



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Resistencia y acumulación de  $Pb^{2+}$  en  
*Euglena gracilis***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Bióloga**

**P R E S E N T A :**

**Mariel Hernández Garnica**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Rosina Sánchez Thomas**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2020**



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

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la asesoría de la Dra. Rosina Sánchez Thomas en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

### **Comité tutorial:**

Dra. Rosina Sánchez Thomas

**Departamento de bioquímica**

Dra. María del Rocío Cruz Ortega

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Emma Saavedra Silva

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Dr. Juan Luis Chávez Pacheco

Agradezco al comité tutorial por las sugerencias y comentarios realizados a mi escrito de tesis. Además, expreso mi aprecio al departamento de bioquímica y a mi asesora por las propuestas, el apoyo en la formulación de mi proyecto y por ayudarme a crecer en el ámbito científico y académico.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Ese trabajo está dedicado a mis primeros padres, Ma. Eugenia y Víctor Hugo por la educación que me proporcionaron y por mostrarme su amor incondicional.

A mis hermanas, Magaly y Melissa por ser parte esencial de mi vida y compartir conmigo los pequeños infiernos y los bastos días de felicidad.

A mis segundos padres, Felisa y Toribio por brindarme el motivo de conseguir las metas que me proponga y su apoyo infinito.

A Héctor y Silvia por sus consejos sinceros, su esfuerzo y por permitirme convivir con su apreciada familia.

A Rodri por coincidir en los momentos azarosos que nos han llevado hasta el aquí y ahora.

A mi tutora Rosina por su paciencia, dedicación, enseñanzas, sugerencias universales y formar parte de mi desarrollo académico y personal. También a Jorge Donato, quien fue parte de mis inicios en el departamento de bioquímica y que de igual manera apoyó con consejos académicos.

Gracias a todos por confiar en mi.

<b>ÍNDICE</b>		<b>Páginas</b>
Abreviaturas		1
1.	Resumen	2
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	5
	3.1 Propiedades fisicoquímicas del plomo	5
	3.2 Historia del uso del plomo	6
	3.3 Toxicidad del plomo	7
	3.4 Contaminación por plomo en México	10
	3.5 <i>Euglena gracilis</i> como modelo de estudio	12
	3.6 Mecanismos de resistencia a metales pesados	14
	3.7 Mecanismos de resistencia a plomo	17
4.	Hipótesis	20
5.	Objetivos	20
6.	Materiales y métodos	20
	6.1 Análisis de la precipitación de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	20
	6.1.1 Transmitancia	20
	6.1.2 Solubilidad	21
	6.2 Cultivo de <i>Euglena gracilis</i> fotosintética en medio Hutner	21
	6.3 Conteo celular	22
	6.4 Exposición a $\text{Pb}^{2+}$ y determinación de la acumulación	23
	6.5 Determinación de plomo y calcio total	24
	6.5.1 Plomo contaminante durante el proceso de cosecha celular	25
	6.6 Cuantificación de la clorofila a+b	25
	6.7 Medición del consumo (respiración) y producción de oxígeno (fotosíntesis)	26
	6.8 Determinación de moléculas quelantes	26
	6.8.1 Moléculas con grupos tiol	26

6.8.2	Moléculas fosfatadas	27
6.9	Análisis estadístico	28
7	Resultados	28
7.1	Precipitación del $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$	28
7.2	Caracterización microbiológica y bioquímica de <i>E. gracilis</i> expuesta a $\text{Pb}^{2+}$	30
7.2.1	Capacidad de acumulación de $\text{Pb}^{2+}$	30
7.2.2	Susceptibilidad de <i>E. gracilis</i> a $\text{Pb}^{2+}$	31
7.2.2.1	Clorofila	32
7.2.2.2	Respiración y Fotosíntesis	33
7.3	Mecanismos de resistencia y acumulación	34
7.3.1	Moléculas quelantes	34
7.3.1.1	Moléculas con grupos tiol	34
7.3.1.2	Polifosfatos	37
7.3.2	Participación de la cantidad basal de moléculas quelantes	38
7.3.3	Regulación del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la acumulación de $\text{Pb}^{2+}$	39
8	Discusión	44
9	Conclusiones	49
10	Perspectivas	50
11	Referencias bibliográficas	50

## ABREVIATURAS

Cys	Cisteína
DE	Desviación estándar
DTNB	5,5'-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico)
EAA	Espectrofotómetro de absorción atómica
Eg	Células crecidas en medio Hutner
Eg-F	Células crecidas en medio sin fosfato
Eg-S	Células preacondicionadas en medio deficiente de sulfato
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FQs	Fitoquelatinas
$\gamma$ -EC	gamma-glutamíl cisteína
GSH	Glutación
hFQs	Homofitoquelatinas
hGSH	Homoglutación
mq	Milli-Q
PCA	Ácido perclórico
PLibre	Fosfato libre
PolyGSH	Polímeros de glutación
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
PTotal	Fosfato Total
PolyP	Polifosfatos

## 1. RESUMEN

México es un país con gran actividad minera e industrial, los remanentes de estas actividades han aumentado la biodisponibilidad de metales pesados en diferentes zonas de nuestro país, y como consecuencia se han provocado problemas graves de salud en las poblaciones aledañas. Para resolver esta situación se han estipulado normas gubernamentales que establecen métodos físico-químicos para remover los metales pesados del suelo y el agua. Sin embargo, dichos métodos no son completamente eficientes ya que generan contaminantes secundarios. La biorremediación es un proceso que busca implementar el uso de organismos con la capacidad para remover contaminantes del medio. Un ejemplo de esto es el protista *Euglena gracilis*, el cual puede crecer en sitios contaminados por metales pesados y acumularlos.

Este trabajo tuvo como objetivo general evaluar los mecanismos de resistencia y acumulación de  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis* fotosintética. Para ello se expusieron células a 50, 100 y 200  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$  durante 8 días en un medio de cultivo que contiene glutamato y malato como fuente de carbono. Los resultados mostraron que la exposición a  $Pb^{2+}$  no afectó el crecimiento, la viabilidad, la cantidad de clorofila, el consumo (respiración) y producción de oxígeno (fotosíntesis) a pesar de que este microorganismo resultó ser un hiperacumulador de este metal (3971mg Pb/Kg<sub>PS</sub>). Además, los niveles intracelulares de moléculas quelantes con grupos tiol (cisteína,  $\gamma$ -glutamil cisteína, glutatión y polímeros de glutatión) y los polifosfatos no cambiaron respecto a las células no expuestas a  $Pb^{2+}$ , sin embargo la cantidad basal de estos metabolitos fueron suficientes para inactivar el metal acumulado. Dado que el  $Pb^{2+}$  puede ingresar por transportadores de  $Ca^{2+}$  a la célula, se evaluaron los mismos parámetros toxicológicos antes mencionados en ausencia de  $Ca^{2+}$ . La ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio de cultivo no modificó la susceptibilidad a  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis*, pero si disminuyó la acumulación de  $Pb^{2+}$ .

Los resultados indicaron que *E. gracilis* es un microorganismo que puede tolerar e hiperacumular  $Pb^{2+}$ , y que la presencia de  $Ca^{2+}$  facilita la acumulación del  $Pb^{2+}$ . Además de que la cantidad basal de polifosfatos es uno de los mecanismos asociado a la tolerancia e hiperacumulación de  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis*.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son componentes naturales que se encuentran en la corteza terrestre, principalmente en forma de hidróxidos, óxidos, sulfuros, sulfatos, fosfatos, silicatos y compuestos orgánicos (Vhahangwele y Khathutshelo, 2018). La emisión de estos elementos puede ocurrir bajo ciertas condiciones ambientales, como las erupciones volcánicas, la dispersión por las sales marinas, los incendios forestales, la erosión de las rocas o la transmisión de partículas del suelo que difunden por fuentes biogénicas o por el viento. No obstante, las actividades humanas indiscriminadas han alterado drásticamente sus ciclos biogeoquímicos (Singh *et al.*, 2011; Masindi y Muedi, 2018). Las fuentes de contaminación antropogénicas incluyen los desechos industriales, la actividad minera, las prácticas agrícolas, las emisiones de automóviles y la actividad militar (Järup, 2003; Banik *et al.*, 2013). Las actividades humanas son las que principalmente han contribuido al problema por contaminación de metales pesados desde la Revolución Industrial, y ha persistido debido al rápido desarrollo de industrias (minera, acabado de superficies, producción de energía y combustible, fertilizantes, pesticidas, metalúrgica, galvanoplastia, electrólisis, electro-ósmosis, curtiduría, fotográfica, producción de aparatos electrodomésticos, tratamiento de metales superficiales) e instalaciones aeroespaciales y de energía atómica (Förstner- Wittmann, 1981; Das *et al.*, 2008).

La contaminación por metales pesados es un serio problema ambiental que requiere de un mayor enfoque en la investigación, ya que amenaza no solo con la calidad del aire y la estabilidad en los suelos, sino también con los ecosistemas acuáticos y por lo tanto con la salud humana, a través de la contaminación de alimentos y agua potable (Haiyan y Stuanes, 2003; Cheng *et al.*, 2002). Un ejemplo, es la concentración elevada de plomo (0.05-0.12 ppm; 0.24-0.57  $\mu\text{M}$ ) que se encontró en muestras de agua de uso doméstico en Hermosillo, Guaymas y Nacozari, localidades del norte de México (Wyatt *et al.*, 1998), lo cual rebasa 2-5 veces la concentración de plomo máxima establecida para consumo humano que es de 0.025 ppm ó 0.1  $\mu\text{M}$  (NOM 127, 1994; NOM 001, 1996). Es por ello que toma relevancia el tratamiento de agua contaminada por metales pesados, para ser utilizada en las actividades de la vida diaria de los seres humanos.

Existen métodos fisicoquímicos implementados con el objetivo de disminuir la concentración de metales contaminantes en el agua; alguno de estos métodos están considerados dentro de la NOM-127 de 1994. Los métodos fisicoquímicos más conocidos

son: **i) precipitación química**, que consta de producir precipitados insolubles de metales pesados con coagulantes o a base de procesos de floculación como el uso de hidróxido, sulfuro, carbonato o fosfato modulando el pH para que puedan ser fácilmente removidos (Barakat, 2011; Gunatilake, 2015); **ii) la filtración** que es un proceso en el que se ejerce presión para hacer pasar el agua a través de una membrana, permitiendo que el metal pesado quede retenido y dependiendo del tamaño del poro es llamada ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa (Kurniawan *et al.*, 2006); **iii) el intercambio iónico** es un proceso que produce una permuta reversible de iones entre una fase sólida y una líquida, donde una sustancia insoluble (resina) elimina los iones de la solución y libera otros de carga similar en una cantidad equivalente (Barakat, 2011). Sin embargo, aunque existen métodos para remover estos contaminantes, los costos involucrados en la construcción de plantas de tratamiento de aguas residuales son elevados, consumen mucho espacio y tienen problemas de eliminación de residuos (Jaishankar *et al.*, 2014b).

La problemática de eliminación de metales pesados ha conducido a la búsqueda de alternativas, en este sentido, se sabe que los microorganismos están íntimamente involucrados en la biogeoquímica de estos contaminantes, con una variedad de procesos que determinan su movilidad, y por lo tanto su biodisponibilidad (Gad, 2004). Debido a esto, se ha intentado implementar a la biorremediación como un proceso para la remoción de metales pesados, ya que ciertos organismos tienen la capacidad de modificar su estado de oxidación o formar diferentes complejos orgánicos, con los que podría cambiar su biodisponibilidad, su solubilidad, y por lo tanto, influir en su toxicidad (Mosa *et al.*, 2016; Garbisu y Alkorta, 2003; Dzionek *et al.*, 2016). Además, la biorremediación puede ser una tecnología alternativa o complementaria a los procesos fisicoquímicos, debido a la simplicidad, eficiencia, bajo costo y a la generación de una menor cantidad de contaminantes secundarios (Gupta *et al.*, 2016). Con respecto a la cuestión económica, estimar el costo del proceso de biorremediación es complejo, debido a que depende del contaminante, el tipo de suelo, la hidrogeología del sitio y la química del agua. Sin embargo, existen casos con métodos de bioaumentación y bioestimulación, en los cuáles se intensifican componentes del medio para favorecer el número de individuos que promueven la remediación de un sitio contaminado. En este ejemplo, los costos estimados fueron de \$30-100 US por metro cúbico de suelo y para agua residual de \$40-60 US por litro, para el caso de la fitorremediación (uso de plantas para la remoción de contaminantes del suelo) se calculó de \$60 000-100 000 US por un acre (4,046.86 m<sup>2</sup>) de suelo contaminado. Estos estimados reflejan la ventaja económica del uso de

microorganismos, ya que al comparar con los métodos físicos, el precio estimado se encuentran entre \$ 400,000- 700,000 USD por acre (Augé y Brès, 2010).

