generado por el Ni.

La sobreexpresión del gen mitocondrial de la SAT de *T. goesingense* mejora la resistencia a Ni²⁺, Co²⁺ y Zn²⁺ en *Arabidopsis thaliana*, la cual muestra una alta concentración de GSH en las hojas y un mejoramiento en la resistencia al estrés oxidativo (Freeman & Salt, 2007). Estos autores también han reportado una correlación positiva entre las concentraciones de OAS, Cys y GSH y la concentración de Ni en tallos de varias especies hiperacumuladoras de Ni y no acumuladoras del género *Thlaspi* y *Arabidopsis*, las cuales fueron altas en las plantas hiperacumuladoras y bajas en las no acumuladoras (Freeman *et al.*, 2004).

Por otra parte, entre las moléculas quelantes de metales, el aminoácido histidina (His) se ha relacionado con el transporte de Ni en las diferentes estructuras celulares de plantas hiperacumuladoras (Kerkeb & Krämer, 2003; Kozhevnikova *et al.*, 2014; Richau *et al.*, 2009). En las especies hiperacumuladoras de Ni del género *Alyssum*: *A. lesbiacum*, *A. murale* y *A. bertolonii* se ha observado un aumento significativo en el contenido de His libre, que es proporcional a la captación de Ni en el xilema de la raíz. En *A. lesbiacum* por ejemplo, la exposición de 300 µM de Ni causó un incremento de 36 veces la concentración de His (Krämer, Cotter-Howells, Charnock, Baker, & Smith, 1996).

Por último, también existen trabajos que sugieren que la nicotianamina (NA) desempeña un papel importante en la desintoxicación de Ni (Vacchina *et al.*, 2003). Así también, se ha reportado una asociación entre varias especies hiperacumuladoras de Ni nativas de Nueva Caledonia con el contenido de los ácidos orgánicos: citrato y malato (Macomber & Hausinger, 2011).

V. *Euglena gracilis* como organismo de estudio.

E. gracilis es un protista flagelado, fotosintético y unicelular de vida libre que habita en afluentes de agua con pH desde 3 hasta 8 y con temperaturas entre 10-35°C, y que resiste los cambios osmóticos que se generan en ríos y lagos. Tiene gran flexibilidad metabólica ya que puede obtener energía de la glucólisis, de la fosforilación oxidativa (mitocondrias), así como también de la fotosíntesis (cloroplastos), utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono, como glucosa, glutamato, malato, lactato, etanol, succinato, etc. (Rodríguez-Zavala, García-García, Ortiz-Cruz, & Moreno-Sánchez, 2007).

Existen trabajos que han reportado a *E. gracilis* como organismo abundante en cuerpos de agua provenientes del drenaje ácido de minas y ríos contaminados (Hargreaves, Lloyd, & Whitton, 1975; Ruiz, Rocchetta, dos Santos Ferreira, & Conforti, 2004).

Por otro lado se ha señalado que *E. gracilis* reúne las características necesarias para estudiar los efectos tóxicos de diferentes compuestos en todos los niveles celulares. Además, es la única especie conocida que puede ser desprovista de cloroplastos sin que esto implique la muerte del organismo, lo que da la posibilidad de estudiar un efecto tóxico bajo distintos tipos de metabolismo (Margulis & Schwartz, 1981).

Así también, distintos estudios muestran que este organismo es susceptible ante contaminantes ambientales externos, como metales tóxicos, moléculas orgánicas y exceso de radiación UV (Ahmed & Häder, 2010).

Por todo lo anterior, *E. gracilis* resulta ser un buen modelo para conocer y estudiar los mecanismos de resistencia que ésta manifiesta ante la presencia de diversos contaminantes en cuerpos de agua, como lo son los metales pesados.

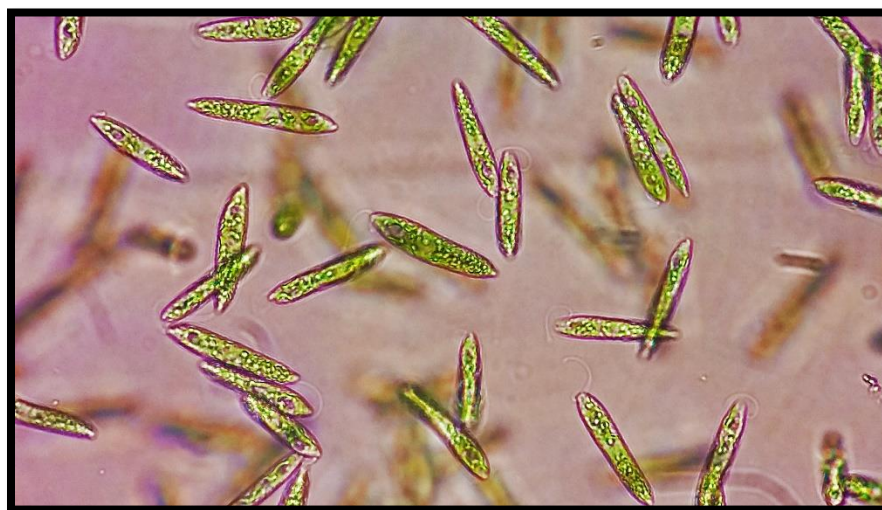


Fig. 2. *Euglena gracilis* observada en microscopio óptico (400x).

Fotografía capturada en el departamento de Bioquímica del INC por Karla Adriana Peña Sanabria.

VI. Mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en *E. gracilis*.

Se ha documentado que *E. gracilis* puede remover con alta eficiencia metales pesados no esenciales como Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , y esenciales como Zn^{2+} y el Cu^{2+} (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

La capacidad de remover metales pesados en *E. gracilis* está asociada a mecanismos de adsorción, quelación extracelular, biotransformación y acumulación (quelación intracelular y compartimentación). En la tabla 2 se resumen los mecanismos de resistencia que se han descrito en este protista con distintos metales (no esenciales y esenciales) y metaloides.

Los mecanismos de resistencia mejor descritos en *E. gracilis*, son los que se han observado en presencia de cadmio. Está demostrado que la vía de la asimilación de azufre (SAP) está relacionada con el mecanismo de resistencia a Cd^{2+} , específicamente la biosíntesis de Cys, GSH y de fitoquelatinas (PCs; polímeros peptídicos derivados del GSH) (García-García *et al.*, 2012; Mendoza-Cózatl, Loza-Tavera, Hernández-Navarro, & Moreno-Sánchez, 2005; Sánchez-Thomas, Moreno-Sánchez, & García-García, 2016). Sin embargo, está reportado que en *E. gracilis* expuesta a $50 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} por 5 días, el contenido de PCs representa únicamente el 10 % del total de las moléculas tiol y es probable que otras moléculas quelantes estén involucradas en la unión intracelular y la inactivación de Cd^{2+} ; por ejemplo, los polifosfatos (poly P; polímeros de fosfatos ricos en moléculas de oxígeno capaces de interaccionar con los metales) (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

Así también, en *E. gracilis* se ha observado una relación entre la síntesis de moléculas con grupos tiol y la resistencia frente a otros metales pesados. El Cr^{6+} ($10\text{-}200\mu\text{M}$) induce un aumento del contenido de Cys y GSH, pero no así de PCs (García-García, Rodríguez-Zavala, Jasso-Chávez, Mendoza-Cozatl, & Moreno-Sánchez, 2009). La adición de $200 \mu\text{M}$ Pb^{2+} a un medio de cultivo que contiene $50 \mu\text{M}$ Zn^{2+} y Cd^{2+} , promueve un aumento significativo de Cys, GSH y de PCs (Mendoza-Cózatl, Rangel-González, & Moreno-Sánchez, 2006). Por otra parte, se ha propuesto la participación del GSH como mecanismo de resistencia en exposiciones a Hg^{2+} (Devars, Avilés, Cervantes, & Moreno-Sánchez, 2000; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007) pero no así la participación de PCs debido a que, tanto en *E. gracilis* como en plantas y algas, se ha observado que el Hg^{2+} es un mal inductor de la síntesis de estos péptidos (Grill, Winnacker, & Zenk, 1987; Howe & Merchant, 1992).

Tabla 2. Mecanismos de resistencia hacia diferentes metales y metaloides, reportados en *E. gracilis*.

Mecanismo de Resistencia	Metal /Metaloide	Referencias
Acumulación (Quelación intracelular y/o compartimentación)	Cd ²⁺ As ⁵⁺ Cr ⁶⁺ Hg ²⁺ Pb ²⁺ Zn ²⁺ Cu ²⁺	(Devars <i>et al.</i> , 2000; García-García <i>et al.</i> , 2009; Mendoza-Cózatl <i>et al.</i> , 2006; Miot <i>et al.</i> , 2009)
Biotransformación	Hg ²⁺ → Hg ⁰ Cr ⁶⁺ → Cr ³⁺ As ⁵⁺ → As ³⁺	(Devars <i>et al.</i> , 2000; García-García <i>et al.</i> , 2009; Miot <i>et al.</i> , 2009)
Quelación extracelular	Cr ³⁺	(Lira-Silva <i>et al.</i> , 2011)
Adsorción	Cr ³⁺	(García-García <i>et al.</i> , 2009)

VII. Antecedentes de *E. gracilis* expuesta a níquel.

Los antecedentes que existen en la literatura con respecto *E. gracilis* en presencia de Ni son los siguientes:

- Crecimiento celular:

Gajdosova y Reichrtova (1996) observaron que el NiSO₄ causa un efecto negativo en el crecimiento celular de *E. gracilis* conforme se aumenta su concentración (intervalo de 0.1 μM a 10 μM).

De la misma manera Olaveson y Nalewajko (2000) reportaron una reducción en el crecimiento en células de *E. gracilis*, cuya Concentración Inhibitoria del 50% del crecimiento (IC₅₀) fue de 87 pmol de Ni/célula, lo cual equivaldría aproximadamente a 725 μM de Ni.

- Motilidad

Ahmed y Häder (2010) midieron la inhibición por Ni con respecto a la motilidad de *E. gracilis*, reportando una IC₅₀ de 10 mg/L (170.4 μM) de Ni en un tiempo de incubación de 24 h.

- Fotosíntesis

Está reportado una disminución significativa de la fotosíntesis después de 24 h en células tratadas en concentraciones de 45-180 mg/L de Ni (0.7 a 0.3 mM) (Ahmed & Häder, 2010). Y un aumento del contenido (23%) de clorofila en células de *E. gracilis* expuestas a 100 μM de Ni y una disminución importante (80%) cuando se las expone a 1mM (Manankina, Mel'nikov, Budakova, & Shalygo, 2003).

Con base a los antecedentes previamente mostrados sobre los mecanismos de resistencia a Ni reportados en diversos organismos (desde bacterias y levaduras hasta plantas) junto con los que se han reportado directamente con nuestro modelo de estudio *Euglena gracilis*, en este trabajo se pretende evaluar si este protista utiliza el mecanismo de resistencia mediado por el metabolismo del GSH frente a una exposición a Ni.

5. HIPÓTESIS

E. gracilis puede acumular níquel, utilizando el mecanismo de quelación intracelular mediado por el glutatión.

6. OBJETIVOS

General:

Determinar la capacidad de acumulación de níquel y la cantidad tioles presentes *E. gracilis* expuesta a NiCl₂.

Particulares:

- Determinar la susceptibilidad de *E. gracilis* a Ni²⁺ a través de una IC₅₀ de crecimiento y de la medición del consumo de oxígeno, la fotosíntesis y el contenido de clorofila.
- Determinar la capacidad de acumulación de níquel en células de *E. gracilis*.
- Determinar el efecto de cationes divalentes en la acumulación de níquel.
- Determinar el contenido de tioles (Cys, γ-EC, GSH y PCs) en *E. gracilis* control y en células expuestas a Ni²⁺.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivo de *E. gracilis* fotosintética.

Se trabajó con la cepa *E. gracilis* Klebs Var. Z, la cual fue cultivada axénicamente en medio Hutner modificado, el cual es un medio de crecimiento que inicialmente fue descrito por Hutner *et al.* (1956), pero posteriormente modificado por Schiff *et al.*, 1971. Este medio se compone de Glutamato 34 mM, Malato 15 mM, CaCO₃ 2mM, (NH₄)₂HPO₄ 1.5mM, MgSO₄•7H₂O 2mM, KH₂PO₄ 3 Mm, *Minerales traza A* (ZnSO₄•7H₂O 0.02 mM, MnSO₄•H₂O 0.01 mM, Na₂MoO₄•2H₂O 0.1 mM y CoCl₂•6H₂O 7x10⁻³ mM) y *Minerales Traza B* (CuSO₄•H₂O 3X10⁻³ Mm, H₃BO₃ 0.01 mM, Na₂VO₄•16H₂O 2x10⁻⁴mM y Fe(NH₄)₂(SO₄) 0.03 mM). El medio se ajustó a pH de 3.5 con NaOH y se esterilizó por autoclave 15 minutos a 20 libras de presión. Antes de sembrar las células se añadió por cada 100 mL de cultivo 1 mL de vitaminas (Tiamina 3x10⁻³mM, Cianocobalamina 0.002 µg/L y FeCl₂ 0.02 mM) que fueron previamente esterilizadas por filtración (poro de filtro 0.22 µm).

Las células se mantuvieron por resiembras, las cuales se hicieron antes de que llegaran a la fase estacionaria de crecimiento, partiendo de un inóculo de 0.2x10⁶ células/mL. El cultivo se mantuvo en una cámara de incubación, entre 22-25°C, con un fotoperiodo de 12 horas con luz blanca (70 µmol quanta m⁻²s⁻¹) y 12 horas de oscuridad (Fig.S.1; Material Suplementario).

II. Conteo celular y determinación de viabilidad.

Las células se contaron con una cámara de Neubauer. Esto se realizó tomando muestras de los cultivos para hacer diluciones en un volumen final de 1mL de agua y 0.05% de HCl (para inmovilizar a las células y así facilitar su conteo), se tomaron 15 µL de esta dilución, se colocaron en el centro de la cámara con su respectivo cubreobjetos, se contaron las células dentro de los 5 cuadrantes principales de la cámara y se realizó un promedio de ellos. El valor total fue multiplicado por el factor de extrapolación de la cámara (10,000); el cual fue calculado considerando el volumen de muestra que hay entre cada cuadrante de la cámara y el cubreobjetos (1x10⁻⁴ mL), para determinar finalmente la concentración de células por mililitro de cada cultivo (Fig. S.3; Material Suplementario).

La viabilidad se determinó pre-incubando a las células con azul tripano 0.05% (m/v) durante 3 minutos, posteriormente fueron contadas en la cámara de Neubauer 100 células escogidas al azar dentro de los cuadrantes y se determinó así el porcentaje de células vivas y muertas.

III. Medición de níquel

Las células se obtuvieron a partir de una cosecha por centrifugación (3,795 g/ 4°C/ 5 min). Posteriormente el botón celular se lavó 2 veces por centrifugación (1,900 g/ 4°C/ 1 min) con KH_2PO_4 0.1 M suplementado con 5mM EGTA para eliminar el metal adherido extracelularmente. Al final de los lavados el botón celular se resuspendió en 1 mL de agua destilada, las células se contaron en la cámara de Neubauer y se tomó 1 mL de esa suspensión celular para medir el Ni intracelular o la síntesis de tioles (Sección 4.VIII).

Posteriormente se realizó una digestión ácida; se tomó un mililitro de cada muestra y se adicionó 3mL de una mezcla de 2.5 mL HNO_3 /0.5 mL H_2SO_4 y se colocó en una parrilla de calentamiento durante 2 horas. La temperatura de la parrilla se calibró alternando cada 15 minutos con alta intensidad (100-110°C) y 10 minutos con baja intensidad (95-100°C). Por último las muestras se aforaron a 5 mL con agua desionizada.

La cantidad intracelular de Ni se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Se utilizó un equipo Varian Spectra AA 640 (Varian, Palo Alto, California, EUA) con una mezcla de aire y acetileno a un flujo de 13.5:2 L/min (Fig.S.4; Material Suplementario). Se utilizó una lámpara de cátodo hueco Multielementos (Fe/Co/Ni/Mn/Cu y Cr) para emitir a la longitud de onda de 232 nm para medir el Ni total.

La concentración de las muestras se obtuvo mediante la interpolación de una curva patrón con un ajuste lineal (Fig.3), utilizando distintas concentraciones de una solución patrón de Ni de 1000 ppm marca Sigma. Como control negativo durante las mediciones se utilizaron muestras con células que no fueron expuestas a ninguna concentración de Ni

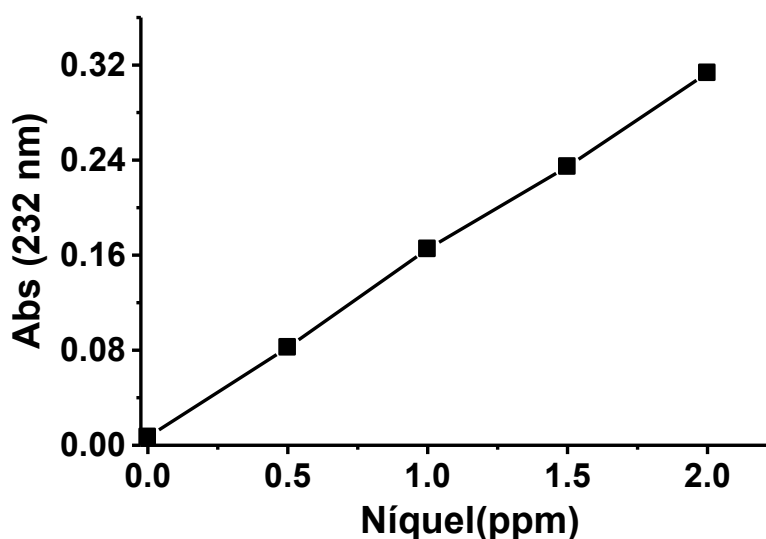


Fig. 3. Una de las curvas patrón que fueron utilizadas para la determinación cuantitativa de Ni_{total} .

IV. Protocolo de exposición de *E. gracilis* al Ni en condición de alta densidad.

Este protocolo fue optimizado en el laboratorio anteriormente y se realizó siguiendo lo reportado por García-García *et al.* (2009) con ligeras modificaciones.

El protocolo de alta densidad contempla la cosecha por centrifugación (1,860 *g*/4 °C/ 3 min) de células cultivadas durante 5 días en 500 mL de medio Hutner (cuyo inóculo inicial es de 0.2×10^6 cel/ mL). El botón celular se lava 1 vez con KH_2PO_4 100 mM pH 3 y se recuperan las células por centrifugación (1,900 *g*/ 4°C/ 1 min). Las células se resuspenden en 30 mL del mismo búfer para obtener una solución con una densidad de 25-30x 10^6 cel/mL. Dicha solución celular se reparte en volúmenes de 5 mL en matraces de 25 mL y se les añade las concentraciones de NiCl_2 de interés (50-2000 μM). Los matraces se incuban en agitación y temperatura constante (80rpm/ 25°C) con un fotoperiodo de 12 h con luz blanca ($70 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 12 h de oscuridad por un tiempo determinado (3-72 h) (Fig.S.2; Material Suplementario).

Posteriormente dependiendo de la medición que se desee realizar se siguen los procedimientos correspondientes para determinar consumo de oxígeno y fotosíntesis (Sección 7.V), contenido de clorofila (Sección 7. VI), Ni acumulado y adsorbido (Secciones 7.III y 8.II.B.b), peso seco celular (Sección 7.VII), y contenido de tioles (Sección 4.VIII).

En resultados (Sección 8) se mencionan de manera más específica otras variantes dentro del protocolo de alta densidad que también se llevaron a cabo.

V. Medición del consumo de oxígeno y fotosíntesis.

Las mediciones se hicieron usando un electrodo de O_2 , tipo Clark (Yellow Spring Instruments) y en una cámara (1.7 mL) con agitación, la cual se mantuvo a temperatura constante (25° C) mediante un flujo continuo de agua. El electrodo se calibró utilizando búfer KME (KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1mM) pH 7.2 saturado de oxígeno y se adicionó ditionita de sodio (Na_2SO_3) para determinar la cantidad total de oxígeno en la cámara. La solubilidad del oxígeno a la altitud de la Ciudad de México (2240 m) se consideró de 420 ngatO/ mL. Las determinaciones se llevaron a cabo dentro de una caja oscura para mantener aisladas a las células de la luz y poder controlar la fotosíntesis con luz de un proyector de diapositivas ($1000\mu\text{mol quanta/ m}\cdot\text{s}$). Los cambios en la concentración de oxígeno se acoplaron a un registrador (Kipp & Zonen, Delft, Países Bajos) graficó los trazos de consumo de oxígeno y fotosíntesis (Fig.S.5; Material Suplementario).

Las células control y expuestas a Ni fueron cosechadas por centrifugación (1,900 *g*/ 4°C/ 1 min) a las 24 horas de estar bajo el protocolo de alta densidad (Sección 4. IV) y fueron lavadas por centrifugación con búfer KME pH 7.2 El botón celular obtenido fue resuspendido en 300 μL de

KME y se tomaron 50-100 μL de la suspensión celular con aproximadamente $5\text{-}10 \times 10^6$ células/mL para determinar el consumo de oxígeno y la fotosíntesis en el electrodo de O_2 .

VI. Determinación de contenido de clorofila.

Se determinó por el método de Arnon (1949). La clorofila se extrajo con 2.5 mL de acetona 80% (v/v) a partir de 10-20 μL de muestra con una densidad de $1\text{-}1.5 \times 10^6$ células/mL, las cuales fueron centrifugadas (1,900 $g/4^\circ\text{C}/10$ min) (Fig.S.6; Material Suplementario). Posteriormente se leyó la absorbencia a 663 y 645 nm en una célula de vidrio.

La concentración de clorofila total (a y b) fue calculada de la siguiente forma:

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

VII. Determinación de peso seco.

Se determinó el peso seco para las células expuestas a 0, 50, 500 y 1000 μM de Ni^{2+} en condiciones del protocolo de alta densidad por un tiempo de 24 horas en KH_2PO_4 pH 3, para ello se cosecharon las células por centrifugación (1,900 $g/4^\circ\text{C}/1$ min) y posteriormente fueron lavadas por centrifugación (1,900 $g/4^\circ\text{C}/1$ min) y resuspendidas en búfer SHE (225 mM Sacarosa, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA pH 7.3).

Posteriormente, las células fueron contadas en la cámara de Neubauer y alícuotas de $1.5\text{-}3 \times 10^7$ células se colocaron en un vidrio de reloj (previamente pesado en una balanza analítica) y se mantuvieron a 60°C por 6 h en un horno como fue descrito en Sánchez-Thomas *et al.*, (2016) (Fig.S.7; Material Suplementario). Finalmente, el vidrio de reloj con las células secas se pesó en una balanza analítica y al dato obtenido se le restó el peso del propio vidrio de reloj.

VIII. Determinación de tioles.

Se midieron los tioles por el sistema de HPLC-Vis marca Waters 1525-1289 (Waters, Milford, MA, USA) (Fig.S.8; Material Suplementario), utilizando una columna C-18 Symmetry Waters de tamaño de partícula 3.5 μm . La fase móvil que se utilizó estaba compuesta de TFA 0.1% en agua y los tioles se eluyeron con un gradiente lineal ACN 100%. La separación al principio fue con 99% de solución de TFA y 1% ACN, después de 10 min se utilizó un gradiente discontinuo para obtener 80% de la solución de TFA y 20% ACN a un flujo de 1mL/min. Los compuestos con grupos tiol fueron detectados por la medición de una reacción colorida con DTNB 0.1mM disuelto en KH_2PO_4 0.1M pH 8, utilizando un espectrofotómetro acoplado al HPLC a una absorbancia de 412 nm.

Las células control y expuestas a Ni fueron cosechadas según se indicó en la Sección 4.III., con la diferencia de que la alícuota de 1mL se guardó a -70°C en presencia de 5 mM de

DTT. Una vez descongeladas las muestras se adicionó Tritón X-100 0.1% y PCA 3%, se agitaron vigorosamente por 1 min y posteriormente se centrifugaron (17,572 *g*/ 4 °C/ 2 min), el sobrenadante se filtró con un poro de 0.45 μm de diámetro y se tomaron 50 μL para medir los tioles por HPLC. Cada uno de los metabolitos fue identificado mediante el uso de estándares internos.

8. RESULTADOS

I. Exposición a níquel en medio Hutner

A. Susceptibilidad al níquel: Curva de crecimiento e IC₅₀ de crecimiento.

Con el objetivo de evaluar la toxicidad del Ni en el crecimiento de *E. gracilis* se llevó a cabo una curva de crecimiento (Fig. 4) para la cual se cultivaron células en medio Hutner en presencia de distintas concentraciones de Ni²⁺ y se midió su densidad celular durante 8 días.