Por otra parte, existen ventajas en el uso de microorganismos para la remoción de contaminantes, ya que algunos presentan la capacidad para crecer en cuerpos de aguas residuales con altas concentraciones de metales pesados, con limitaciones nutricionales, pH y temperaturas extremas, generando altos rendimientos de biomasa. También, su crecimiento puede requerir instalaciones más pequeñas, menos costosas, además de que estos procesos pueden eficientizarse mediante modificación genética de estos microorganismos (García-García *et al.*, 2016). Considerando las características anteriores, que resultan ser de utilidad en cuanto a las demandas de crecimiento, los datos de investigación disponibles indican que los protistas del género *Euglena* son un grupo altamente prometedor para ser utilizados para la biorremediación de ambientes acuáticos, ácidos y contaminados con metales pesados (Schwartzbach y Shigeoka, 2017).

La contaminación por  $Pb^{2+}$  que existe debido a las actividades humanas y el descontrol generado en los ciclos biogeoquímicos, es de interés al aporte del conocimiento que engloba a la biorremediación. Por lo tanto, este estudio pretende ampliar el conocimiento a nivel de ciencia básica para comprender los mecanismos de resistencia y acumulación de  $Pb^{2+}$ , con el objetivo de brindar las bases para hacer más eficientes los métodos ya existentes, y promover la aplicación de nuevas técnicas con un menor costo y más afables desde el punto de vista ecológico.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL PLOMO**

El plomo es un elemento perteneciente a la familia IVA, se ubica en el periodo 6, su número atómico corresponde a 82 y su masa atómica es de 208.2 g/mol. El plomo es considerado como un metal pesado ya que presenta una alta densidad (11.34 g/mL), maleabilidad y gran capacidad de conducción eléctrica. Sin embargo, debido a sus características químicas no es tan reactivo como los elementos del bloque *d* (metales de transición), ya que su configuración electrónica es  $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$ , lo que indica que

pertenece a los elementos del bloque *p* que tienden a ganar electrones para completar los niveles de valencia (Atkins y Jones, 1998; Cotton y Wilkinson, 1999).

Se ha descrito que el plomo se puede encontrar con el número de oxidación II y IV, también se sabe que puede formar múltiples compuestos con una gran variedad de estructuras, lo cual podría influir en su toxicidad y su presencia en el ambiente, además de la concentración. Es por ello que el número de coordinación, que hace referencia al número de aniones por el cual está rodeado un catión (con signos opuestos), también ha tomado importancia. Para el caso de la valencia II, el número de coordinación corresponde a 2, 4, 6, 7 y para la de IV es 4, 6, 8 (Parr, 1996; Cotton y Wilkinson, 1999; Kumar y Prasad, 2018), siendo el primero (II) el más común y para el cual se han vinculado casos de intoxicación, ya que se sabe que de esta forma se absorbe con mayor eficacia por el tracto gastrointestinal. Además, el número de coordinación del plomo es una cualidad que también está relacionada con su fácil precipitación, ya que existen diversas sales cristalinas de plomo, que exceptuando el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y el  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (que se ioniza parcialmente en el agua), la mayor parte de estas resultan ser poco solubles ( $\text{PbF}_2$ ,  $\text{PbCl}_2$ ) o insolubles en agua ( $\text{PbSO}_4$ ,  $\text{PbCrO}_4$ , etc.). Dicho conocimiento proporciona una mayor comprensión de los factores que controlan la solubilidad del plomo en las aguas potables o contaminadas, y por lo tanto puede ayudar a entender los medios más rentables de control de plumbosidad (Harrison y Laxen, 1980; Cotton y Wilkinson, 1999).

### 3.2 HISTORIA DEL USO DEL PLOMO

El plomo se encuentra presente en la corteza terrestre de forma natural y en pequeñas cantidades (0.002 %). Este elemento se obtiene generalmente a partir de la galena ( $\text{PbS}$ ), la anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ) y la curocita ( $\text{PbCO}_3$ ) (Covarrubias y Peña-Cabriales, 2017). Se tiene documentado que las primeras extracciones de plomo se llevaron a cabo en la región de Anatolia alrededor del año 3500 a.C., lo que sugiere que el plomo fue uno de los primeros riesgos ambientales descritos en la historia de la humanidad (Robles-Osorio y Sabath, 2014). En la antigüedad, la población de Egipto, Grecia y Roma utilizaba al plomo como pesario, polvo cosmético (*kohl*), en esculturas, pinturas, vasijas, tuberías y utensilios de barro y metal. Posteriormente, sus propiedades físicas como un bajo punto de fusión, alta maleabilidad, resistencia a la corrosión y gran densidad, aumentó su uso

industrial, ocupando el quinto lugar en la lista de metales más utilizados en el mundo (Scoullos *et al.*, 2001; Karrari *et al.*, 2012; Robles-Osorio y Sabath, 2014).

Este metal se asoció con más de 900 industrias, incluidas la minería, fundición, refinación, fabricación de baterías, etc. Adicional a esto, se han descrito aplicaciones como en los pesticidas, en la mejora del octanaje de la gasolina con el uso de tetraetilo de plomo como antidetonante en los sistemas de tráfico vehicular, en la fabricación de impermeabilizantes, en equipos utilizados para el manejo de ácidos, y también para su uso como un escudo contra la radiación o para la reducción del ruido generado por maquinaria (Hernberg, 2000; Scoullos *et al.*, 2001). Sin embargo, a partir de los años 70 se comenzó a regular el uso del plomo en productos de empleo cotidiano. Los principales productos prohibidos en EU que se reportan en el Environmental Health Trust (EHT) son: la gasolina (1970), pintura a base de plomo (1978), tuberías/soldaduras (1978), envases de alimentos (1991), juguetes, crayones, joyas (1998) y candeleros (2003). Además, los combustibles que presentaron antidetonantes a base de plomo fueron los que tomaron mayor importancia, ya que se relacionaron situaciones severas de intoxicación con este metal. Un ejemplo, es el caso de la muerte de 13 trabajadores y otros 40 en observación por envenamamiento con plomo en las plantas de General Motors, Standard Oil y Dupont (EHT, 2018). Sin embargo, no fue la única problemática existente en EU, ya que hay reportes que indican que los trabajadores de fábricas de baterías, municiones de soldadura y azulejos, radiadores de automóviles, cables e hilos, cerámicas con esmaltes de plomo y latas, plantas de fundición de plomo y de acero forman parte de la sociedad ocupacionalmente expuesta que pudo presentar toxicidad por plomo (Karrari *et al.*, 2012).

### **3.3 TOXICIDAD DEL PLOMO**

La toxicidad del plomo, en contraste con el mercurio y el cadmio, se conoce desde hace siglos. Hipócrates, en el 370 a.C, fue el primero en describir un cólico ocasionado por plomo, aunque no pudo reconocer la etiología de esta enfermedad (Proudfoot y Vale, 2003). Posteriormente, hace más de 2000 años el poeta y médico griego Nicander describió la enfermedad conocida como plumbismo o saturnismo, causada por envenenamiento agudo por plomo. Sin embargo, la primera descripción clínica moderna de la toxicidad del plomo fue hecha por Tanquerel des Planches titulada "*Traité des maladies de plomb ou saturnines*", la cual fue publicada en 1839 y se basó en el estudio

de 1,200 casos clínicos sobre efectos abdominales, neurológicos y artríticos relacionados con la exposición a plomo (Waldron y Stöfen, 1974; Förstner y Wittmann, 1981; Hernberg, 2000).

Actualmente, se sabe que la exposición a  $Pb^{2+}$  puede causar desde manifestaciones clínicas sutiles hasta complicaciones que ponen en peligro la vida, lo cual depende del periodo de exposición (Flora *et al.*, 2012). La exposición aguda puede causar pérdida de apetito, dolor de cabeza, hipertensión, dolor abdominal, disfunción renal, fatiga, insomnio, artritis, alucinaciones y vértigo; mientras que una exposición crónica puede provocar discapacidad intelectual, defectos de nacimiento, psicosis, autismo, alergias, dislexia, pérdida de peso, parálisis, debilidad muscular, daño cerebral, daño renal, e incluso la muerte (Jan *et al.*, 2015). Actualmente, existe evidencia de que la exposición al  $Pb^{2+}$  puede conducir a una variedad de trastornos neurológicos, como daño cerebral, retraso mental, problemas de comportamiento, irrumpe la conducción de señales nerviosas y posiblemente interviene en las enfermedades como Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia (Singh *et al.*, 2018). Varias de estas manifestaciones caracterizaron a la clásica enfermedad conocida como plumbismo. A continuación, se muestran las concentraciones de plomo en las que se comienzan a identificar las características clínicas anteriormente mencionadas, en niños o adultos (Fig. 1).

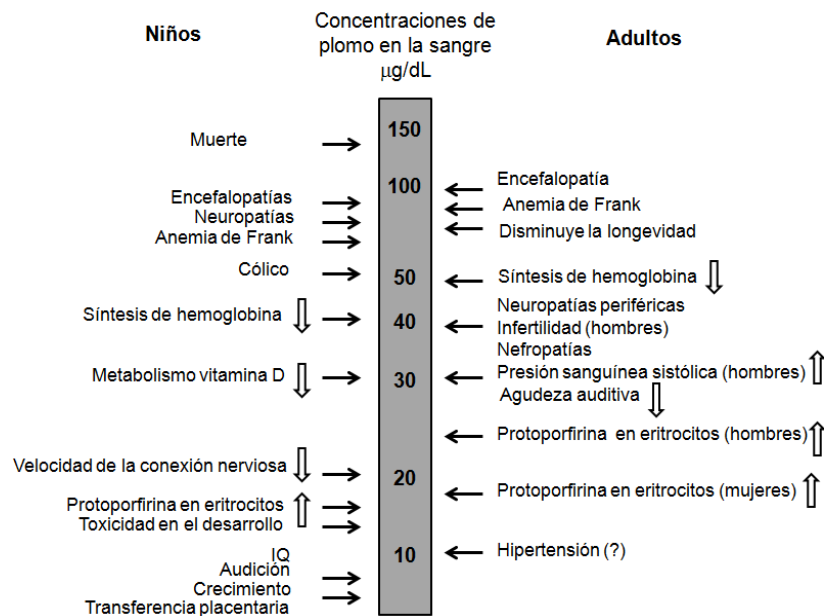


Figura 1. Efectos del plomo inorgánico en niños y adultos (Gurer y Ercal, 2000).

El principal mecanismo molecular que está asociado a la toxicidad del  $Pb^{2+}$  es su capacidad para reemplazar otros cationes bivalentes esenciales como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , entre otros. El  $Pb^{2+}$  puede entrar a la célula por transportadores de  $Ca^{2+}$ , y dentro puede unirse con alta afinidad a los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  en proteínas reguladoras como la calmodulina (Jaishankar *et al.*, 2014). La calmodulina es una proteína encargada de la organización de las proteínas de membrana y el movimiento del citoesqueleto, también participa en procesos de inflamación, apoptosis, contracción muscular, crecimiento celular del sistema nervioso y en la respuesta inmune (BMRB, 2017). En este sentido, la exposición a  $Pb^{2+}$  puede provocar efectos neurológicos, a tal grado de ocasionar disrupción en la comunicación de los astrocitos y células endoteliales, lo cual incrementa la susceptibilidad a padecer edemas, encefalopatías y daño irreversible al cerebro (Simons, 1988; Brochin *et al.*, 2008).

Por otro lado, el  $Pb^{2+}$  puede interactuar con otras proteínas al unirse a grupos amino, carboxilo, fosfato y sulfhidrilo (Wershaw, 1976; Barstad, 1977; Tamás *et al.*, 2014). Este metal posee un alta afinidad por los grupos tiol ( $-SH$ ), por lo que puede interferir con la biosíntesis del grupo hemo, al unirse con éstos presentes en las metaloenzimas e inhibirlas, como son la ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa ( $\delta$ -ALAD), coproporfirinógeno oxidasa y la ferroquelatasa, siendo el resultado final, el aumento de las protoporfirinas como la zinc-protoporfirina (ZPP), lo cual provoca un paro en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células adiposas, eritroides y neuronales de los mamíferos, que pueden desencadenar problemas de anemia y disfunción neuronal (Valdivia 2005; Bergonia *et al.*, 2015; Jan *et al.*, 2015).

El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene una cisteína, la cual posee un grupo tiol ( $-SH$ ) reactivo con potencial reductor. Debido a esto, el GSH juega un papel vital en la protección celular contra el estrés oxidante, ya que cede sus equivalentes reductores a las especies reactivas del oxígeno (ERO) para que sean estables (Gurer y Ercal, 2000). Sin embargo, el  $Pb^{2+}$  se une con gran afinidad al grupo tiol, lo que puede causar un aumento del nivel de ERO. Además, enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), que dependen de elementos traza y grupos prostéticos para realizar la desintoxicación enzimática de ERO, son objetivos potentes para la toxicidad que genera el  $Pb^{2+}$  (Jaishankar *et al.*, 2014).

Por otro lado, el  $Pb^{2+}$  puede afectar el sistema nervioso, debido a que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, puede sustituir los sitios que ocupa el  $Ca^{2+}$  y así

interferir en su acción reguladora para la formación de la vaina de mielina. De igual forma, se ha visto que afecta la proliferación celular y el desarrollo del sistema nervioso central mediante el estímulo a la proteína cinasa C, la cual pertenece a la familia de serina / treonina cinasas dependientes de fosfolípidos, y que juega un papel clave en muchas vías de señalización (Freeley *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2018).