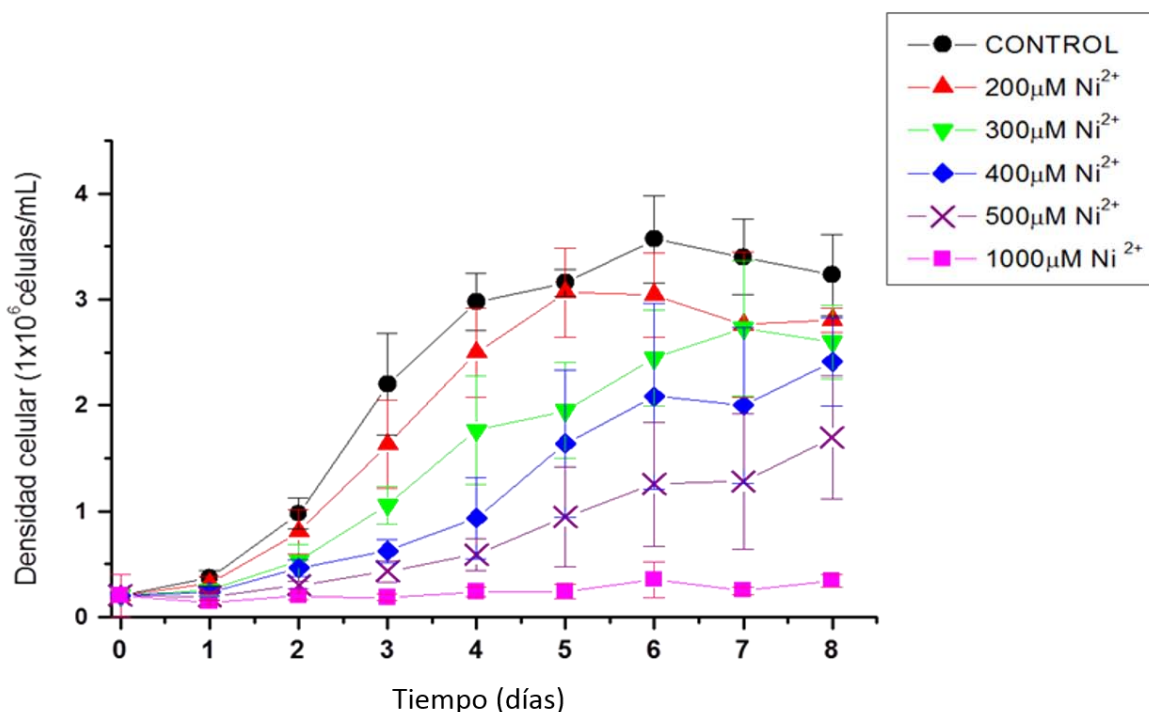


Fig. 4. Curva de crecimiento de *E. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de Ni²⁺ durante 8 días en medio de cultivo Hutner. \pm SD n >5.

En la curva de crecimiento se puede observar cómo a medida que las células se exponen a una mayor concentración del metal, su crecimiento se ve inhibido durante la fase exponencial, sin embargo, al octavo día parece que las células tratadas de 0-400 μM de Ni²⁺ empiezan a llegar a la fase estacionaria con la misma densidad celular. En dónde es muy evidente la inhibición total

del crecimiento es en las células expuestas a 1000 μM de Ni^{2+} . Es importante señalar que se midió la viabilidad celular al octavo día de crecimiento y las condiciones de 0-500 μM de Ni^{2+} presentaron una viabilidad $\geq 98\%$ y las células expuestas a 1000 μM de Ni^{2+} una viabilidad $\geq 88\%$.

Posteriormente se calculó la IC_{50}^* de crecimiento con las densidades celulares obtenidas al quinto día de crecimiento (Fig. 5), la cual fue de 426 μM .

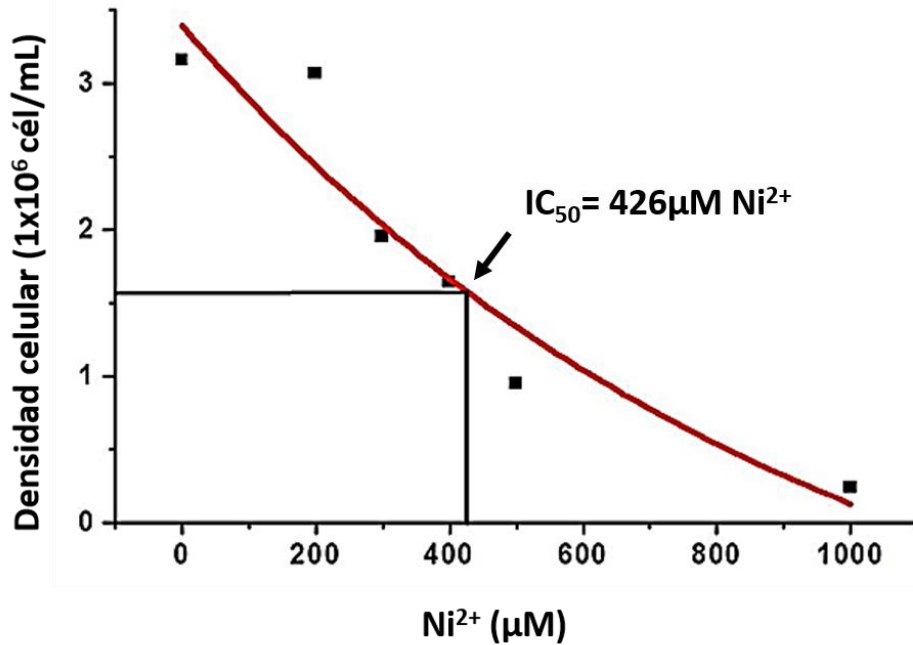


Fig. 5. Densidad celular de *E. gracilis* después de 5 días en ausencia o presencia de las indicadas concentraciones de Ni^{2+} . La IC_{50}^* obtenida se señala con una flecha.

* La IC_{50} se calculó considerando como 100% la densidad celular de las células cultivadas en medio Hutner sin Ni^{2+} y el 50 % del crecimiento se extrapola a la curva obtenida con la ecuación de una hipérbola y posteriormente al eje de las abscisas. $n= 5$.

B. Acumulación de níquel.

Se determinó la cantidad de Ni intracelular en células de *E. gracilis* expuestas a 500 y 1000 μM de Ni^{2+} al quinto día de crecimiento, cultivadas en medio Hutner, con la finalidad de evaluar la capacidad de acumulación del protista con este metal (Tabla.3).

Tabla 3. Capacidad de acumulación de *E. gracilis* expuesta a 500 y 1000 μM de Ni^{2+} usando medio de cultivo Hutner.

Ni^{2+} añadido (μM)	$\text{nmol}/10^7$ células
500	9 ± 3.3
1000	14 ± 3.7

Posteriormente, quisimos observar si existía un efecto por parte de los iones divalentes metálicos presentes en el medio Hutner dentro de la acumulación de Ni. Por lo que, decidimos utilizar un nuevo protocolo (Protocolo de alta densidad) en donde las células estuvieran expuestas al Ni sin la presencia de los metales señalados en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración en la que se encuentran los cationes divalentes en el medio Hutner.

Metales	Concentración (µM)
Ca²⁺	2000
Mg²⁺	2000
Zn²⁺	20
Mn²⁺	10
Co²⁺	7
Cu²⁺	3

Cabe aclarar que el Protocolo de alta densidad, contempla el cultivar células en medio Hutner, para posteriormente lavarlas y resuspenderlas en un medio libre de iones, en el cual se exponen distintas concentraciones de Ni²⁺. El búfer 100 mM KH₂PO₄ fue el medio libre de iones que se utilizó debido a que su pka de 2.12 permite ajustar el pH a 3 y simular las condiciones ácidas del medio Hutner.

Las células de *E. gracilis* expuestas a 1,000 µM de NiCl₂ bajo este protocolo pudieron acumular hasta 7 veces más de Ni (Fig. 6) respecto a lo observado en el experimento realizado en el medio Hutner (Tabla 3). En paralelo, se hicieron experimentos con este protocolo pero utilizando los búfers: 0.05 M de KH₂PO₄, NaH₂PO₄ y (HEPES), y 0.1 M de (Tris), ajustados a pH 7.2; en dichos ensayos la acumulación de Ni en células expuestas a 1,000 µM de NiCl₂ durante 6 horas no fue diferente (datos no mostrados) a la observados en KH₂PO₄ a pH 3 (Fig. 6) a excepción de con KH₂PO₄ a pH 7.2 cuya acumulación fue casi nula (datos no mostrados).

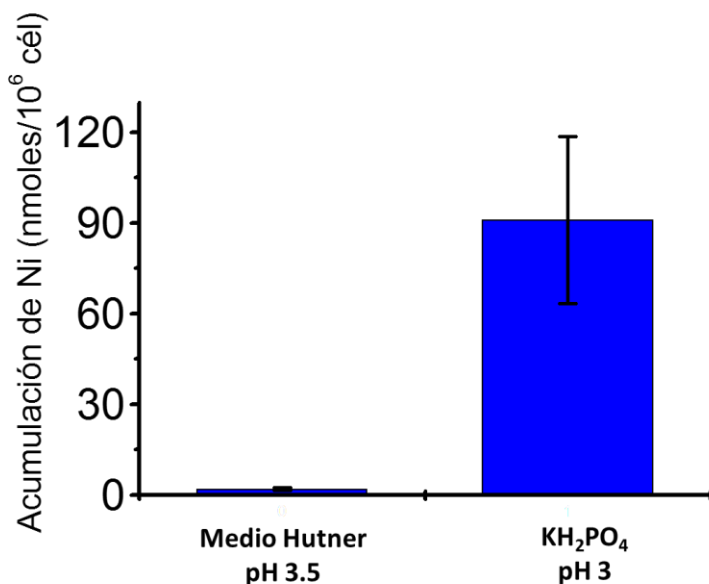


Fig. 6. Acumulación de Ni en medio Hutner y en KH₂PO₄ bajo el protocolo de alta densidad, por 6 h de incubación con 1000µM de Ni²⁺. ± SD n = 4.

II. Exposición a níquel bajo el Protocolo de alta densidad.

A. Susceptibilidad al níquel: Consumo de oxígeno, fotosíntesis y contenido de clorofila.

Habiendo cambiando el protocolo de exposición de *E. gracilis* a Ni, se determinó nuevamente la susceptibilidad celular en estas condiciones de alta densidad y agitación constante.

Debido a que las células ya no crecen bajo este protocolo, no se pudo determinar una IC₅₀ del crecimiento de *E. gracilis* por Ni, en su lugar, se midió el consumo de oxígeno, la fotosíntesis y el contenido de clorofila total (clorofila a+b) en células expuestas a 50, 500 y 1000 µM durante 24 horas; que fue el tiempo en el que se determinó la máxima acumulación del metal (Fig. 9).

En la Fig. 7. se muestra que el consumo de oxígeno disminuyó un 50% con 500 µM de Ni²⁺ y alrededor de un 85% con 1,000 µM de Ni²⁺, de igual manera la fotosíntesis se vio afectada a estas mismas concentraciones, ya que con 500µM de Ni²⁺ disminuyó un 80% y con 1,000µM de Ni²⁺ disminuyó un 90 %.

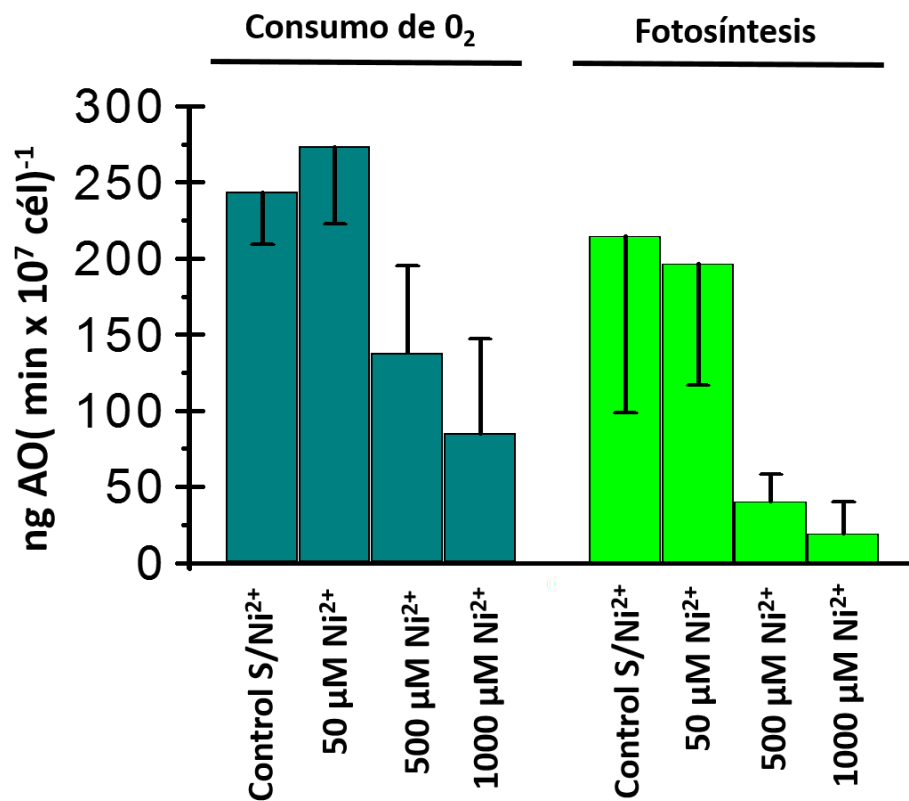


Fig. 7. Consumo de oxígeno y fotosíntesis en células control y expuestas a distintas concentraciones de Ni, bajo el protocolo de alta densidad, después de 24 h de incubación. ± SD n=3.

Respecto al contenido de clorofila a+b, no se observaron cambios significativos bajo ninguna condición de exposición a Ni respecto a las células control (Fig.8).

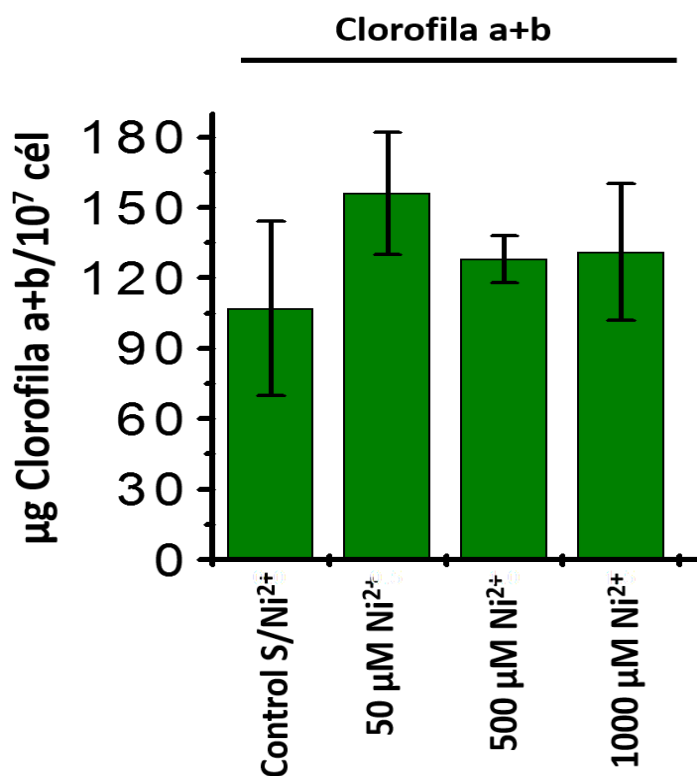


Fig. 8. Contenido de clorofila en células control y expuestas a 50, 500 y 1000 µM de Ni²⁺. ± SD n=3.

B. Acumulación de níquel.

a. *Cursos temporales.*

Con la finalidad de determinar la máxima capacidad de acumulación de Ni en *E. gracilis* se realizaron los cursos temporales de células expuestas a 50 µM Ni, 500 µM Ni y 1,000 µM Ni (Fig. 9) bajo el protocolo de alta densidad, de 3-72 horas de incubación. De manera conjunta se midió la viabilidad celular con azul tripano y se determinó la densidad celular para cada tiempo. El tiempo en el que se observó una mayor acumulación de Ni fue a las 24 horas de incubación para las tres exposiciones.

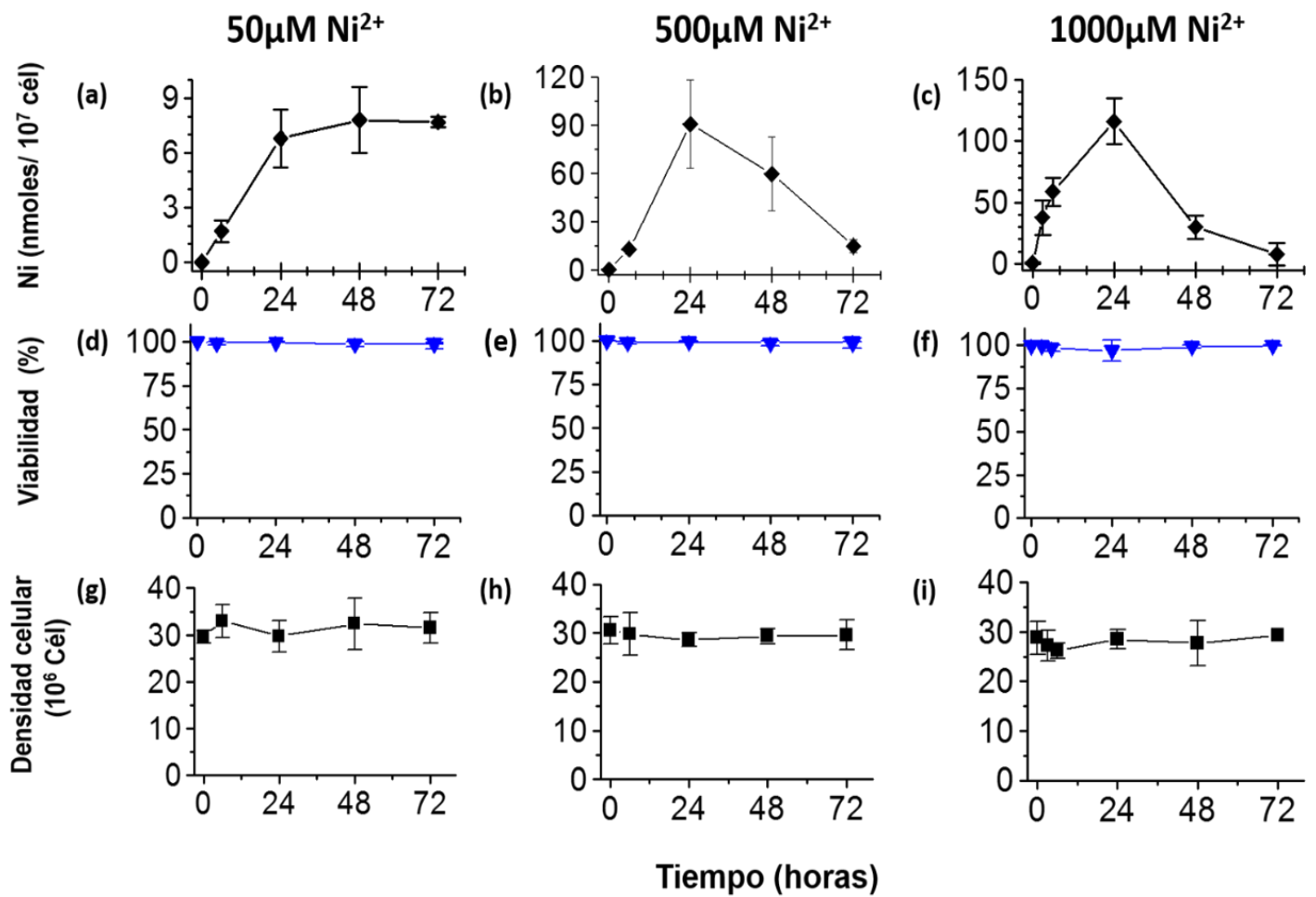


Fig. 9. Cursos temporales de acumulación de Ni a las 72 horas bajo el protocolo de alta densidad, en células expuestas a 50, 500 y 1,000 μM de Ni²⁺ (a,b y c), con su respectivo porcentaje de viabilidad celular (d, e y f) y su densidad celular (g,h e i). ± SD n ≥ 5.

b. Adsorción.

Para complementar el trabajo de investigación, también se evaluó la capacidad de adsorción de Ni que tiene *E. gracilis* y para ello realizamos la misma metodología que se lleva a cabo para medir acumulación con la diferencia que los lavados posteriores a la cosecha fueron realizados con KH_2PO_4 pH 7.4 pero sin EGTA, con el objetivo de que al no lavar con un agente quelante (EGTA), se puede determinar la cantidad de Ni total removido, tanto intracelularmente (acumulado) como el adherido extracelularmente a las membranas de las células (adsorbido) y así con la resta del total removido menos el acumulado se obtiene el Ni adsorbido.

En la Fig. 10 se presenta la cantidad de Ni total removido y el Ni acumulado en células expuestas a $1,000 \mu\text{M Ni}^{2+}$ por 24 horas en el protocolo de alta densidad. No existe una diferencia, lo cual indica que el Ni adsorbido extracelularmente es un mecanismo de remoción poco relevante en *E. gracilis*. Por esta razón se decidió enfocar el trabajo de la presente tesis a caracterizar el mecanismo de acumulación (Ni intracelular).

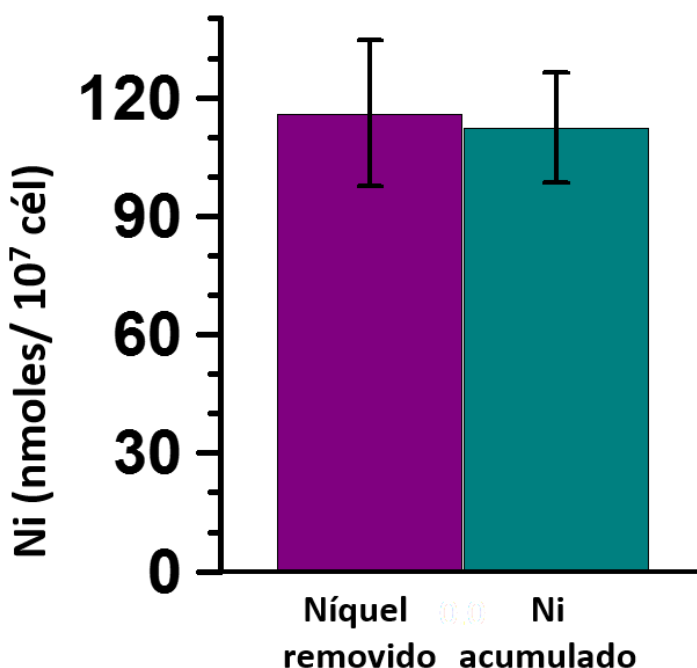


Fig. 10. Ni total removido y Ni acumulado por *E. gracilis* en el protocolo de alta densidad en presencia de $1000\mu\text{M Ni}^{2+}$ por 24 h. \pm SD n=3

c. Dosis-Respuesta de níquel.

Se determinó la capacidad de acumulación de Ni en células expuestas a diferentes concentraciones del metal (50, 200, 500, 1,000 y 2,000 μM de Ni^{2+}) y observamos un efecto dosis-respuesta en las primeras tres concentraciones evaluadas (50, 200 y 500 μM de Ni^{2+}) y a partir de 500 μM de Ni^{2+} la acumulación se satura (Fig. 11).

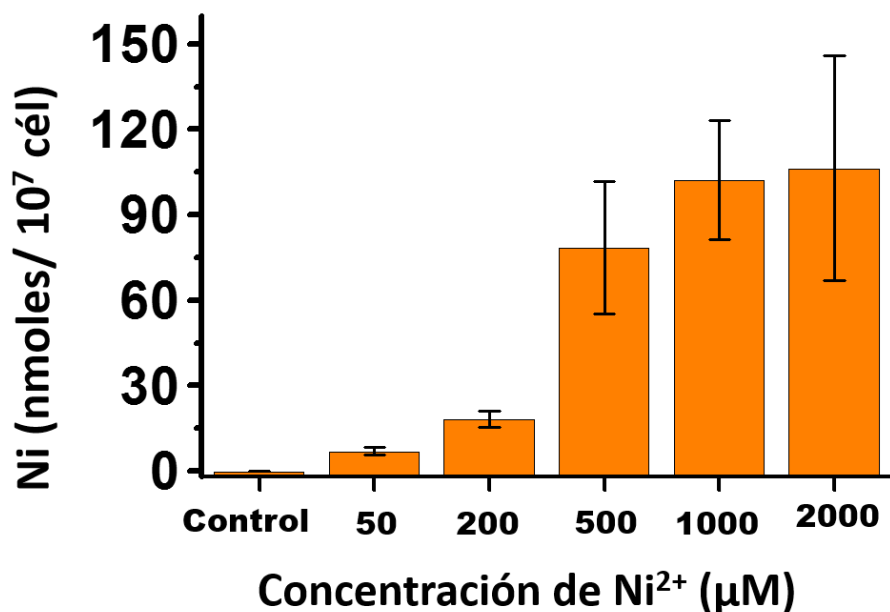


Fig. 11. Acumulación de Ni en células expuestas a diferentes concentraciones de Ni^{2+} , por 24 h de incubación, en el protocolo de alta densidad.

d. Efecto de diferentes cationes divalentes en la acumulación de níquel.