Las protaminas son las proteínas nucleares espermáticas más abundantes y se encargan de proteger el DNA del esperma de diversas especies (Oliva, 2006). El  $Zn^{2+}$  es también necesario para la estabilidad de la cromatina del esperma, ya que éste se une a la protamina P2 (HP2). Existen estudios que indican que el  $Pb^{2+}$  se puede unir a la HP2 por dos diferentes sitios, de modo que puede reemplazar al  $Zn^{2+}$  ocasionando un cambio conformacional de la proteína, lo cual reduce la interacción HP2-DNA que conduce a la alteración en la condensación de la cromatina del esperma, reduciendo así la fertilidad (Quintanilla-Vega *et al.*, 2000).

### **3.4 CONTAMINACIÓN POR PLOMO EN MÉXICO**

México es un país que ha explotado sus recursos naturales, un ejemplo de ello es la extracción de metales con gran valor comercial, lo cual ha facilitado la biodisponibilidad de estos metales (González-Flores *et al.*, 2011; Covarrubias *et al.*, 2017). Por ejemplo, desde hace 100 años la empresa metalúrgica Met-Mex, Peñoles, S.A. de C.V. ha mostrado ser una de las más grandes en su tipo, colocando a México en el cuarto lugar entre los complejos fundidores primarios y secundarios a nivel mundial, y en América latina como el más grande (García-Vargas *et al.*, 2007). Sin embargo, su actividad ha puesto en peligro a la población aledaña a la zona, situada en Torreón Coahuila. En 1997, se hizo un estudio en donde se vió que más del 90% de los niños tenían altos niveles de plomo en sangre que superaban los  $10 \mu\text{g Pb/dL}$ , límite establecido en la NOM-199-SSA1-2000 (NOM 199, 2000; García-Vargas *et al.*, 2007).

Por otro lado, la actividad prolongada de las fundidoras ha provocado que no solo la minería sea una de las principales fuentes de contaminación ambiental por plomo y otros metales en México. Un ejemplo es la zona aledaña a la fundidora de Ávalos en Chihuahua, que debido a las altas cantidades de plomo que fueron depositadas después



de 90 años de actividad, se observó que la concentración de plomo en sangre de mujeres de edad reproductiva y en niños era cercana o igual a 50 µg Pb/dL (Ornelas *et al.*, 2007).

Este problema de contaminación se debe principalmente al manejo inadecuado de los residuos provenientes de fundidoras y mineras, lo que ha ocasionado problemas en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero, Sonora, Chihuahua y Coahuila. En Nacozari de García, Sonora y Taxco, Guerrero se cuantificaron 3-100 millones de toneladas de jales mineros, que son residuos de las mineras con altas concentraciones de metales u otros contaminantes, que estaban dispersando el plomo presente, y que para el caso de Guerrero contaminaron los ríos Cacalotenango y Taxco (Yañez *et al.*, 2003; García-Vargas *et al.*, 2007; Ornelas *et al.*, 2007; Meza-Figueroa *et al.*, 2009; Mireles *et al.*, 2012; Cortés-Jiménez *et al.*, 2013). Además, es importante mencionar que existe una gran cantidad de reportes sobre los efectos del plomo en la población de estas zonas, pero son pocos los datos que hay acerca de la concentración de plomo y otros metales en el agua que indiquen que se está superando el límite máximo permisible.

En la Tabla 1, se muestran ejemplos de cuerpos de agua contaminados con plomo en México, en donde se observa que se supera el límite máximo permisible para su consumo como agua potable (0.025 mg/L NOM-127-SEMARNAT-1994), aunque para la mayoría de los casos, no se supera el límite establecido para su uso principal, riego de cultivos. Sin embargo, para el caso de Guanajuato, por ejemplo, se describe que este cuerpo de agua abastece regiones aledañas a la zona para consumo humano, lo cual podría conducir a problemas de salud de intoxicación por plomo en la población.

**Tabla 1. Cuerpos de agua contaminados con plomo en México.**

<b>Cuerpo de agua</b>	<b>Concentración de plomo (mg/L)</b>	<b>Límite máximo permisible</b>
<b>Río Sonora, Sonora</b> (UNAM-CONAGUA, 2016)	0.28-2.5 [1.35-1.2 µM]	Agua potable 0.025 mg/L [0.12 µM] NOM-127-SEMARNAT-1994
<b>Río Atoyac, Puebla</b> (Méndez García <i>et al.</i> , 2000)	0.38 [1.83 µM]	
<b>Manto acuífero. Silao Romita, Guanajuato</b>	0.19-5.36	

(INEGI, 2016)	[0.91-25.8 $\mu\text{M}$ ]	Río para uso en riego 0.5 mg/L [2.4 $\mu\text{M}$ ] NOM-001-SEMARNAT-1996
<b>Río Tula.</b> <b>Valle del Mezquital, Hidalgo</b> (Gédron <i>et al.</i> , 2014)	0.16 [0.77 $\mu\text{M}$ ]	
<b>Manto acuífero</b> <b>Salamanca, Guanajuato</b> (Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)	0.093-0.29 [0.45-1.40 $\mu\text{M}$ ]	

Por otra parte, se ha tratado de hacer una correlación de los datos reportados de alimentos contaminados provenientes de Puebla e Hidalgo, que podrían estar siendo regados con agua de los ríos Atoyac (Puebla) y Tula (Hidalgo). Se observó que la leche y el queso en Puebla, y algunas frutas en Hidalgo superan de 3-20 veces el límite máximo permisible de plomo en alimentos de este tipo (Tabla 2). Estos datos sugieren que a pesar de que estos ríos no superan el límite permisible para su uso en riego, existe un claro impacto vinculado a la biomagnificación de plomo, proceso que se define como el aumento de la concentración del metal debido a su consumo en la cadena alimentaria. Además, ya se había descrito este proceso por la presencia de cadmio y arsénico en el zooplacton y las tilapias del río Tula (Rubio-Franchini *et al.*, 2016).

**Tabla 2. Concentración de plomo en alimentos que superan las concentraciones máximas permisibles establecidas por el CODEX Alimentarius de la FAO en México**

Alimento	Concentración de plomo (ppm)	Límite máximo permisible (ppm)
<b>Leche y queso</b> Santa Ana Xalmimilulco, Puebla. (Castro <i>et al.</i> , 2017)	0.03-0.07	0.020 CODEX Alimentarius 193- 1995
<b>Frutas</b> Valle del mezquital, Hidalgo. (Vázquez-Alarcón <i>et al.</i> , 2005)	2.0	0.1 CODEX Alimentarius 193- 1995

### 3.5 *Euglena gracilis* COMO MODELO DE ESTUDIO

*E. gracilis* es un miembro del género *Euglena* (Eukaryota, Excavata, Discoba, Euglenozoa, Euglenida, Spirocuta, Euglenophyceae, Euglenales, Euglenaceae, *Euglena*)

(Schwartzbach y Shigeoka, 2017), que son protistas flagelados unicelulares, provenientes de un linaje abundante y bien estudiado de organismos marinos y de agua dulce (Archibald, 2012). Los trabajos de investigación aplicada y básica utilizan a este microorganismo, principalmente porque es fácil de aislar y mantener en el laboratorio, debido a que tienen la capacidad de crecer en hábitats con diferente temperatura (15-33°C) y pH (3.0-9.0) (Kawabata *et al.*, 1990; Krajčovič *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Además de que puede metabolizar diversas fuentes de carbono en condiciones de crecimiento fotoautótrofo (usando luz solar), heterótrofo (usando una fuente de carbono, como glucosa, galactosa, fructosa, etanol, metanol, glicerol, piruvato, succinato, lactato, acetato y propionato) o mixotróficas (combinando ambos) (Gissibl *et al.*, 2019).

*E. gracilis* es un modelo de estudio en diferentes áreas, como en biología evolutiva, ya que este organismo presenta tres membranas en la estructura de sus plastidios, lo que ha permitido generar un mayor análisis dentro de la teoría endosimbiótica (Gibbs, 1978). En el área biotecnológica, se ha descrito que *E. gracilis* puede sintetizar diversos compuestos de interés industrial como: 1) la vitamina E, que puede ser usada para prevenir de enfermedades causadas por estrés oxidante y para preservar alimentos (Ogbonna *et al.*, 1999); 2) los 20 aminoácidos de los encontrados en proteínas y que son esenciales en la dieta humana como valina, metionina, leucina, isoleucina, treonina, triptófano y lisina (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010); 3) el polímero de glucosa llamado paramilo, que puede ser utilizado por sus propiedades antioxidantes, como complemento alimenticio y por sus efectos antitumorales y como inmunoestimulador (Nakashima *et al.*, 2017); y 4) los ésteres de cera, que se utilizan como materia prima para biodiésel (Furuhashi *et al.*, 2014).

Por otro lado, su importancia también radica en que *E. gracilis* es usada en el biomonitoreo de los contaminantes del agua, puesto que los efectos de estas sustancias afectan el crecimiento, la motilidad, la eficiencia fotosintética y la composición de los pigmentos fotosintéticos (Azizullah *et al.*, 2013). A pesar de ello, esta especie habita en aguas acidificadas y contaminadas con metales pesados, e incluso se les ha encontrado en mayor proporción que otros microorganismos, por ejemplo *Chlorella*, *Cylindrocystis*, *Botryococcus* y *Navicula* (Prasanna *et al.*, 2011). Lo anterior llevo a profundizar en su estudio, de manera que hoy en día se sabe que *E. gracilis* es un organismo que puede resistir, acumular y remover metales pesados, y se le reconoce con potencial en el campo de la biorremediación (Schwartzbach y Shigeoka, 2017).

### 3.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES PESADOS

Para la mayoría de los seres vivos, la exposición a altas concentraciones de metales pesados es extremadamente tóxica, no obstante, existen organismos que se han adaptado a los hábitats metalíferos, a partir del desarrollo de mecanismos que les permiten tolerar y/o resistir a cierto metal. Esto se debe al resultado de un proceso evolutivo, largo y gradual bajo una fuerte presión de selección, aunque la tolerancia adaptativa puede adquirirse en unos pocos años o incluso en una sola generación (Bert *et al.*, 2000; Wójcik *et al.*, 2015).

Existen distintos mecanismos de resistencia a metales pesados, como son: la unión a la pared celular (adsorción), la baja permeabilidad de la membrana plasmática, extrusión activa (ATPasas), biotransformación, compartimentación del metal en vacuolas y otros orgánulos intracelulares, y la inactivación con agentes quelantes, como las proteínas de unión a metales llamadas metalotioneínas (MTs) y péptidos como las fitoquelatinas (FQs) o compuestos no proteícos, tales como malato, citrato y polifosfatos (PolyP) (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007). Un ejemplo de lo anterior, son las paredes celulares microbianas que consisten principalmente de polisacáridos, lípidos y proteínas, que ofrecen muchos grupos funcionales que incluyen al carboxilato, hidroxilo, amino y fosfato que pueden unirse a metales pesados (Emenike *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha descrito que en plantas como *Fragaria x ananassa* la pared celular actúa como una barrera que previene la entrada del  $Cd^{2+}$ , de manera que adquiere una conformación diferente en su estructura que evita la unión con este metal (Parrotta *et al.*, 2015).

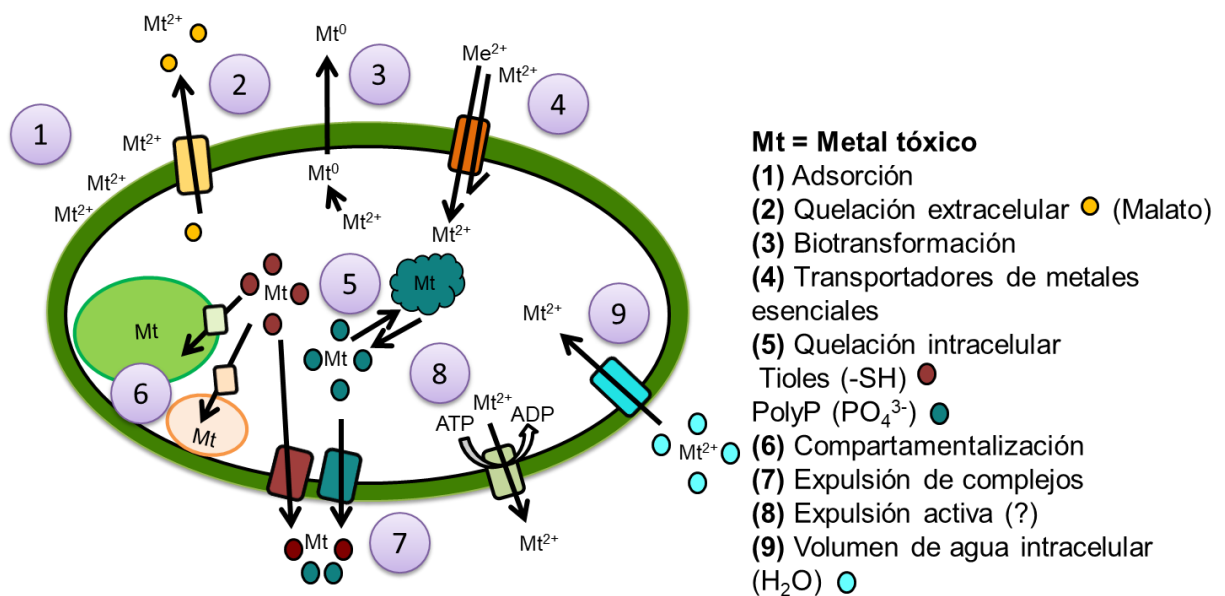
Por otra parte, aunque los metales pesados no se pueden degradar, algunos microorganismos tienen la capacidad de modificar su estado de oxidación mediante el proceso de biotransformación, lo cual genera que el metal se precipite o volatilice, y por lo tanto se vuelva menos biodisponible (Emenike *et al.*, 2018).