Por otro lado, con la finalidad de dilucidar si los metales que se presentan en el medio de cultivo Hutner eran los responsables de la baja acumulación de Ni en los resultados mostrados en la Tabla 3, se decidió determinar la acumulación de Ni en presencia de cada uno de los metales usando el protocolo de alta densidad. En la Tabla 5 se muestran la capacidad de acumulación en células que fueron expuestas a 500 μM de Ni^{2+} y a las concentraciones en las que se encuentra cada metal en el medio Hutner.

Tabla 5. Acumulación de Ni en *E. gracilis* en presencia de 500 μM Ni^{2+} y con diferentes cationes divalentes a la concentración en la que se encuentran en el medio Hutner.

Sin Metal añadido	Ca^{2+} 2000 μM	Mg^{2+} 2000 μM	Zn^{2+} 20 μM	Mn^{2+} 10 μM	Co^{2+} 7 μM	Cu^{2+} 3 μM
91 \pm 28	93 \pm 19	9 \pm 2	79 \pm 17	109 \pm 14	92 \pm 7	104 \pm 15

Los resultados de la tabla muestran que el único metal del medio Hutner que disminuyó la acumulación de Ni fue el magnesio, en las concentraciones en las que se presenta en este medio de cultivo (2,000 μM).

Después de obtener el resultado anterior, se decidió determinar la concentración en la cual el magnesio empezaba a inhibir la acumulación de Ni, por lo que se elaboró una curva dosis-respuesta con el Mg^{2+} (Fig.12). Las células se expusieron en el protocolo de alta densidad con 500 μM Ni^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} (0, 20, 100, 200, 500, 1,000 y 2,000 μM) y se dejaron incubando por 24 horas para posteriormente medir la acumulación.

En la Fig.12 se puede observar que a partir de 200 μM de Mg^{2+} existe un efecto negativo en la acumulación de Ni; la cual disminuye a medida que aumenta la concentración de Mg^{2+} .

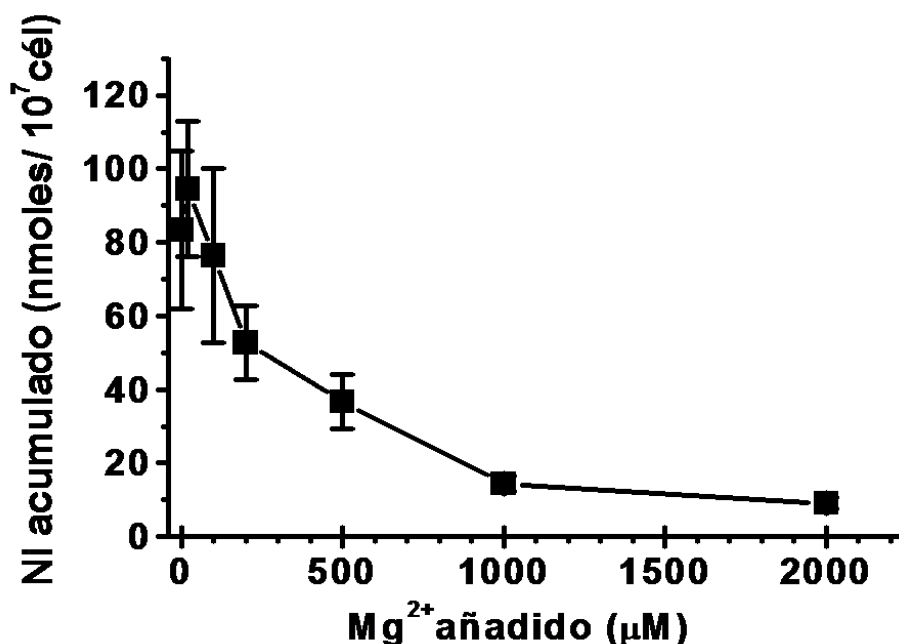


Fig.12. Acumulación de Ni en *E. gracilis* presencia de diferentes concentraciones de magnesio.

Como la concentración de magnesio en el medio Hutner es alta comparada con las concentraciones de los otros iones (y la misma con el Ca^{2+}) y en la curva dosis- respuesta de magnesio se observó una disminución a partir de 200 μM de Mg^{2+} , decidimos probar bajo el mismo protocolo, el efecto de Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} pero esta vez a una concentración de 1,000 μM de cada metal, con la intención de determinar si la acumulación de Ni podía verse inhibida a una concentración más alta.

En la Tabla 6 se muestra la acumulación de las células que fueron expuestas a 500 μM de Ni^{2+} y a 1,000 μM cada metal. Y se puede observar que el cobre también puede afectar la acumulación de Ni a niveles de 1 mM.

Tabla 6. Acumulación de Ni en *E. gracilis* presencia de 500 μM Ni^{2+} y con Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} a una concentración de 1,000 μM .

Sin Metal añadido	Zn^{2+} 1000 μM	Mn^{2+} 1000 μM	Co^{2+} 1000 μM	Cu^{2+} 1000 μM
91± 28	114± 28	110 ± 18	87± 12	3± 1

A partir de estos resultados, decidimos realizar otra curva dosis- respuesta pero esta vez analizando distintas concentraciones de cobre entre 3 y 1,000 μM .

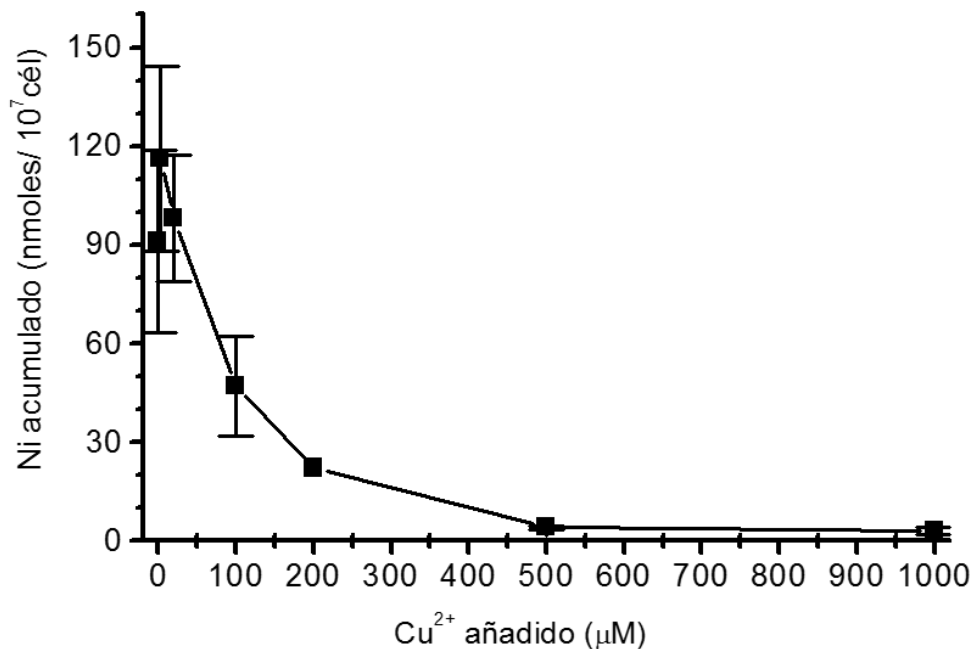


Fig.13. Acumulación de Ni en *E. gracilis* presencia de diferentes concentraciones de cobre.

En la Fig. 13 se puede observar que a partir de 100 μM de Cu^{2+} se obtiene la mitad de la acumulación de Ni de la condición control (sin cobre añadido), siendo que en las primeras concentraciones probadas (3 y 20 μM) no parece existir una diferencia. Y es a partir de 500 μM de Cu^{2+} que la acumulación de Ni se ve casi completamente inhibida.

e. *Peso seco*

Con la intención de poder hacer una comparación entre las capacidades de acumulación reportadas en la literatura científica de plantas hiperacumuladoras de Ni con nuestros datos obtenidos en el presente trabajo, se determinó el peso seco en $\text{mg}_{\text{DW}}/10^7$ células para cada una de las condiciones utilizadas (50, 500 y 1,000 μM de Ni^{2+}) y, posteriormente, se realizaron las equivalencias correspondientes para determinar la capacidad de acumulación de cada condición en mg Ni/KgDW (Tabla 7).

Tabla 7. Peso seco/ equivalencia de número de células y máxima capacidad de acumulación de Ni en *E. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de Ni^{2+} por 24 h.

Condición	Equivalencias ($\text{mgDW}/10^7$ células)	Acumulación de Ni (mg Ni/Kg DW)
50 $\mu\text{M Ni}^{2+}$	5 ± 0.3 (3)	82.2
500 $\mu\text{M Ni}^{2+}$	6 ± 0.7 (3)	895
1000 $\mu\text{M Ni}^{2+}$	5 ± 0.5 (3)	1361.6

f. *Tioles.*

Por último, con la finalidad de determinar si las moléculas con grupos tiol: cisteína (Cys), glutatión (GSH), gamma-glutamil cisteína (γ -EC) y polímeros de glutatión (Poly-GSH; en donde se incluyen a las fitoquelatinas) estaban involucradas en el mecanismo de resistencia y acumulación de Ni en *E. gracilis*, se determinó su contenido frente a una exposición de 0, 50, 500 y 1000 μM de Ni^{2+} después de 24 y de 72 horas (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido intracelular de Cys, γ EC, GSH y Poly-GSH en células expuestas a diferentes concentraciones de Ni en el Protocolo de alta densidad a las 24 y 72 horas de exposición.

	Cys	γ EC	GSH	Poly-GSH
24 HORAS				
Control	27.2 \pm 13.8	3.1 \pm 1.2	33 \pm 14	2.6 \pm 0.7
50 μ M Ni ²⁺	17.7 \pm 7.8	3.4 \pm 0.4	37.1 \pm 12.6	5.2 \pm 1.4 ^a
500 μ M Ni ²⁺	11.6 \pm 4.7	5.7 \pm 1.1	35 \pm 10.9	3.9 \pm 1.1
1,000 μ M Ni ²⁺	10.9 \pm 4.2	3.7 \pm 0.8	32.2 \pm 8.5	4.5 \pm 1
72 HORAS				
Control	33.3 \pm 2.7	2.9 \pm 1	26.8 \pm 2.7	2.1 \pm 0.5
50 μ M Ni ²⁺	28.7 \pm 3.6	4.1 \pm 1.2	41.8 \pm 9.5 ^b	2.5 \pm 0.8
500 μ M Ni ²⁺	6.1 \pm 3.9 ^c	0.7 \pm 0.3 ^b	6.9 \pm 2.4 ^b	1.4 \pm 0.7
1,000 μ M Ni ²⁺	2.9 \pm 1.6 ^c	0.5 \pm 0.3 ^c	4.6 \pm 1.8 ^c	1.8 \pm 0.7

^a $p < 0.05$

^b $p < 0.025$

^c $p < 0.005$

Posterior a las 24 horas de exposición, el contenido de todos los metabolitos analizados (Cys, γ EC, GSH y Poly-GSH) se mantienen en valores cercanos al control, a excepción del contenido de Poly-GSH en las células expuestas a 50 μ M de Ni²⁺ que aumenta 2 veces con respecto al control.

A las 72 horas, el contenido de GSH con 50 μ M de Ni²⁺ aumenta 1.6 veces con respecto al control. Por el contrario, con 500 μ M de Ni²⁺ la Cys, γ EC y el GSH disminuyen 5, 4 y 6 veces, respectivamente, mientras que en células expuestas con 1,000 μ M de Ni la Cys, γ EC, GSH disminuyen 10, 6 y 4 veces. Mientras que, el contenido de Poly-GSH parece mantenerse similar al control en todas las condiciones de exposición al metal.