Los agentes quelantes son compuestos capaces de unirse a un ion metálico. Existe una gran variedad de metabolitos quelantes, como las FQs que son polímeros de GSH que se describieron por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, y posteriormente se caracterizaron en plantas de la división Angiospermae (Kondo *et al.*, 1983; Grill *et al.*, 1985; García- García *et al.*, 2016). Las metalotioneínas son proteínas pequeñas (~7,000 kDa) codificadas por un gen y que son ricas en grupos sulfhidrilo, las

cuales se unen a  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y pequeñas cantidades de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y quizás otros metales pesados (Flora y Pachauri, 2010). Otros metabolitos quelantes son los PolyPs, polianiones que están involucrados en la formación de complejos con metales y en su compartimentación, descritos por primera vez en levaduras y posteriormente en bacterias en exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  (Kulakovskaya, 2018).

*E. gracilis*, bajo condiciones foto-heterotróficas puede acumular intracelularmente metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Tc}^{7+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{6+}$  (Devars *et al.*, 2000; Einicker-Lamas *et al.*, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002, Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a; Ishii y Uchida, 2006; Miot *et al.*, 2009; García-García *et al.*, 2009, 2018). Para el caso de este protista, se han descrito diferentes mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados (Fig. 2), los cuáles se explican a continuación. La unión del metal a la membrana plasmática por adsorción, la cual normalmente resulta ser menos del 50% del total de metal removido para metales como el  $\text{Ni}^{2+}$  (García-García *et al.*, 2018). La quelación extracelular, en donde se ha observado que la expulsión de moléculas de malato puede aportar a la quelación del  $\text{Cr}^{6+}$  /  $\text{Cr}^{3+}$  (Lira-Silva *et al.*, 2011). La biotransformación, es el cambio en el estado de oxidación del metal, lo que puede resultar en la disminución de su toxicidad, y para este caso se ha determinado que *E. gracilis* puede pasar de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  (Devars *et al.*, 2000) y de  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$  por una cromato reductasa (Lira-Silva *et al.*, 2011). También se sabe que existen transportadores de metales esenciales que pueden permitir el paso de metales tóxicos, debido a su parecido en el radio iónico, como ejemplo se ha visto que al disminuir la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio de cultivo de *E. gracilis* la acumulación de  $\text{Ni}^{2+}$  aumenta (García-García *et al.*, 2018). El mecanismo mejor descrito en este microorganismo es la quelación intracelular, en la que durante la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  se ha reportado que existe inducción en la síntesis de moléculas con grupos tiol, como la Cys, GSH y FQs (Coppellotti, 1989). Referente a la expulsión de metales pesados mediada por complejos moleculares, en García-García *et al.* (2018), se menciona que un descenso en las pozas de tioles y PolyP, a la par de una disminución drástica en la cantidad intracelular de  $\text{Ni}^{2+}$ , sugiere que el  $\text{Ni}^{2+}$  es expulsado en forma de complejo con tioles y fosfatos, tal como sucede con la liberación de conjugados-S de glutatión que realizan ciertos transportadores pertenecientes a la familia de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos y que son dependientes de ATP. Éste es un mecanismo que se encuentra bastante descrito en células de mamífero, sin embargo también ha sido descrito en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y nematodos de suelo (*Caenorhabditis elegans*) en donde se le asocia a la desintoxicación de  $\text{Ca}^{2+}$  y

As<sup>3+</sup> (Keppler, 1999). En cuanto a la compartimentación de metales tóxicos en *E. gracilis*, se sabe que puede ocurrir mediante la unión Me-HMWC (metal- complejos de alto peso molecular), los cuales constan de un 57-75% de moléculas de monotiol (Cys,  $\gamma$ - glutamilcisteina, GSH) y 25-43% de FQs (Bhagavan, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006b), aunque también se ha descrito la quelación intramitocondrial de Cd<sup>2+</sup> a partir de citrato, en células que previamente se expusieron a Hg<sup>2+</sup> (Avilés *et al.*, 2003). Por último, existe un mecanismo que se ha descrito recientemente, en el que se asocia a la regulación del volumen intracelular de agua, con la concentración de Cd<sup>2+</sup> que es acumulada por células de *E. gracilis* (Sánchez-Thomas *et al.*, 2020).



**Figura 2. Mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en *E. gracilis*.** 1) adsorción del metal tóxico (Mt) a la membrana extracelular; 2) Quelación extracelular por moléculas de malato (círculo amarillo); 3) Biotransformación del Mt<sup>2+</sup> por oxidoreducción; 4) Transportadores de Metal esencial (Me) que transportan Mt<sup>2+</sup> (rectángulo naranja); 5) Quelación intracelular con moléculas con grupos tiol (círculo café) y grupos fosfato (círculo azul oscuro), este último presente en complejos de polyP (nubes azul oscuro); 6) Compartimentalización del Mt en mitocondria (elipse amarilla) y cloroplasto (elipse verde) sin transportador aun descrito (rectángulo naranja); 7) Expulsión de complejos Mt-SH (rectángulo rojo) Mt-PolyP (rectángulo azul); 8) Expulsión

activa mediante el uso de ATP (rectángulo verde claro); 9) Acumulación del  $Mt^{2+}$  relacionada al volumen de agua intracelular (círculo azul) y acuoporinas (rectángulo azul) (Elaboración propia, 2019).

Con respecto a antecedentes de *E. gracilis* en exposición a  $Pb^{2+}$ , existe un análisis de los efectos tóxicos que genera este metal (Navarro *et al.*, 1997), y en otra publicación se realizó una exposición simultánea a  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , en donde se vió que el  $Pb^{2+}$  disminuye la eficiencia para acumular  $Cd^{2+}$ , además de inducir un aumento en moléculas con grupos tiol (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a). Debido a esto, se menciona que las moléculas con grupos tiol son un mecanismo que promueve la acumulación de  $Pb^{2+}$ ; sin embargo, la cantidad de estos metabolitos que se ve inducida y su interpretación está sobreestimada debido a que la exposición se hizo en presencia de  $Cd^{2+}$ , el cual promueve preferentemente la producción de estos metabolitos, por lo que es poco probable que los tioles estén involucrados en la acumulación de  $Pb^{2+}$ . Por lo que el enfoque de esta tesis fue evaluar otros mecanismos asociados a la acumulación de  $Pb^{2+}$  como los que se mencionan a continuación.

### 3.7 MECANISMOS DE RESISTENCIA A PLOMO

Los principales organismos hiperacumuladores de  $Pb^{2+}$  que se han reportado son las plantas. Piechalak *et al.* (2002), documentó que la acumulación de  $Pb^{2+}$  en tres especies de la familia *Fabacea*, *Pisum vulgaris* puede acumular  $>75$  mg  $Pb/g_{PS}$  después de las 96 h de exposición, *P. sativum* acumula 50 mg  $Pb/g_{PS}$  y *Vicia faba* 46 mg  $Pb/g_{PS}$  principalmente en raíces. El mecanismo de acumulación en estas plantas estuvo relacionado con el metabolismo de GSH, ya que se determinó que en *V. faba* disminuye el contenido de GSH y aumenta la síntesis de FQs a través del tiempo de exposición, en el caso de *P. vulgaris* se observó síntesis de homoglutatión (hGSH) y homofitoquelatinas (hFQs) a las 24 h de exposición, y por último en *P. sativum* se evidenció la inducción de síntesis de GSH, FQs, hGSH y hFQs (Piechalak *et al.*, 2002).

Existen organismos que generan respuestas fitotóxicas y de tolerancia al  $Pb^{2+}$ , como es el caso de la planta acuática *Ceratophyllum demersum L.*, (cola de zorro) que es capaz de acumular 1748 mg  $Pb/g_{PS}$  después de 7 días de exposición. En estas

condiciones los efectos tóxicos del  $Pb^{2+}$  fueron la disminución del 67% en la biomasa y los pigmentos fotosintéticos. Debido a esto, se realizó la cuantificación de los mecanismos de tolerancia o desintoxicación hacia este metal, donde se observó que había un aumento en la síntesis de Cys, GSH y FQs (FQ<sub>2</sub> y FQ<sub>3</sub>) (Mishra *et al.*, 2006). Sin embargo, este mecanismo se descartó en *E. gracilis* por las razones mencionadas anteriormente.

De igual forma, se han realizado estudios en los cuales se comparan ejemplares obtenidos de zonas contaminadas con plomo, con otros que se han desarrollado en condiciones óptimas. La herbácea *Dianthus carthusianorum* L. (clavel silvestre) se clasificó en dos diferentes ecotipos: metalícola (MT) (extraídos de una minera de Boleslaw, Polonia) y no metalícola (-MT) (Pliszczyn, Polonia). Estos ecotipos se expusieron a 0.008-2.88 mM  $Cd^{2+}$ , 0.34- 978.89 mM  $Zn^{2+}$  y 0.328-23.99 mM  $Pb^{2+}$ , y al comparar su capacidad de acumulación no se observaron diferencias significativas (MT=18 mg Pb/Kg<sub>PS</sub>; -MT=29 mg Pb/Kg<sub>PS</sub>). Además, se menciona que el mecanismo empleado para la acumulación de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  son las FQs, sin embargo, también se señala que en la exposición simultánea a  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  se induce la síntesis de GSH, malato y citrato (Wójcik *et al.*, 2015), lo que sugiere que no solo las FQs están involucradas en la acumulación de  $Pb^{2+}$ , sino también la presencia de malato y citrato. Como se mencionó anteriormente, en *E. gracilis* ya se ha reportado un aumento de citrato en exposición a  $Cd^{2+}$  en células preacondicionadas a  $Hg^{2+}$  (Avilés *et al.*, 2003), además se sabe de una disminución de malato en exposición a  $Cr^{6+}$  /  $Cr^{3+}$  lo cuál se asocia a su expulsión para acomplejar al  $Cr^{6+}$ . Sin embargo se ha propuesto que el contenido de citrato no es significativo al compararse con la cantidad de otras moléculas quelantes (concentración de citrato y GSH sin  $CdCl_2$ = 7 y 19  $\mu$ mol/L y con 100 $\mu$ M  $CdCl_2$ = 10 y 62  $\mu$ mol/L), por lo cual hasta el momento se ha considerado como un mecanismo que contribuye en bajas proporciones a la acumulación o resistencia a metales pesados en *E. gracilis* (Avilés *et al.*, 2003; Lira-Silva *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado en plantas que la concentración de metales esenciales como el  $Ca^{2+}$ , modula la tolerancia a  $Pb^{2+}$ . Dos ejemplos de ello son el tomate (*Lycopersicon esculentum* L. var. Radek), que presenta una alta tolerancia a la deficiencia de  $Ca^{2+}$  y a la exposición a  $Pb^{2+}$ , y la mostaza (*Sinapis alba* L. var. Biala), que tiene una baja tolerancia a la deficiencia de  $Ca^{2+}$  y al  $Pb^{2+}$ , sin embargo no solo se modifica la tasa de crecimiento (tolerancia), sino también la acumulación de  $Pb^{2+}$ , que para el caso del tomate esta aumentaba conforme se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  (de 0.3-3 mM



Ca<sup>2+</sup> acumulaban respectivamente 26-30 g Pb<sup>2+</sup>/Kg<sub>PS</sub>), contrario a lo que pasaba con la mostaza, ya que el Pb<sup>2+</sup> intracelular podría ser independiente a la concentración de Ca<sup>2+</sup> (de 0.3-3 mM Ca<sup>2+</sup> acumulan respectivamente 65-40 g Pb<sup>2+</sup>/Kg<sub>PS</sub>) (Antosiewicz, 2005). Como se mencionó anteriormente, en *E. gracilis* se ha observado que al disminuir la concentración de Mg<sup>2+</sup> en el medio de cultivo se facilita la entrada de Ni<sup>2+</sup> (García-García *et al.*, 2018), por lo que se puede pensar que la concentración de metales esenciales como el Ca<sup>2+</sup> podría modular la tolerancia y acumulación de Pb<sup>2+</sup> en este modelo de estudio.