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el medio Hutner (la curva de crecimiento (Fig.4), la alta viabilidad al octavo día de crecimiento en todas las condiciones utilizadas, así como la alta IC_{50} (Fig.5) sugieren que *E. gracilis* es resistente a altas concentraciones de Ni ($>50 \mu\text{M}$). Sin embargo, una explicación de esta aparente resistencia es la baja capacidad de acumulación de Ni en *E. gracilis* en estas condiciones de cultivo (Tabla 3); ya que si la mayor parte del Ni añadido no está ingresando a la célula, entonces no se verá una toxicidad celular importante que se refleje como un daño del crecimiento celular. Este argumento puede explicar lo que ocurre en las concentraciones $<500 \mu\text{M Ni}^{2+}$; sin embargo, a partir de la concentración $500 \mu\text{M Ni}^{2+}$ el crecimiento se ve afectado de manera importante, de hecho, la IC_{50} calculada es cercana a esta concentración (Fig.5; $426 \mu\text{M de Ni}^{2+}$). Este valor de IC_{50} obtenido es similar a lo reportado por Olaveson y Nalewaiko (2000) ($726 \mu\text{M de Ni}^{2+}$). El efecto tóxico sobre el crecimiento es más drástico con $1,000 \mu\text{M de Ni}^{2+}$, ya que no se observa una recuperación de las células en los 8 días de cultivo (Fig.4). Una cuestión interesante, es que hay una diferencia mínima entre la acumulación de Ni de las últimas dos concentraciones de Ni utilizadas (500 y $1,000 \mu\text{M Ni}^{2+}$, Tabla 3.), lo que nos sugiere que al aumentar ligeramente la cantidad de Ni internalizado, éste empieza a causar afectaciones importantes dentro de la célula. Sin embargo, la viabilidad al día 8, incluso en la última condición ($1000 \mu\text{M de Ni}^{2+}$) es alta ($\geq 88\%$), lo que nos hace pensar que a pesar de que el crecimiento se detiene, otro fenómeno está ocurriendo que evita la muerte celular.

El fenómeno que evita que *E. gracilis* desencadene una muerte celular podría ser el mismo que explique lo que se observó en la Fig. 9, en los cursos temporales de 500 y $1,000 \mu\text{M Ni}^{2+}$ después de las 24 h de exposición. La disminución en la acumulación del metal podría deberse a la activación de un mecanismo de expulsión del Ni. Como se mencionó en los antecedentes (sección 1.V.B), en las bacterias es común este mecanismo de resistencia; la expulsión de metales tóxicos al exterior de la célula y con respecto al Ni, la bomba de eflujo Co-Ni es de las más conocidas (Grass *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2015). En *E. gracilis* está reportada una bomba expulsora de cadmio, que tiene un fenotipo similar a una P-glicoproteína resistente a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) y se propone como un mecanismo más de resistencia ante la presencia de cadmio (Einicker-Lamas *et al.*, 2003). Lo que deja abierta la posibilidad de que en este protista también pudiera existir un transporte de eflujo de Ni; no obstante, hacen falta determinaciones en dónde se evalúe directamente el transporte de Ni para corroborar esta suposición.

Por otro lado, al evaluar la susceptibilidad celular en el protocolo de alta densidad, se observa una disminución importante tanto del consumo de oxígeno como de la fotosíntesis a partir de $500 \mu\text{M de Ni}^{2+}$ (Fig. 7), lo cual correlaciona con el trabajo publicado en 2010 por Ahmed y

Häder, en el que se reporta daño en la fotosíntesis al adicionar Ni en concentraciones similares a las añadidas en este trabajo (770-3000 μM de Ni^{2+}). En cuanto al contenido de clorofila, en el presente trabajo no se observan diferencias en ninguna de las dos condiciones de exposición a Ni (500 y 1000 μM , Fig. 8), lo que sugiere que los daños hacia la fotosíntesis ocasionados por el Ni se deben a otro mecanismo que no involucra de forma importante a la biosíntesis de clorofila, situación que es contraria a los resultados de Manankina *et al.*(2003) en dónde se observa un aumento del 20 % en el contenido de clorofila con 100 μM de Ni^{2+} y una disminución del 80 % con 1000 μM de Ni^{2+} . Cabe señalar que los daños celulares observados en términos de disminución del consumo de oxígeno y de la fotosíntesis, son producto de la exposición al metal, ya que la viabilidad y la densidad celular se mantienen constantes en todas las concentraciones utilizadas de Ni a las 24 horas de exposición, como se observa en los cursos temporales de acumulación (Fig.9).

Los resultados de acumulación que se llevaron a cabo utilizando el protocolo de alta densidad, confirman que el Ni sí es capaz de acumularse en *E. gracilis*. Las células expuestas a 1,000 μM Ni^{2+} fueron capaces de acumular en promedio: 1362 mg Ni/Kg DW (Tabla 7), si comparamos este valor con lo reportado en la literatura con plantas, alcanzaría los niveles en los cuales se considera a una planta hiperacumuladora de Ni (<1000 mgNi/ Kg⁻¹ DW) según la definición de Jaffré (1976). Sin embargo, es importante señalar que en el ambiente, las condiciones naturales están lejos de ser similares a las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, por lo que los valores de acumulación del protista estudiado serían más parecidos a los obtenidos con el medio Hutner, en dónde existe una interacción simultánea entre distintos metales (de la cual se hablará más adelante en el texto). Es por ello, que las plantas adaptadas a las altas concentraciones de níquel en suelos serpentinos son los principales organismos hiperacumuladores para este metal, con integrantes que son capaces de acumular entre 10,000-20,000 mg Ni/Kg⁻¹ DW (Kazakou *et al.*, 2010).

El contraste de los resultados de acumulación de Ni en *E. gracilis* utilizando medio de cultivo Hutner y el protocolo de alta densidad es debido principalmente a la concentración de magnesio y en menor grado a la del cobre. Estos resultados correlacionan con datos publicados en *Chlamydomonas reinhardtii* en dónde se ha reportado una disminución significativa en la acumulación de Ni en presencia de 100 μM Mg^{2+} (Worms y Wikilson, 2007) y de manera similar se ha reportado que con concentraciones mayores a 0.5 μM de Cu^{2+} se reduce la acumulación de Ni (Flouty & Khalaf, 2015). Así también, en antecedentes se mencionó que en la levadura *S. pombe* el exceso de Mg^{2+} en el medio, disminuye 20 veces la acumulación de Ni^{2+} (Eitinger, Degen, Bohnke, & Muller, 2000). Es muy probable que tanto el cobre como el magnesio esten compitiendo en la captación de Ni mediante el uso de los sistemas de transporte de magnesio, debido a que se ha demostrado que el Ni entra en las células biológicas a través de los

transportadores de magnesio en varios organismos (Chamnongpol & Groisman, 2002; Pane, Smith, McGeer, & Wood, 2003). Se ha reportado que el Co^2 y Ni^{2+} se acumulan rápida e inespecíficamente a través del sistema de captura de magnesio CorA, conocido como sistema de transporte inorgánico de iones metálicos en bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Smith & Maguire, 1995) al igual que en la arquea *Methanococcus jannaschii* (Smith, Gottlieb, Kucharski & Maguire, 1998) y en la levadura *S.cerevisiae* (MacDiarmid & Gardner, 1998) con sus respectivas proteínas homólogas a CorA.

Respecto al contenido de tioles, al observar que el contenido de Poly-GSH se mantiene constante en todas las condiciones tanto a las 24h como a las 72h (a excepción de la condición con $50\mu\text{M Ni}^{2+}$ a las 24h), consideramos que la cantidad intracelular de GSH no fue suficiente para que la fitoquelatina sintasa de *E. gracilis* (EgPCS) lo tomara como sustrato para favorecer la síntesis de PCs. Inclusive, las pozas de GSH no solo no aumentaron, sino que hasta disminuyeron de manera significativa en la exposición a 500 y 1000 $\mu\text{M Ni}^{2+}$ a las 72h. Estas observaciones concuerdan con reportes en plantas expuestas a Ni, en los cuales no se observa una acumulación de estos péptidos en presencia del metal en la planta hiperacumuladora de Ni *T. goesingense* (Freeman *et al.*, 2004) y no se observa un efecto en la acumulación de Ni al adicionar BSO (inhibidor de la GCL) en células de la planta *Nicotiana tabacum* resistentes a Ni (Nakazawa, Nakazawa, Kameda, Ito, Ogita, Michihata & Takenaga, 2004). En estos reportes en donde se analizó las síntesis de PCs de forma directa e indirecta, se concluye que los polímeros de GSH en cuestión no están involucrados en la tolerancia a Ni. Por lo que, nuestros resultados en el presente trabajo sugieren que en *E. gracilis* las PCs tampoco están involucradas en la resistencia a níquel. Sin embargo, hacen falta estudios in vitro con la PCS de *E. gracilis* que nos demuestren si el Ni es o no un buen inductor para la biosíntesis de PCs en este protista, así como también que nos ayuden a explicar el único aumento del contenido de Poly-GSH en *E. gracilis* expuesta a $50\mu\text{M Ni}^{2+}$ a las 24h. Porque en dado caso de que a esta baja concentración de Ni con este primer tiempo de exposición, se active las síntesis de Poly-GSH, más específicamente la síntesis de PCs, entonces parecería muy probable que exista un efecto tóxico que inhiba este mecanismo de defensa a concentraciones más altas y en mayores tiempos de exposición. Sin embargo, para aclarar lo que está ocurriendo se requieren de análisis más profundos que determinen si del total de polímeros determinados aumentaron las PCs o algún otro polímero de GSH, en las células de *E. gracilis* expuestas a $50\mu\text{M Ni}^{2+}$ a las 24h.

Por otro lado, en el estudio de Freeman *et al.* (2004) se observó que al exponer a $100\mu\text{M}$ de Ni^{2+} a la planta hiperacumuladora de Ni *Thlaspi goesingense*, el contenido de GSH resultó ser significativamente más alto que en la especie no acumuladora de Ni *A. thaliana*. Los autores mencionan que esta diferencia se debe a una mayor actividad de la enzima glutatión reductasa (GR), la cual se encarga de reducir al glutatión oxidado (GSSG) para que esté disponible en la

célula GSH reducido que pueda proteger al organismo del daño por estrés oxidativo ocasionado por el metal pesado. De igual manera, también se han encontrado elevadas actividades de las enzimas glutatión reductasa y catalasa en la microalga verde *Scenedesmus acutus* f. *alternans* expuesta a 100µM Ni(NO₃)₂ (Randhawa, Zhou, Jin, Nalewajko, & Kushner, 2001). Por lo tanto, el aumento en la cantidad de GSH con 50 µM de Ni²⁺ a las 72 h también puede ser parte de un mecanismo de resistencia ante bajas concentraciones de Ni, no obstante, hace falta medir la actividad de la GR en *E. gracilis* para correlacionarlo directamente con este fenómeno en plantas hiperacumuladoras de níquel.

La disminución de los metabolitos: Cys, GSH y γEC en las concentraciones de 500 y 1000 µM Ni²⁺ a las 72 horas con respecto a las 24h, es probable que se deba a: 1) a la toxicidad del metal a tiempos más largos, lo cuál tendría que corroborarse con ensayos de toxicidad a las 72h; como lo fueron la determinación de la fotosíntesis y de la producción de oxígeno y del contenido de clorofila a las 24h, así como también se podrían medir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) o determinar si existen interacciones directas del metal con diversas enzimas; y 2) al posible fenómeno de expulsión del metal que se observó en el curso temporal de 500 y 1,000 µM Ni²⁺ a las 72 horas. En el segundo caso, la disminución de los tioles (Cys, GSH y γEC) podría explicarse si el Ni estuviera siendo expulsado de la célula en forma de un complejo con los metabolitos con grupos tiol analizados. Esta explicación es posible que ocurra en *E. gracilis* ya que en diferentes especies de *Leishmania* se han reportado transportadores tipo ABC que le confieren resistencia al metal antimonio al secuestrar conjugados de tiol-antimonio en vesículas intracelulares (Rai *et al.*, 2013). Sin embargo, esta hipótesis requiere de un mayor análisis experimental en *E. gracilis*.

De manera que, consideramos posible la formación de complejos Ni-GSH y su posible expulsión de la célula, lo que podría explicar la disminución de este metabolito a las dos concentraciones más altas en las 72 h, por lo que podemos concluir que el metabolismo del GSH parece sí estar involucrado en la resistencia de *E. gracilis* a Ni a un tiempo mayor de exposición. Por lo que el principal mecanismo sería el que está asociado a la expulsión del metal. No obstante, es importante resaltar que la inactivación del metal puede estarse dando de manera conjunta con otros metabolitos como la histidina, la nicotinamida, el citrato y el malato, como se ha reportado en plantas (Vacchina *et al.*, 2003, Macomber & Hausinger, 2011, Kozhevnikova *et al.*, 2014) o también por los polifosfatos, que han sido reportados en *E. gracilis* ante una exposición a Cd²⁺ (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

El presente trabajo de tesis abre el campo a futuras investigaciones para detallar con mayor profundidad mecanismos de resistencia hasta ahora poco explorados en *E. gracilis*: la expulsión de Ni y la inhibición/expulsión de tioles en respuesta a altas concentraciones intracelulares de Ni.

10. CONCLUSIONES

- 1) *E. gracilis* es susceptible a concentraciones $\geq 500 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} , ya que a partir de esta concentración se ve afectado su crecimiento celular en medio de cultivo Hutner y existe una disminución en el consumo de oxígeno y en la fotosíntesis en el protocolo de alta densidad.
- 2) Los efectos tóxicos del Ni en este protista dependen de las concentraciones de magnesio y cobre en el medio de exposición.
- 3) *E. gracilis* es capaz de acumular $>1000 \text{ mg Ni/Kg}^{-1} \text{ DW}$ bajo condiciones *in vitro* y en ausencia de otros metales divalentes.
- 4) La acumulación de Ni en *E. gracilis* se afecta en presencia de concentraciones submilimolares de magnesio y de cobre.
- 5) Existe un fenómeno que disminuye la cantidad de Ni intracelular dependiendo de los niveles acumulados de este metal en la célula.
- 6) El contenido de Cys, γEC y GSH correlaciona con la disminución de Ni intracelular.
- 7) El metabolismo del GSH muestra una contribución con la resistencia de *E. gracilis* a Ni pero no con su capacidad de acumulación.

11. PERSPECTIVAS

- Medir el transporte de Ni en un curso temporal, con el fin de dilucidar si el Ni se externaliza de la célula después de las 24 horas en concentraciones $\geq 500 \mu\text{M Ni}^{2+}$.
- Determinar la cantidad de otros metabolitos quelantes de Ni (Ej: histidina, polifosfatos, citrato) para evaluar su participación en los mecanismos de resistencia a este metal.
- Evaluar la actividad de enzimas involucradas en mecanismos antioxidantes (Ej: ascorbato peroxidasa (APX)), con la finalidad de determinar si el Ni genera un estrés oxidativo en *E. gracilis*.
- Medir el consumo de oxígeno, la fotosíntesis y el contenido de clorofila a las 72 horas para determinar si los efectos tóxicos del Ni pueden llegar a ser más severos.

12. APOORTE CIENTÍFICO Y ECOLÓGICO.

El presente proyecto aporta información acerca de los mecanismos de resistencia y acumulación que utiliza el protista fotosintético *Euglena gracilis* frente a una exposición de Ni²⁺ con el propósito de que los resultados obtenidos se sumen al conocimiento microbiológico y bioquímico de este organismo para optimizar proyectos que involucren tratamientos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados. Además, el conocimiento generado en esta tesis queda a disposición de toda la comunidad científica que trabaje con otros modelos biológicos con fines de remover o recuperar metales pesados.

El entendimiento de la biología de un organismo que es capaz de resistir y acumular altas concentraciones de un contaminante, permite diseñar estrategias para modificar genéticamente al organismo de interés para aumentar su capacidad de degradación, transformación y /o remoción. Incluso, esta información también permite optimizar el proceso de bioremoción de metales mediante el control de los parámetros fisicoquímicos del medio a remediar. En este sentido, es importante conocer tanto las ventajas como las desventajas de los organismos con potencial para la biorremediación.

E. gracilis también puede ser utilizada como un organismo bioindicador de altas concentraciones de metales debido a las respuestas específicas a nivel fisiológico y metabólico. Por lo que la información generada por esta tesis también puede ser aplicada para analizar posibles contaminaciones con Ni.

Sin embargo, la perspectiva más ambiciosa en el área de *E. gracilis* es su aplicación biotecnológica para tratamientos de biorremediación *ex situ* de aguas contaminadas con Ni y otros metales pesados. Es importante resaltar, que el presente trabajo forma parte de una primera fase experimental, sin embargo, se pretende llegar a una segunda etapa aplicada.

El objetivo de este tipo de estudios es el de lograr contrarrestar los daños que está ocasionando la contaminación de metales pesados en cuerpos de agua, afectando la calidad de vida de los seres vivos que están expuestos a estos elementos directamente o de manera no tan directa; a través de la biomagnificación del contaminante, lo que pone en riesgo no solo a la población humana, sino también a la biota del planeta en general, ya que todos pertenecemos a una red compleja de interacciones ecológicas.

Las actividades industriales, agrícolas y domésticas suelen perturbar a los ecosistemas, hasta un punto en el que se sobrepasa su capacidad de resiliencia, por lo que es nuestro deber ético buscar una pronta solución. Es por ello, que la ciencia juega un papel fundamental frente a esta problemática, tanto para demostrar los efectos tóxicos que se desencadenan en los organismos, así como al aportar conocimiento y tecnología que mejoren los tratamientos de remediación de sitios perturbados, en este caso debido a la contaminación de metales tóxicos.

13. MATERIAL SUPLEMENTARIO

A continuación presentamos un anexo de figuras suplementarias para Materiales y Métodos. Todas las fotografías o insertos donde aparecen células de *E. gracilis*, equipos analíticos o muestras celulares fueron capturadas en el departamento de Bioquímica del INC.

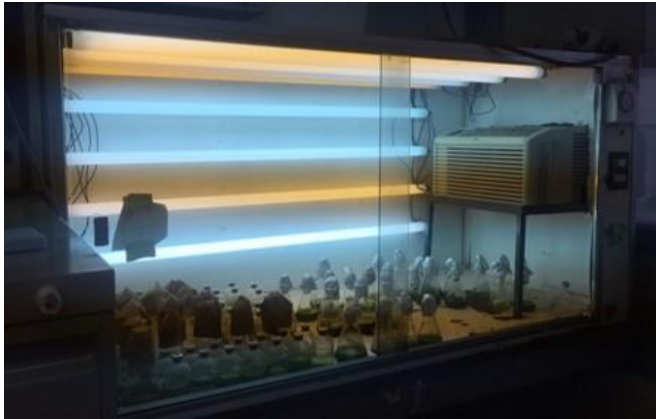


Fig.S.1. Cámara de incubación de cultivos celulares de *E. gracilis*.



Fig. S.2. Matracas en el agitador con células sometidas al Protocolo de Alta Densidad.

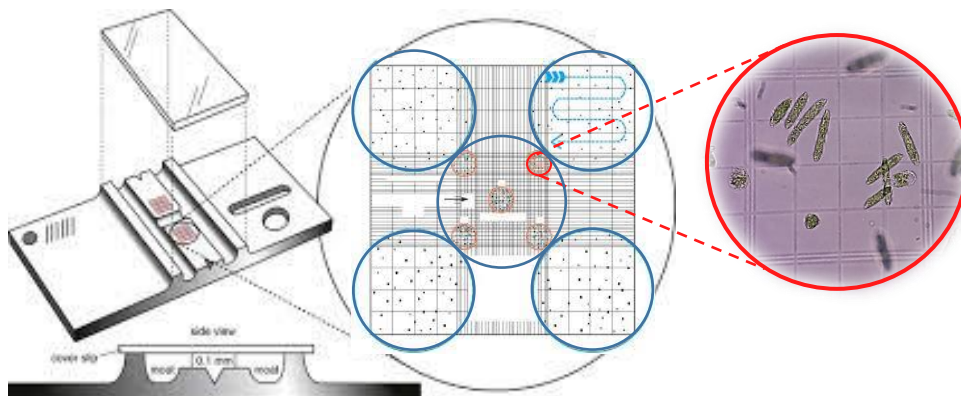


Fig. S.3. Conteo celular con la cámara de Neubauer. Cuadrantes utilizados (círculos azules) y observación de células a 400x (círculo rojo).



Fig. S.4. Espectro de Absorción Atómica.



Fig. S.5. Caja negra con cámara de vidrio y electrodo de oxígeno durante fase de iluminación artificial (izq.). Registrador de trazos de consumo oxígeno y fotosíntesis (der.).

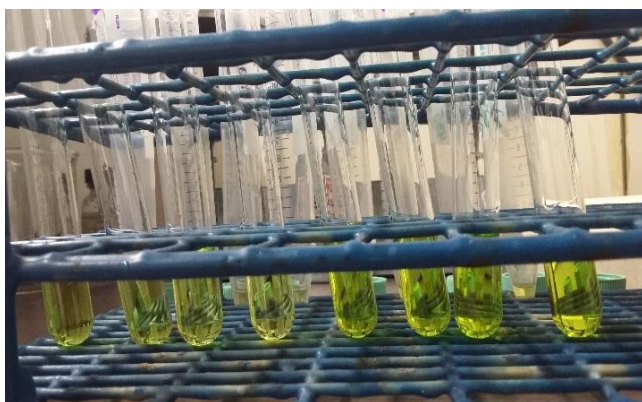


Fig. S.6. Extracción de clorofila con acetona (Método de Arnon).



Fig. S.7. Deshidratación de las células en horno para medir peso seco.



Fig. S.8. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (sistema HPLC-Vis).

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agency for toxic Substances and Disease Registry. (2015). Toxicological Profile: Nickel. Retrieved from <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=245&tid=44>
- Ahmaruzzaman, M. (2011). Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1), 36–59. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2011.04.005>
- Ahmed, H., & Häder, D.P. (2010). Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*, 69(1), 68–75. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.02.009>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1.
- Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment*, 13(3), 195–206. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x>
- Baccouch, S., Chaoui, A., & Ferjani, E. El. (1998). Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(9), 689–694. [http://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80018-1](http://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80018-1)
- Bartha, R., & Ordal, E. J. (1965). Nickel-Dependent Chemolithotrophic Growth of Two Hydrogenomonas Strains. *Journal of Bacteriology*, 89(4), 1015–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14276088>
- Bassham, J., Benson, A., Calvin, M. (1950). The path of carbon in photosynthesis. *J Biol Chem*. 185 (2): 781–7. doi:10.2172/910351. PMID 14774424
- Belkacem, M., Khodir, M., & Abdelkrim, S. (2008). Treatment characteristics of textile wastewater and removal of heavy metals using the electroflotation technique. *Desalination*, 228(1), 245–254. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2007.10.013>
- Bhat, U. N., & Khan, A. B. (2011). Heavy metals: An ambiguous category of inorganic contaminants, nutrients and toxins. *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(8), 1–9. <http://doi.org/10.3923/rjes.2011>.
- Borba, C. E., Guirardello, R., Silva, E. A., Veit, M. T., & Tavares, C. R. G. (2006). Removal of nickel(II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochemical Engineering Journal*, 30(2), 184–191. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.001>
- Bradl, H. (2005). *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation* (Vol.6). Academic Press.
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D., & Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal O F Geochemicul Exploration*,

7, 49–57.

- Castañé, P. M., Sánchez-Caro, A., & Salibián, A. (2015). Water quality of the Luján river, a lowland watercourse near the metropolitan area of Buenos Aires (Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(10), 645. <http://doi.org/10.1007/s10661-015-4882-y>
- Cervantes, C., Saldaña, A. E., Aguilar, F. A., Rodríguez, I. L., Cano, M. R., Rodríguez, M. A., ... Sánchez, R. M. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203–210.
- Chamnongpol, S., & Groisman, E. A. (2002). Mg²⁺ homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Molecular microbiology*, 44(2), 561-571.
- Charentanyarak, L. (1999). Heavy metals removal by chemical coagulation and precipitation. *Water Science and Technology*, 39(10), 135–138. [http://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00304-2](http://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00304-2)
- Cobbina, S. J., Duwiejuah, A. B., Quansah, R., Obiri, S., & Bakobie, N. (2015). Comparative Assessment of Heavy Metals in Drinking Water Sources in Two Small-Scale Mining Communities in Northern Ghana. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 10620–34. <http://doi.org/10.3390/ijerph120910620>
- Dąbrowski, A., Hubicki, Z., Podkościelny, P., & Robens, E. (2004). Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere*, 56(2), 91–106. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.03.006>
- Das, K. K., Das, S. N., & Dhundasi, S. a. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 412–425.
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 35–56. [http://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](http://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)
- Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*, 174(3), 175–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041348>
- Einicker-Lamas, M., Morales, M. M., Miranda, K., Garcia-Abreu, J., Oliveira, A. J. F., Silva, F. L. S., & Oliveira, M. M. (2003). P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173(7), 559–564. <http://doi.org/10.1007/s00360-003-0365-5>
- Eitinger, T., Degen, O., Bohnke, U., & Muller, M. (2000). Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18029–33. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001978200>
- El Samrani, A. G., Lartiges, B. S., & Villieras, F. (2008). Chemical coagulation of combined sewer