En diferentes microorganismos en exposición a Pb<sup>2+</sup> principalmente se documentan mecanismos de adsorción por componentes como exopolisacáridos. Por ejemplo, en bacterias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *Arthrobacter sp.* y *Corynebacterium sp.*, se ha descrito al peptidoglicano junto con los ácidos teicoicos como responsables de la adsorción de Pb<sup>2+</sup> (Jarosławiecka y Piotrowska-Seget, 2014). Las biopelículas en microalgas se caracterizan por ser un consorcio de microorganismos incrustados en sustancias poliméricas extracelulares (exopolisacáridos, EPS), éstas constan de moléculas como fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, aunque también incluyen grupos funcionales como los grupos fosfórico, carboxílico, hidroxilo y amino (Mantzorou y Ververidis, 2019). En *E. gracilis* se ha relacionado un aumento en la formación de biopelícula con la exposición a Cu<sup>2+</sup> (Morales-Calderón *et al.*, 2012), pero no se relacionó con la acumulación de este metal por lo que dicha biopelícula no puede establecerse como un mecanismo que podría contribuir a la acumulación de metales pesados.

Otro mecanismo descrito, es la precipitación intra o extracelular con aniones como los cloruros, fosfatos e iones hidroxilo, para formar complejos insolubles. *Citrobacter freundii* es capaz de precipitar Pb<sup>2+</sup> con fosfato extracelular formando el complejo PbHPO<sub>4</sub> (Aickin y Dean, 1977, 1979; Aickin *et al.*, 1979). Sin embargo, también se ha relacionado a la formación de cuerpos de PolyP durante la exposición a Pb<sup>2+</sup> en microalgas como *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* y *Nitzschia closterium* y en bacterias como *Plectonema boryanum* (Jensen *et al.*, 1982; Rachlin *et al.*, 1982). A pesar de esto, en otros organismos como la diatomea de agua dulce *Diatoma tenue* se ha descrito la reducción en el número de cuerpos de PolyP tras la exposición a Pb<sup>2+</sup> (Sicko-Goad y Stoermer, 1979). Además, existe un reporte donde se determinó que a medida que el número de cuerpos de PolyP disminuye, el Pb<sup>2+</sup> causa cambios citológicos crecientes

hasta el punto de la muerte celular (Keasling, 2006). Debido a todo lo anterior, se ha propuesto que el PolyP en las células funciona como un mecanismo para desintoxicar al  $Pb^{2+}$ . Sin embargo, no se ha caracterizado si en el protista *E. gracilis* este mecanismo le puede permitir a las células la capacidad de resistir y acumular  $Pb^{2+}$ .

Con estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

#### 4. HIPÓTESIS

La síntesis de PolyP y la concentración de  $Ca^{2+}$  contribuyen a la resistencia y la acumulación de  $Pb^{2+}$  en *Euglena gracilis*.

#### 5. OBJETIVOS

##### General:

Evaluar los mecanismos que le permiten a *E. gracilis* resistir y acumular  $Pb^{2+}$ .

##### Particulares:

- Determinar la susceptibilidad a  $Pb^{2+}$ , a través de los cambios en el crecimiento, la cantidad de clorofila y la capacidad fotosintética y de respiración en *E. gracilis*.
- Determinar la capacidad de acumulación de  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis*.
- Determinar la contribución de las moléculas quelantes (tioles y/o polyP) durante la exposición a  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis*.
- Evaluar si la acumulación de  $Pb^{2+}$  está mediada por la presencia de  $Ca^{2+}$  en *E. gracilis*.

#### 6. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 6.1 Análisis de la precipitación de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ .

###### 6.1.1 Transmitancia

Se realizaron pruebas de precipitación de  $Pb^{2+}$ , utilizando las concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu M$  de  $Pb(C_2H_3O_2)_2$  en diferentes soluciones. Se midió el porcentaje de transmitancia (%) por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 410 nm.

### 6.1.2 Solubilidad

Para determinar la concentración de  $Pb^{2+}$  total soluble en el medio de cultivo, se hizo la adición de las concentraciones anteriormente mencionadas en 10 mL de medio Hutner con y sin calcio añadido ( $< 5\mu M$ ), utilizando como testigo  $H_2O_{mQ}$ . Luego se centrifugó a 3500 rpm, a  $4^{\circ}C$  durante un minuto, posterior a esto se tomó 1 mL del sobrenadante y se aforó a un volumen final de 4 mL con  $H_2O_{mQ}$ . Después se midió por espectrofotometría de absorción atómica (EEA) (Varian SpectrAA-640, Australia).

### 6.2 Cultivo de *E. gracilis* fotosintética en medio Hutner

Se utilizaron cultivos con la cepa fotosintética de *E. gracilis* Klebs var. Z, en el medio de crecimiento óptimo, Hutner (Hutner *et al.*, 1956) modificado en 1971 por Schiff (Schiff *et al.*, 1971). El medio consta de los siguientes componentes: 34 mM ácido glutámico, 15 mM ácido málico, 2 mM  $CaCO_3$ , 1.5 mM  $(NH_4)_2HPO_4$ , 2 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3 mM  $KH_2PO_4$ , minerales traza A (0.02 mM  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 mM  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.1 mM  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , y  $7 \times 10^{-3}$  mM  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) y minerales traza B ( $3 \times 10^{-3}$  mM  $CuSO_4 \cdot H_2O$ , 0.01 mM  $H_3BO_3$ ,  $2 \times 10^{-4}$  mM  $Na_2VO_4 \cdot 16H_2O$  y 0.03 mM  $Fe(NH_4)_2(SO_4)$ ) ajustado a pH 3.5 utilizando NaOH o HCl, el medio posteriormente se esterilizó por autoclave durante 15 min a 20 psi ( $lb_f/in^2$ ). Previo a realizar la siembra celular, se agregó 1 mL de vitaminas ( $3 \times 10^{-3}$  mM tiamina, 0.2  $\mu g/mL$  cianocobalamina y 0.02 mM  $FeCl_2$ ) por cada 100 mL de medio de cultivo, estas fueron pre-esterilizadas por filtración (poro de filtro 0.22  $\mu m$ ).

Los cultivos celulares se resembraron con un inóculo antes de llegar a la fase estacionaria de crecimiento (quinto día), a una concentración inicial de  $0.2 \times 10^6$  células/mL, de acuerdo con el experimento en 50 a 250 mL de medio, en matraces Erlenmeyer de 100 a 500 mL. Las condiciones ambientales se restringieron con el uso de una cámara de incubación (cámara armada y compuesta por una serie de lámparas de luz, regulador de temperatura y fotoperiodo), la cual se mantuvo en un rango de temperatura de 24 a  $26^{\circ}C$  y con fotoperiodo de 12 horas luz blanca ( $42-90 \mu mol \text{ quanta } m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) y 12 horas oscuridad.

Para fines de esta tesis también se utilizaron cepas crecidas en medios de cultivo sin calcio, deficiente de sulfato y sin fosfato, respectivamente. Para todos los casos se utilizó la misma formulación del medio Hutner que se mencionó anteriormente y se evitó

añadir las siguientes sales: en el primer caso  $\text{CaCO}_3$ , en el segundo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y en el tercero  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los cultivos fueron resembrados como se muestra en la Fig. 3.

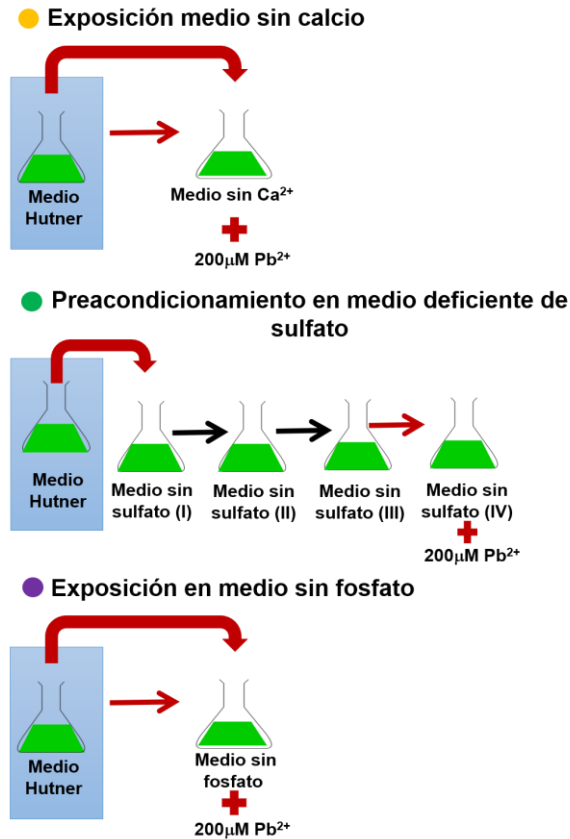


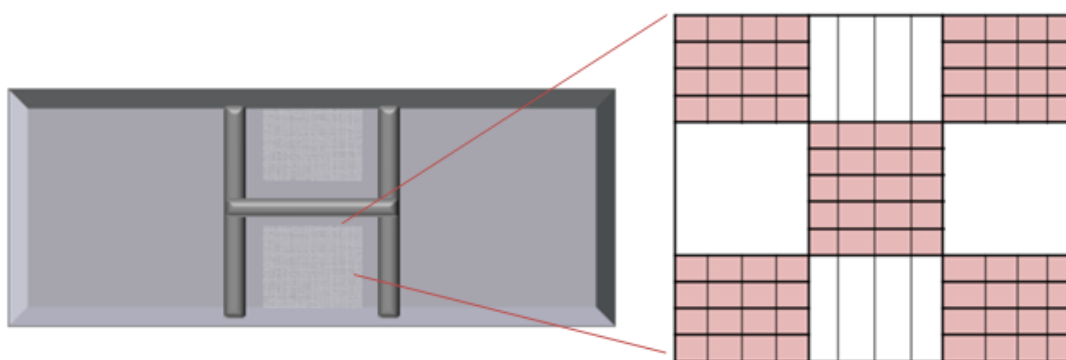
Figura 3. Estrategia experimental para la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$  en diferentes condiciones de cultivo (medio Hutner sin calcio, sin sulfato y sin fosfato).

### 6.3 Conteo celular

Se determinó tomando una alícuota del volumen total de células, adicionando  $\text{HCl}$  0.05% para inmovilizar a las células y así facilitar el conteo, y el restante de  $\text{H}_2\text{O}$  en un volumen final de 1mL. Posteriormente, se tomaron  $15\mu\text{L}$  de esta dilución y se colocaron en la cámara de Neubauer (Fig. 5), donde se seleccionaron cinco cuadrantes para hacer un promedio, y obtener la concentración celular tomando en cuenta el factor de la cámara (10,000) y el factor de dilución para cada muestra. El primero fue calculado tomando en

cuenta el volumen de la muestra que hay entre cada cuadrante de la cámara y el cubreobjetos ( $1 \times 10^{-4}$  mL).

La viabilidad se analizó a la par del conteo, se añadió azul tripano 0.05% a la alícuota de células, se esperó un tiempo de 2 minutos y se agregó el volumen restante de agua hasta obtener 1 mL. Después se realizó la dilución correspondiente, a la cual se adicionó HCl 0.05% y agua hasta obtener 1 mL y se prosiguió el conteo, del cual se consideró el promedio de los cinco cuadrantes como el 100% y el porcentaje de viabilidad fue obtenido a partir de la resta del número de células vivas menos las muertas (teñidas de azul).



**Figura 5. Cámara de Neubauer (Derecha). Cuadrantes utilizados para el conteo celular (Izquierda).**

#### **6.4 Exposición a $Pb^{2+}$ y determinación de la acumulación**

Para realizar la exposición de *E. gracilis* a  $Pb^{2+}$ , se utilizó una solución calibrada [ $84 \pm 8$  mM] de  $Pb(C_2H_3O_2)_2$ , previamente esterilizada por filtración, luego se agregó la cantidad necesaria de esta solución para cada condición (50, 100, 200 o 500  $\mu$ M) al medio Hutner pH 3.5, después de las vitaminas y antes de adicionar las células.

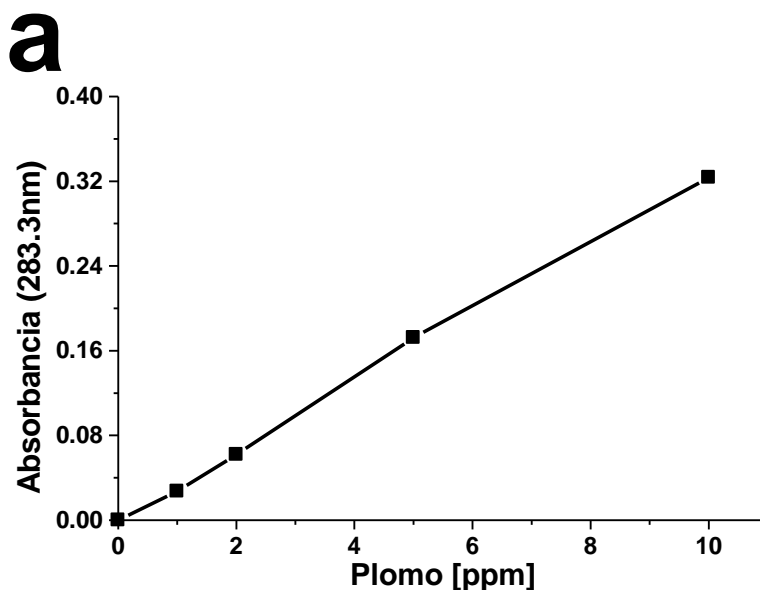
La acumulación se determinó al día 1, 3, 5 y 8. La cosecha de los cultivos a diferentes tiempos se llevó a cabo por centrifugación (3500 rpm, 4 °C por 1 minuto). Una vez obtenido el botón celular, se lavó dos veces por centrifugación (mismas condiciones) con 50 mM Tris adicionado con 5 mM EGTA para eliminar el metal adherido extracelularmente y para evitar la contaminación por fosfato en la determinación de PolyP (sección 6.8.2). Después de los lavados, el botón celular se resuspendió en  $H_2O$  ultrapura (Millipore).

Finalmente, las células se contaron en la cámara de Neubauer como se describe en la sección 6.3 *Conteo celular*.

### 6.5 Determinación de plomo y calcio total

Para determinar la cantidad de  $Pb^{2+}$  acumulado y la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular se realizó una digestión ácida de cada muestra utilizando una mezcla en proporción 5:1 de  $HNO_3$  y  $H_2SO_4$ , respectivamente. Las muestras en presencia de la mezcla ácida se calentaron en una parrilla durante 2 h. Para evitar pérdidas se hicieron series alternadas entre 10 min con alta intensidad (100-110 °C) y 15 min con baja intensidad (95-100 °C), más tarde las muestras se aforaron con un volumen final de 5 mL con  $H_2O_{mQ}$ .

El plomo y el calcio se determinaron mediante EAA con un equipo Varian Spectra AA 640 (Australia). Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla de aire/acetileno a un flujo de 13.5:2 L/min y con una lámpara específica para plomo que emite longitud de onda de 283.3 nm y para calcio de 422.7 nm. La concentración de las muestras en ppm (mg/L) se obtuvo por la interpolación de una curva patrón con un ajuste lineal utilizando las distintas concentraciones de  $Pb^{2+}$  (Fig. 4 A) y  $Ca^{2+}$  (Fig. 4 B).



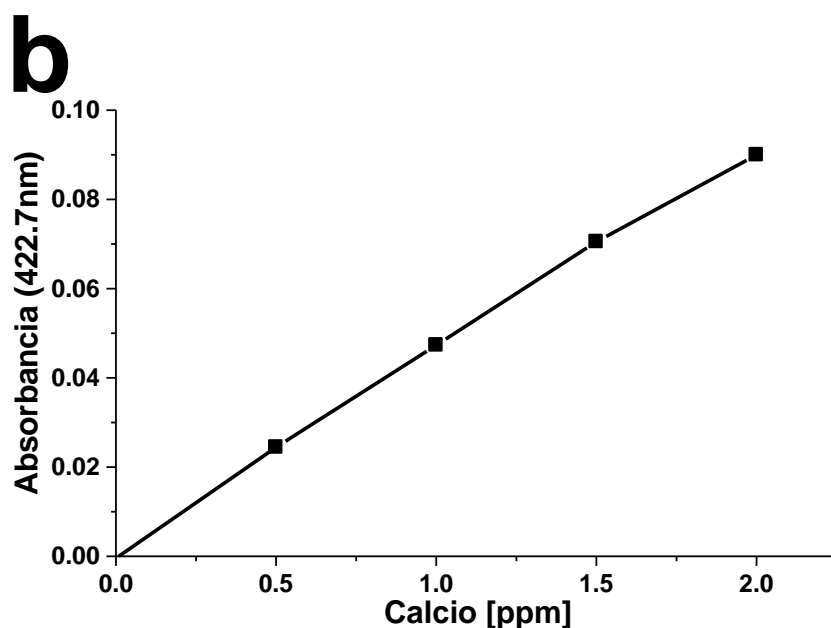


Figura 4. Curva patrón obtenida en el espectro de absorción atómica para plomo (a) y calcio (b).

### 6.5.1 Plomo contaminante durante el proceso de cosecha celular

Se determinó el  $Pb^{2+}$  contaminante que se acarreó durante la cosecha de células que fueron expuestas a  $Pb^{2+}$ , esto se llevó a cabo simulando dicho proceso mediante el uso de células testigo de 1, 3, 5 y 8 días a las cuáles se les adicionó la alicuota necesaria para obtener 50, 100 y 200  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$ , esto con el objetivo de tomar en cuenta el pH en el que se encuentran las células en el tiempo de cosecha correspondiente. Después, la mezcla se agitó con precaución y las células se cosecharon en la forma antes descrita.

Finalmente, se digirieron las muestras en mezcla ácida durante dos horas y se determinó la concentración de plomo como se mencionó anteriormente.

### 6.6 Cuantificación de clorofila a+b

La determinación de la clorofila se llevó a cabo por el método de Arnon (1949). La extracción se realizó al agregar  $0.5-1.8 \times 10^6$  células totales/mL en 2.5 mL de acetona al 80% (v/v), se agitó en vortex durante 1 min y luego se obtuvo el sobrenadante por

centrifugación (3500 rpm, 4 °C por 10 min). La absorbancia se determinó en una celda de vidrio a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 645 y 663 nm para clorofila a y b, respectivamente.

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

$$\text{fórmula: } [Clorofila\ total\ (\mu g)] = (Abs_{663} \times 8.05) + (Abs_{645} \times 20.29)$$

### **6.7 Medición del consumo (respiración) y producción de oxígeno (fotosíntesis)**

Las células se cosecharon después de 120 h de cultivo mediante el procedimiento antes descrito. Después de ser resuspendidas en amortiguador KME (120 mM KCl, 20 mM MOPS y 1 mM EGTA) pH 7.2, se tomaron las alícuotas necesarias para obtener una concentración celular aproximada de  $11\text{-}21 \times 10^6$  células/mL en la cámara del oxímetro (1.7 mL).

El equipo consta de un electródo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Yellow Spring Instruments), una cámara (1.7 mL) con agitación y un sistema de flujo de agua con temperatura constante de 25 °C. Este equipo fue acoplado a una cámara oscura con un proyector de diapositivas (17-23  $\mu\text{mol}$  quanta/  $\text{m}^2\text{-s}^{-1}$ ), lo que permitió simular cambios de luz-oscuridad para medir respiración y fotosíntesis. El electródo se calibró al considerar como 100% de oxígeno el amortiguador KME pH 7.2, sometido a burbujeo y posteriormente adicionando ditionita de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) para establecer el 0% de oxígeno. La concentración de oxígeno consumida y producida fue trazada por un registrador (Kipp y Zonen); los trazos permitieron realizar los cálculos correspondientes, considerando la solubilidad del O<sub>2</sub> a la altitud de la Ciudad de México (2, 240 msm) como 210  $\mu\text{M}$ .

### **6.8 Determinación de moléculas quelantes**

#### **6.8.1 Moléculas con grupos tiol**

Los tioles (Cys,  $\gamma\text{EC}$ , GSH y PolyGSH) fueron determinados a través de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), usando el equipo HPLC-Vis marca Waters 1525-1289 (Waters, Milford, MA, USA) utilizando la columna C-18 Symmetry Waters de tamaño de partícula 3.5  $\mu\text{m}$ . Las células fueron cosechadas según el apartado 6.3, a la muestra se le añadió 5 mM de DTT y se mantuvo en congelación (-20 °C) hasta su determinación. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con 0.01% Tritón X-100, después se agregó 3% PCA y se agitó vigorosamente durante 1 min,



se centrifugó (14 000 rpm, 4 °C por 5 min), se obtuvo el sobrenadante, se filtró (diámetro de poro = 0.45 µm) y se inyectaron 50 µL al HPLC. Para la medición de tioles, la fase móvil que se empleó estaba compuesta por 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en agua, y los tioles se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN) 100%. La separación inicial fue de 99% solución de TFA y 1% ACN, después de 10 min se utilizó un gradiente discontinuo para obtener 80% de la solución TFA y 20% ACN a un flujo de 1mL/min. Las moléculas con grupos tiol fueron detectadas por una reacción colorida con DTNB 0.1 mM en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M pH 8, en una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro acoplado al HPLC. Cada uno de los metabolitos de interés fueron identificados usando estándares internos.

### 6.8.2 Moléculas fosfatadas

La cantidad de ortofosfato (Pi) total, tanto en su forma libre como acomplejado en PolyP, se realizó a través del método descrito en LeBel *et al.* (1978), que corresponde a una técnica colorimétrica de la generación de azul de molibdeno. Se realizó una estandarización al comparar los valores obtenidos de las muestras con una curva de calibración de 10 a 80 µg/µL con un estándar de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, estos se extrapolaron y se obtuvo la concentración en las muestras biológicas. El proceso que se llevó a cabo para determinar el Pi en las diferentes muestras es el siguiente:

*Fosfato total.* Las células fueron cosechadas y lavadas dos veces con amortiguador Tris 50 mM con EGTA 5 mM para evitar contaminación por fosfatos, dichas células se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura (Millipore) y se congelaron a -20°C. Posteriormente, se tomaron 500 µL de la muestra celular resuspendida, se agregaron 50 µL de PCA 30% (v/v), para así someterla al proceso de digestión, que constó de un calentamiento ininterrumpido por 2 h a una temperatura de 100-110°C. Al finalizar, la muestra se centrifugó (14 000 rpm, 4°C por 5 min), y se tomaron las alícuotas con 0.25-1x10<sup>6</sup> de células para su correspondiente determinación.

*Fosfato libre.* Del restante de la muestra conservada en congelación (500 µL) se tomaron las alícuotas con 1, 2 y 3 x10<sup>6</sup> de células para su determinación.

Para determinar el Pi en las muestras, en tubos de vidrio se colocó la alícuota de las células correspondientes para cada caso y se agregó agua hasta obtener el volumen

de 1 mL. Posteriormente, se añadieron los volúmenes de las siguientes soluciones, en dicho orden: 1 mL de solución A (0.25% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 4.6% CH<sub>3</sub>COONa 3H<sub>2</sub>O y 2N CH<sub>3</sub>COOH con pH 4), 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>, 0.5 mL de solución B (5% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) y 0.5 mL de la solución C (5% NaHSO<sub>3</sub> y 2% (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Por último, se leyeron las muestras por espectrofotometría a 870 nm.

*Polifosfato*. Es el resultado de la resta del fosfato total menos el fosfato libre (P<sub>libre</sub>).

$$P_T - P_L = \text{nmoles Polifosfato/ml}$$

## 6.9 Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas entre dos grupos independientes, se utilizó el análisis de la prueba *t* de Student, mientras que para la detección de diferencias significativas entre más de dos grupos se realizó un análisis ANOVA unidireccional y en algunos casos con una prueba adicional *post hoc* tipo Scheffé, utilizando la aplicación Microcal Origin 50. Para ambos análisis estadísticos, se utilizaron valores de  $P \leq 0.05$  para establecer la significancia.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Precipitación del Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

El Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> en el medio de cultivo Hutner forma un precipitado blanquecino que aumenta con respecto a la concentración de Pb<sup>2+</sup>, esto es debido a que el Pb<sup>2+</sup> puede formar compuestos insolubles con reactivos presentes en el medio, como el Pb(OH)<sub>2</sub>↓, PbCO<sub>3</sub>↓, PbCl<sub>2</sub>↓, PbS↓ + 2H<sup>+</sup>. Por lo tanto, lo primero que se hizo fue determinar la transmitancia como una prueba física de la precipitación (Tabla 4).

**Tabla 4. Precipitación de Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> en distintas condiciones**

	Transmitancia (%) λ= 410nm

Amortiguador	Citrato de sodio [50mM]	HEPES [50 mM]	Medio Hutner	PIPES [50 mM]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [100 mM]	Tris [50 mM]	MOPS [50 mM]
	pH						
<b>Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> [μM]</b>	3.5	7	3.5	7	3.5	7.2	7
<b>50</b>	99.4	98.5	87.1	83.4	80.7	79.9	67.6
<b>100</b>	99.3	81.1	71	65	68.3	62.6	47.7
<b>200</b>	100	52.8	47.7	51.3	48.4	40	24.3

Se estableció como 100% de transmitancia a cada solución sin Pb<sup>2+</sup> añadido.

Los datos de transmitancia permitieron conocer que a pesar de la precipitación, el medio Hutner era la mejor condición para exponer a las células, a excepción del citrato de sodio, el cual se descartó por ser un quelante de metales. También se observó que desde la concentración de 50 μM Pb<sup>2+</sup> se generaron precipitados que aumentaron con respecto a la concentración del metal en el medio de cultivo Hutner. Por ejemplo, el porcentaje de transmitancia sugirió que para concentraciones mayores a 200 μM Pb<sup>2+</sup> el 50% del metal estaría precipitado. Estos valores se complementaron con la determinación cuantitativa de Pb<sup>2+</sup> soluble en el sobrenadante (Tabla 5). Los resultados indicaron que las concentraciones correspondieron parcialmente a los datos obtenidos en la medición de transmitancia. Conociendo esto, se decidió usar concentraciones por debajo de 200 μM Pb<sup>2+</sup> para los experimentos con células.