- overflow: heavy metal removal and treatment optimization. *Water Research*, 42(4–5), 951–60. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.009>
- Emsley, J. (2011). *Nature's building blocks: everything you need to know about the elements*. Oxford University Press.
- Fabiano, C. C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J. C., & Mazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 754. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00754>
- Fan, H. jung, Shu, H. Y., Yang, H. S., & Chen, W. C. (2006). Characteristics of landfill leachates in central Taiwan. *Science of the Total Environment*, 361(1–3), 25–37. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.033>
- Flouty, R., & Khalaf, G. (2015). Role of Cu and pb on Ni bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*: Validation of the biotic ligand model in binary metal Mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113(113), 79–86. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.022>
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., & Salt, D. E. (2004). Increased Glutathione Biosynthesis Plays a Role in Nickel Tolerance in *Thlaspi* Nickel Hyperaccumulators. *The Plant Cell Online*, 16(8), 2176–2191. <http://doi.org/10.1105/tpc.104.023036>
- Freeman, J. L., & Salt, D. E. (2007). The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyl-transferase. *BMC Plant Biology*, 7, 63. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-7-63>
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Gajdosova, J., & Reichrtova, E. (1996). Different growth response of *Euglena gracilis* to Hg, Cd, Cr and Ni compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 354(5–6), 641–2. <http://doi.org/10.1007/s0021663540641>
- Gamboa-Rodriguez, T., Gamboa-Adeco, R., Saldivar-Osorio, L., & Gomez-Cruz, R. (2012). Metals in water samples from an urban lagoon in Tabasco, Mexico. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 6(3), 170-175.
- García-García, J. D., Olin-Sandoval, V., Saavedra, E., Girard, L., Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(10), 1567–1575. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.002>
- García-García, J. D., Rodríguez-Zavala, J. S., Jasso-Chávez, R., Mendoza-Cozatl, D., & Moreno-Sánchez, R. (2009). Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*, 191(5), 431–440. <http://doi.org/10.1007/s00203-009-0469-8>

- García-García, J. D., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology Advances*, (1). <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.003>
- Garrett, R. G. (2000). Natural Sources of Metals to the Environment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 6(6), 945–963. <http://doi.org/10.1080/10807030091124383>
- Goharshadi, E. K., & Moghaddam, M. B. (2015). Adsorption of hexavalent chromium ions from aqueous solution by graphene nanosheets: kinetic and thermodynamic studies. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), 2153–2160. <http://doi.org/10.1007/s13762-014-0748-z>
- Grass, G., Große, C., & Nies, D. H. (2000). Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia sp.* Strain CH34. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1390.
- Gratão, P. L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 53–64. <http://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100005>
- Grill, E., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(2), 439–443. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16593801>
- Gutiérrez, J. C., Martín-González, A., Díaz, S., & Ortega, R. (2003). Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*, 39(4), 461–467. <http://doi.org/10.1078/0932-4739-00021>
- Hargreaves, J. W., Lloyd, E. J. H., & Whitton, B. A. (1975). Chemistry and vegetation of highly acidic streams. *Freshwater Biology*, 5(6), 563–576. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1975.tb00156.x>
- Hertel, R. F., Maass, T., Müller, V. R., United Nations Environment Programme., International Labour Organisation., World Health Organization., & International Program on Chemical Safety. (1991). *Nickel*. World Health Organization.
- Howe, G., & Merchant, S. (1992). Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 98(1), 127–136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16668603>
- Huang, K., Li, J., & Xu, Z. (2010). Characterization and recycling of cadmium from waste nickel-cadmium batteries. *Waste Management*, 30(11), 2292–2298. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.05.010>
- Hutner, S.H., Bach, M.K. and Ross, G.T.M. (1956.) A sugar-containing basal medium for vitamin

- B-12 assay with *Euglena*: application to body fluids. *J Protozool* 3, 101–105.
- IARC. (2012). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 100c.).
- Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J., and Reeves, R.D. (1976). *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* 193, 579–580.
- Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., & Murayama, T. (1995). Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 164–168. <http://doi.org/10.1007/BF01569899>
- Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W., & Salnikow, K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1–2), 67–97. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.021>
- Kazakou, E., Adamidis, G. C., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Godino, M., & Dimitrakopoulos, P. G. (2010). Species adaptation in serpentine soils in Lesbos Island (Greece): Metal hyperaccumulation and tolerance. *Plant and Soil*, 332(1), 369–385. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0302-9>
- Kerkeb, L., & Krämer, U. (2003). The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, 131(2), 716–724. <http://doi.org/10.1104/pp102.010686>
- Kim, H. M., Ahn, B.-E., Lee, J.-H., Roe, J.-H., Mulrooney, S. B., Hausinger, R. P., ... Zhou, C. Z. (2015). Regulation of a nickel–cobalt efflux system and nickel homeostasis in a soil actinobacterium *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics*, 7(4), 702–709. <http://doi.org/10.1039/C4MT00318G>
- Komilis, D., Bandi, D., Kakaronis, G., & Zouppouris, G. (2011). The influence of spent household batteries to the organic fraction of municipal solid wastes during composting. *The Science of the Total Environment*, 409(13), 2555–66. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.044>
- Kozhevnikova, A. D., Seregin, I. V., Erlikh, N. T., Shevyreva, T. A., Andreev, I. M., Verweij, R., & Schat, H. (2014). Histidine-mediated xylem loading of zinc is a species-wide character in *Noccaea caerulea*. *New Phytologist*, 203(2), 508–519. <http://doi.org/10.1111/nph.12816>
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J. M., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635–638. <http://doi.org/10.1038/379635a0>
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I. S., Olín-Sandoval, V., García-García, J. D., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 193, 216–224. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.056>
- MacDiarmid, C. W., & Gardner, R. C. (1998). Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 273(3), 1727-1732.
- Macomber, L., & Hausinger, R. P. (2011). Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 3(11), 1153–62. <http://doi.org/10.1039/c1mt00063b>
- Manankina, E. E., Mel'nikov, S. S., Budakova, E. A., & Shalygo, N. V. (2003). Effect of Ni²⁺ on Early Stages of Chlorophyll Biosynthesis and Pheophytinization in *Euglena gracilis*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(3), 390–394. <http://doi.org/10.1023/A:1023834606806>
- Margulis, L., & Schwartz, K. (1981). *Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra*. Serie "Por una educación popular". Facultad de Ciencias .UNAM.
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1), 67–78.
- Mendoza-Cózatl, D. G., Rangel-González, E., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺, and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), 521–528. <http://doi.org/10.1007/s00244-005-0207-4>
- Mendoza-Cózatl, D. G., Rodríguez-Zavala, J. S., Rodríguez-Enríquez, S., Mendoza-Hernandez, G., Briones-Gallardo, R., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Euglena gracilis*. *FEBS Journal*, 273(24), 5703–5713. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05558.x>
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4).
- Miot, J., Morin, G., Skouri-Panet, F., Féraud, C., Poitevin, A., Aubry, E., ... Brown, G. E. (2009). Speciation of arsenic in *Euglena gracilis* cells exposed to As(V). *Environmental Science & Technology*, 43(9), 3315–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534152>
- Nakazawa, R., Kameda, Y., Ito, T., Ogita, Y., Michihata, R., & Takenaga, H. (2004). Selection and characterization of nickel-tolerant tobacco cells. *Biologia plantarum*, 48(4), 497-502.
- Nishimura, K., Igarashi, K., & Kakinuma, Y. (1998). Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1962–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537401>
- Olaveson, M. M., & Nalewajko, C. (2000). Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia*, 433(1/3), 39–56. <http://doi.org/10.1023/A:1004006401516>
- Ölmez, T. (2009). The optimization of Cr(VI) reduction and removal by electrocoagulation using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2), 1371–1378. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.017>

- Pane, E. F., Smith, C., McGeer, J. C., & Wood, C. M. (2003). Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 37(19), 4382-4389.
- Qdais, H. A., & Moussa, H. (2004). Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: a comparative study. *Desalination*, 164(2), 105–110. [http://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00169-9](http://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00169-9)
- Rai, S., Bhaskar, Goel, S. K., Nath Dwivedi, U., Sundar, S., Goyal, N., ... Hardiman, G. (2013). Role of Efflux Pumps and Intracellular Thiols in Natural Antimony Resistant Isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*, 8(9), e74862. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074862>
- Randhawa, V. K., Zhou, F., Jin, X., Nalewajko, C., & Kushner, D. J. (2001). Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus f. alternans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(11), 987–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766059>
- Richau, K. H., Kozhevnikova, A. D., Seregin, I. V., Vooijs, R., Koevoets, P. L. M., Smith, J. A. C., ... Schat, H. (2009). Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 183(1), 106–116. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x>
- Rodrigue, A., Effantin, G., & Mandrand-Berthelot, M.-A. (2005). Identification of rcnA (yohM), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2912–6. <http://doi.org/10.1128/JB.187.8.2912-2916.2005>
- Rodríguez-Zavala, J. S., García-García, J. D., Ortiz-Cruz, M. a, & Moreno-Sánchez, R. (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 42(February 2013), 1365–1378. <http://doi.org/10.1080/10934520701480326>
- Ruiz, L. B., Rocchetta, I., dos Santos Ferreira, V., & Conforti, V. (2004). Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. *Phycological Research*, 52(2), 168–173. <http://doi.org/10.1111/j.1440-183.2004.00338.x>
- Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R., & García-García, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 19–31. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.009>
- Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodríguez, A., ... Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 104–112. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.027>
- Sar, P., Kazy, S. K., & Singh, S. P. (2001). Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas*

- aeruginosa* and its chemical nature. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 257–261. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00878.x>
- Schiff, J.A., Lyman, H. and Russell, G.K. (1971). Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Meth Enzymol* 23, 143–162.
- Schmidt, T., & Schlegel, H. G. (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *Journal of Bacteriology*, 176(22), 7045–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961470>
- Shim, H. Y., Lee, K. S., Lee, D. S., Jeon, D. S., Park, M. S., Shin, J. S., ... Chung, D. Y. (2014). Application of Electrocoagulation and Electrolysis on the Precipitation of Heavy Metals and Particulate Solids in Washwater from the Soil Washing. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3(4), 130–138. <http://doi.org/10.4236/jacen.2014.34015>
- Singh, R. P., & Agrawal, M. (2008). Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28(2), 347–358. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.010>
- Sinha, S., & Pandey, K. (2003). Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle under repeated metal exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(August), 1175–1183. <http://doi.org/10.1007/s00128-003-8896-8>
- Smith, R. L., & Maguire, M. E. (1995). Distribution of the CorA Mg²⁺ transport system in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 177(6), 1638-1640.
- Smith, R. L., Gottlieb, E., Kucharski, L. M., & Maguire, M. E. (1998). Functional similarity between archaeal and bacterial CorA magnesium transporters. *Journal of bacteriology*, 180(10), 2788-2791.
- Smith, S. R. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International*, 35(1), 142–156. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2008.06.009>
- Tripathi, V. N., & Srivastava, S. (2006). Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of *Pseudomonas putida* S4. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4), 287–292. <http://doi.org/10.1139/w05-133>
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marquès, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., ... Lobiński, R. (2003). Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Analytical Chemistry*, 75(11), 2740–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948144>
- Vargas, E., Álvarez, H., & Cervantes, C. (1998). Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 40(1), 53–71.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., & Rea, P. A. (2000). Mechanism of heavy metal ion

- activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31451–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M002997200>
- Vazquez, G. F., Delgado, H. D., De la Huerta, C. J., Aguilera, L. G., & Sharma, V. K. (1993). Trace and heavy metals in San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico. *Environment International*, 19(1), 71–77. [http://doi.org/10.1016/0160-4120\(93\)90008-6](http://doi.org/10.1016/0160-4120(93)90008-6)
- Villalba Atondo, A. I., Del Castillo Alarcón, J. M., Gómez Álvarez, A., Pérez Villalba, A. M., Nubes Ortiz, G., & Salcido Esquer, A. (2013). Contaminación del agua y suelo en el ecosistema Río Agua Prieta, Sonora, México. *Biocencia*, 15(1), 3. <http://doi.org/10.18633/bt.v15i1.129>
- WHO. (2005). *Nickel in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*.
- Worms, I. A., & Wilkinson, K. J. (2007). Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects. *Environmental science & technology*, 41(12), 4264–4270.
- Zadvornyy, O. A., Allen, M., Brumfield, S. K., Varpness, Z., Boyd, E. S., Zorin, N. A., ... Peters, J. W. (2010). Hydrogen enhances nickel tolerance in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 834–40. <http://doi.org/10.1021/es901580n>
- Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., & Gladyshev, V. N. (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics*, 10, 78. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-78>