**Tabla 5. Concentración de plomo soluble en agua y medio de cultivo Hutner**

Medio	Concentración Teórica de Pb <sup>2+</sup> [μM]	Pb <sup>2+</sup> [μM]	Pb <sup>2+</sup> Total soluble en el medio de cultivo (%)
H <sub>2</sub> O	50	57±7(4)	100
H <sub>2</sub> O	100	110±30(4)	100
H <sub>2</sub> O	200	183±30(4)	100
Hutner	50	41±5(4)	72

Hutner	100	64±6(4)	58
Hutner	200	81±5(4)	44

±DE; el número de repeticiones independientes se muestra entre paréntesis.

## 7.2 Caracterización microbiológica y bioquímica de *E. gracilis* expuesta a Pb<sup>2+</sup>

### 7.2.1 Capacidad de acumulación de Pb<sup>2+</sup>

Lo primero que se determinó fue la capacidad para acumular Pb<sup>2+</sup> (Fig. 6), esto se hizo al exponer células a 50, 100 y 200 μM de Pb<sup>2+</sup> mediante un curso temporal de 8 días. Este experimento mostró que hay un comportamiento similar para todas las condiciones experimentales, ya que al día 1 hay un incremento en la acumulación (50 μM = 218 ± 56 nmol/10<sup>7</sup> cél; 100 μM = 295 ± 56 nmol/10<sup>7</sup> cél; 200μM = 255± 113 nmol/10<sup>7</sup> cél), sin embargo al día 3 y 5, la concentración de Pb<sup>2+</sup> intracelular disminuye y permanece constante hasta el día 8.

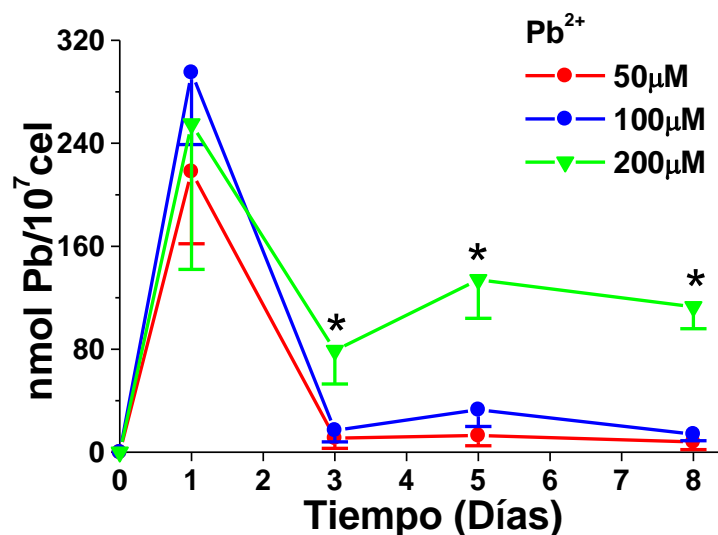


Figura 6. Curso temporal de la capacidad de acumulación por *E. gracilis* expuesta a 50, 100 y 200 μM de Pb<sup>2+</sup> en medio Hutner con duración de 8 días. Las barras verticales corresponden

a la desviación estándar obtenida de al menos 7 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  versus 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  (ANOVA).

No obstante, fue importante restar a estos datos la posible fracción de  $\text{Pb}^{2+}$  precipitado que podría estar siendo arrastrado junto con las células durante el proceso de cosecha. Debido a esto, se determinó el contaminante que no correspondía a  $\text{Pb}^{2+}$  acumulado (Tabla 6), tal como se describió en el apartado 6.4.1 en la sección de *Materiales y Métodos*. Como se puede observar, el porcentaje de acarreado para el día 1 va de 3-17%, al tercer día fue de 1-35%, el quinto día fue de 0.8-4% y al octavo no fue detectable.

**Tabla 6. Cuantificación del contaminante de  $\text{Pb}^{2+}$  en el proceso de cosecha celular**

Tiempo (días)	pH	$\text{Pb}^{2+}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Contaminante (nmol/ $10^7$ cél)	Acumulado (nmol/ $10^7$ cél)
1	3.8	50	6	218
		100	25	295
		200	35	255
3	4	50	3.5	11
		100	6	17
		200	1.3	79
5	6.3	50	0.6	13
		100	1.1	33
		200	1.1	134
8	6.9	50	ND	8
		100	ND	14
		200	ND	113

### 7.2.2 Susceptibilidad de *E. gracilis* a $Pb^{2+}$

Para conocer los efectos tóxicos del  $Pb^{2+}$  en *E. gracilis*, se realizaron cinéticas de crecimiento (Fig. 7), a partir de la determinación de la densidad celular durante ocho días en medio Hutner. Los resultados muestran que no hubo datos estadísticamente diferentes entre las condiciones control (testigo) ó sin  $Pb^{2+}$  añadido, con respecto a las distintas concentraciones utilizadas. Por otro lado, se evaluó la viabilidad celular al quinto día de crecimiento, y en todas las condiciones se observó que se mantuvo mayor al 90%. Esto indicó, que no hay un efecto en la duplicación y viabilidad de *E. gracilis* expuesta a 50, 100 y 200  $\mu M Pb^{2+}$ .

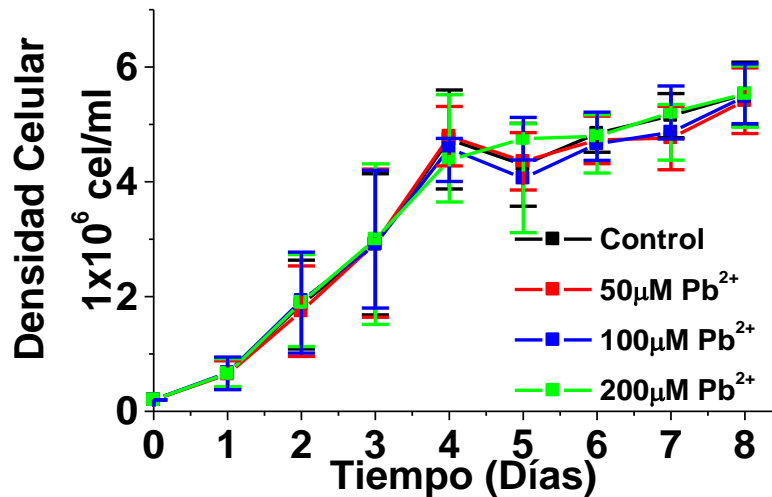


Figura 7. Cinéticas de crecimiento de *E. gracilis* expuesta a medio Hutner con 50, 100, 200  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$  en un periodo de 8 días. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes.  $P > 0.05$  versus control (ANOVA) sin diferencia significativa.

#### 7.2.2.1 Clorofila

Como parte de las características de susceptibilidad, se evaluó la cantidad de clorofila. Como se observa en la (Fig. 8), la clorofila no se modificó después de que las células fueron expuestas durante 5 días a las distintas concentraciones de  $Pb^{2+}$  con

respecto a la condición control. Sin embargo, cabe mencionar que para la condición de 200  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  hubo una disminución, aunque no fue significativa.

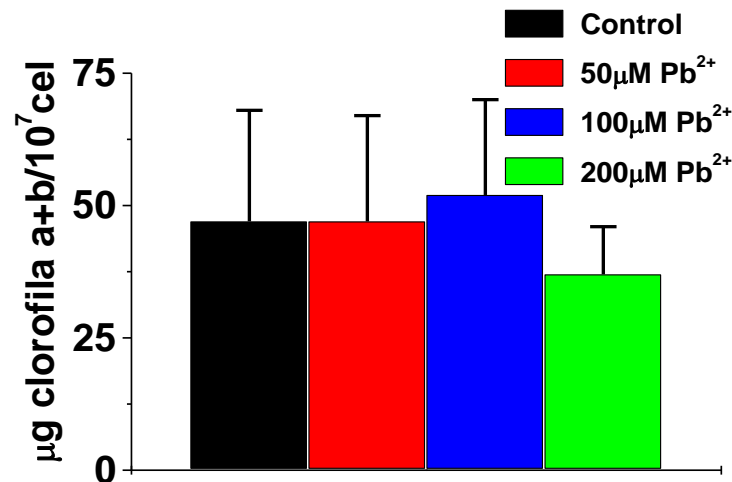


Figura 8. Cantidad de clorofila en *E. gracilis* control y expuesta a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  en medio Hutner al día 5. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes.  $P > 0.05$  versus control (ANOVA) sin diferencias significativas.

#### 7.2.2.2 Respiración y fotosíntesis

Por otra parte, la capacidad fotosintética y de respiración de *E. gracilis* expuesta a  $\text{Pb}^{2+}$  se evaluó como parte de las pruebas de toxicidad. Se realizaron ensayos para determinar los nanogramos de átomos de oxígeno (ngAO) por minuto por 10<sup>7</sup> de células totales consumidos (respiración) y los producidos (fotosíntesis) (Fig. 9). La medición se hizo al quinto día de exposición, y se observó que el  $\text{Pb}^{2+}$  aparentemente, no afecta el metabolismo energético.

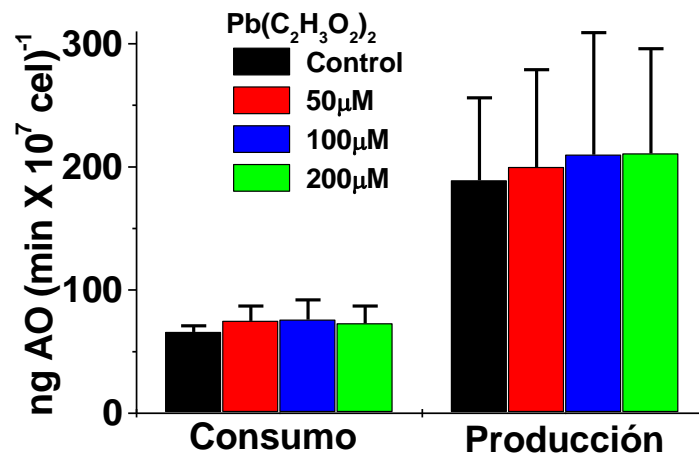


Figura 9. Evaluación de los procesos de respiración y fotosíntesis a partir del consumo y producción de oxígeno en células de medio Hutner al quinto día. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 4 determinaciones independientes.  $P > 0.05$  versus control (ANOVA) sin diferencias significativas.

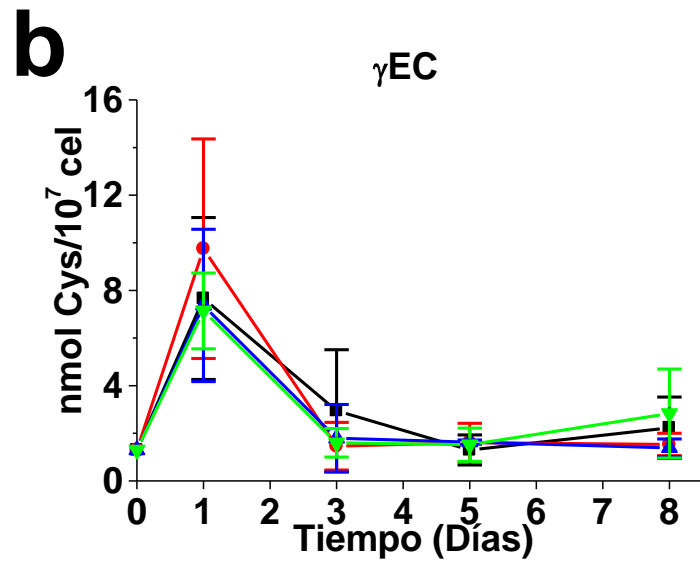
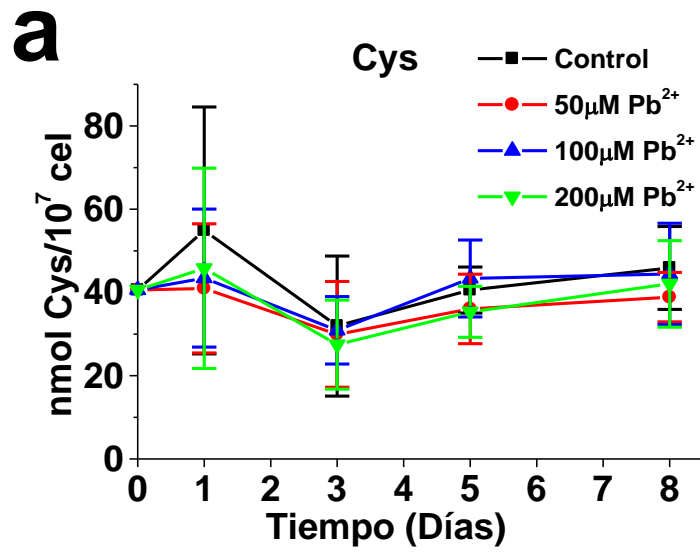
### 7.3 Mecanismos de resistencia y acumulación de $Pb^{2+}$

#### 7.3.1 Moléculas quelantes

##### 7.3.1.1 Moléculas con grupos tiol

Para conocer el mecanismo por el cual *E. gracilis* acumuló  $Pb^{2+}$  se cuantificaron las moléculas con grupos tiol: Cys,  $\gamma$ EC, GSH y PolyGSH (donde se incluyen a las fitoquelatinas), en células de medio Hutner para las condiciones control 0, 50, 100 y 200  $\mu$ M de  $Pb^{2+}$  durante un curso temporal de 8 días de exposición (Fig. 10). Sin embargo, aún en las células expuestas a altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  no se observaron cambios significativos en estos metabolitos con respecto al control.





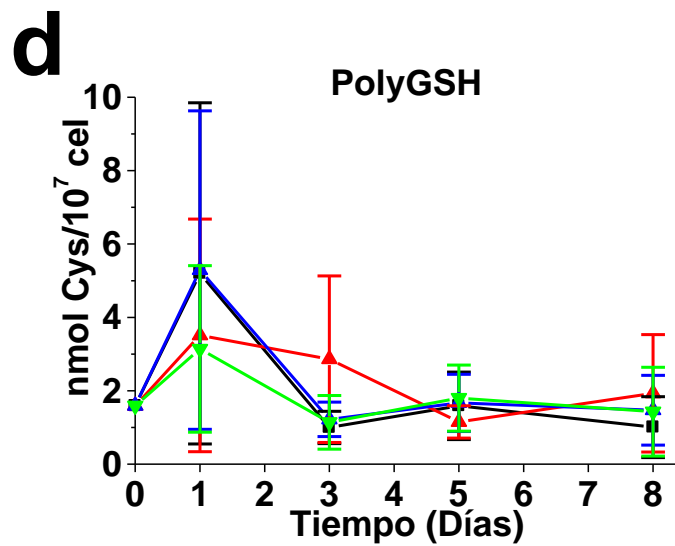
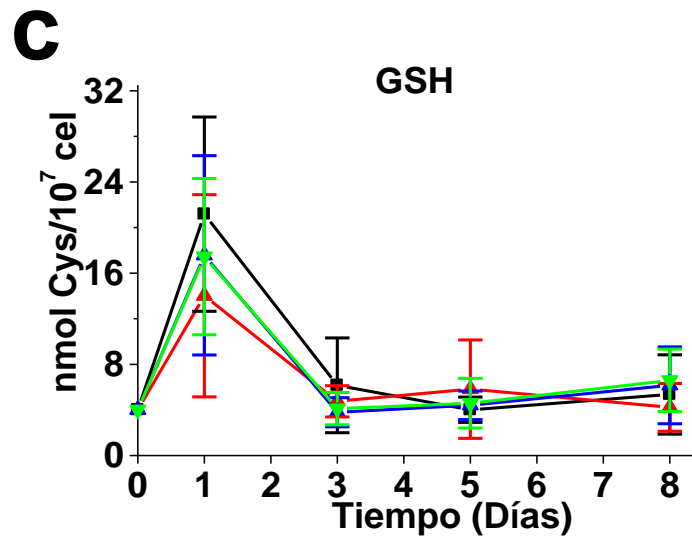
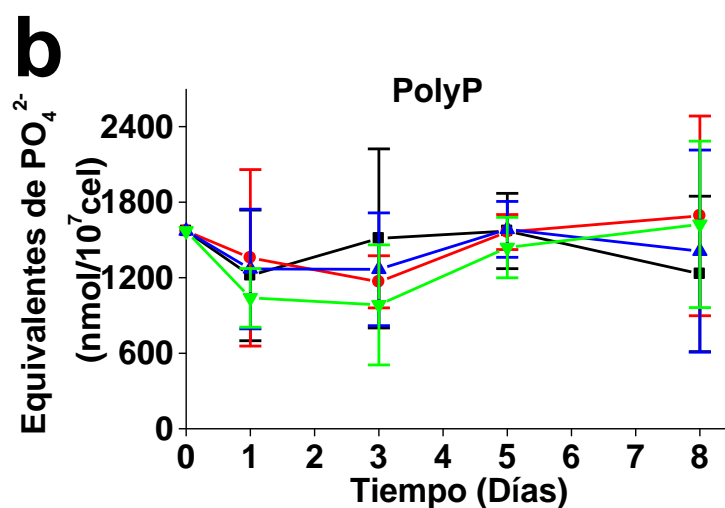
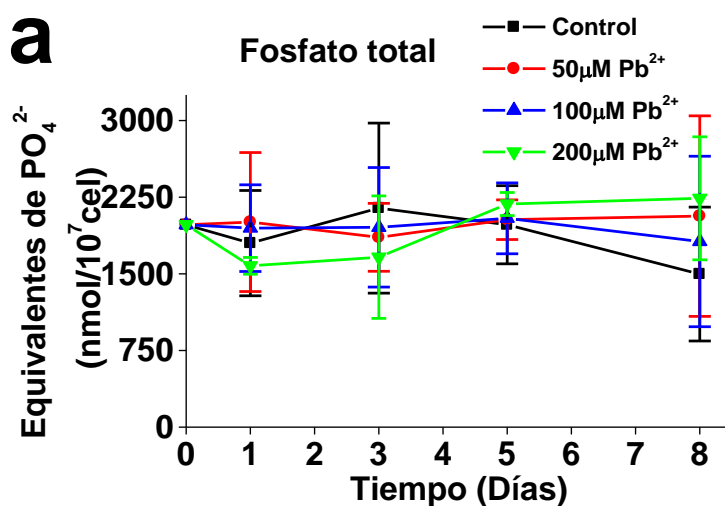


Figura 10. Contenido intracelular de Cys(a),  $\gamma$ EC(b), GSH(c) y polyGSH(d) determinados en un curso temporal de 8 días en muestras de cultivo Hutner en condiciones control y en presencia de 50, 100 y 200  $\mu$ M de  $Pb^{2+}$ . Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes.  $P > 0.05$  versus control (ANOVA) sin diferencias significativas.

### 7.3.1.2 Polifosfatos

Como propuesta del mecanismo que contribuye a la acumulación de  $Pb^{2+}$ , se evaluó la cantidad de moléculas fosfatadas: PTotal (que indica la suma de Plibre y PolyP), el PolyP (moléculas de fosfato acomplejado) y el Plibre, en células que se encontraban en presencia de  $Pb^{2+}$ . Los resultados mostraron que la cantidad de Ptotal y PolyP no se modifica (Fig. 11a y b), pero el valor de Plibre en las células expuestas a  $200 \mu M$  de  $Pb^{2+}$  es significativamente diferente comparado con el control al octavo día (Fig.11c), no obstante, este cambio no corresponde con una disminución en la cantidad de PolyP.



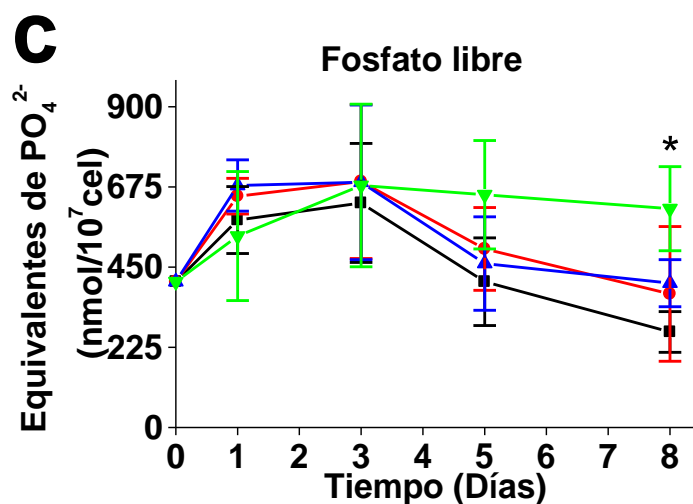


Figura 11. Curso temporal de moléculas fosfatadas a. PTotal b. PolyP y c. PLibre en células cultivadas en medio Hutner en 0, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$ . Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  versus *E. gracilis* control (ANOVA).

### 7.3.2 Participación de la cantidad basal de moléculas quelantes

Considerando que la concentración innata de moléculas con grupos tiol y fosfatadas participan en la acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$ , se realizó un precondicionamiento en medio deficiente de sulfato (*Eg-S*) y una primera exposición de células en medio sin fosfato (*Eg-F*), para disminuir la fuente de sulfato y fosfato que sirven como sustrato en las vías de síntesis de las moléculas con grupos tiol y fosfatadas. Posteriormente, estas células fueron expuestas a 200  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  y se compararon con células de medio Hutner (*Eg*) expuestas a la misma concentración del metal. Se observó que la capacidad de acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$  disminuyó significativamente en las células *Eg-F*, mientras que la acumulación de *Eg-S* permaneció semejante a las células *Eg* (Fig, 12).

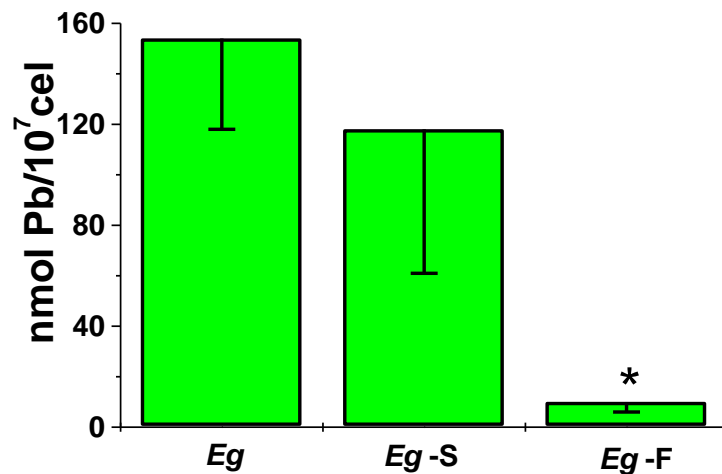


Figura 12. Acumulación de  $Pb^{2+}$  en células crecidas en medio Hutner (*Eg*), sin sulfato (*Eg-S*) y sin fosfato (*Eg-F*) expuestas a  $200 \mu M Pb^{2+}$ . Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  versus *Eg* (ANOVA).

### 7.3.3 Regulación del $Ca^{2+}$ sobre la acumulación de $Pb^{2+}$

Por otro lado, con el objetivo de evaluar si existía una dinámica entre el  $Pb^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  que tuviera algún impacto en la capacidad de acumulación de *E. gracilis* expuesta a  $Pb^{2+}$ , se determinó el calcio intracelular. Se observó que la concentración de  $Ca^{2+}$  sigue el mismo patrón que la acumulación de  $Pb^{2+}$ , es decir, las células expuestas incrementaron la cantidad de  $Ca^{2+}$  intracelular conforme se aumentó la concentración de  $Pb^{2+}$ , que solo para los días 1 y 2 las condiciones de  $100$  y  $200 \mu M$  de  $Pb^{2+}$  resultaron ser significativamente diferente al control, mientras que las células no expuestas a  $Pb^{2+}$  mantienen la misma cantidad de  $Ca^{2+}$  a lo largo del tiempo (Fig. 13).

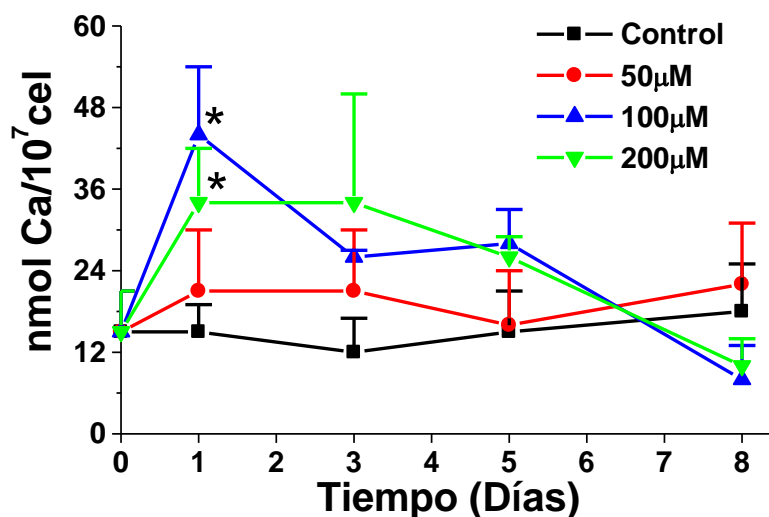


Figura 13. Curso temporal de la cantidad de calcio intracelular en *E. gracilis* cultivadas en medio Hutner expuestas a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  con duración de 8 días. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  versus control (ANOVA).

Con los resultados de esta prueba se consideró que el  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar compitiendo por la entrada con el  $\text{Pb}^{2+}$  a la célula, lo cual a su vez impediría observar los cambios en la susceptibilidad de los cultivos expuestos, además de no evidenciar la capacidad de acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$  real. Por lo anterior, se decidió evaluar tanto la acumulación como la susceptibilidad a  $\text{Pb}^{2+}$  en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido. En la Fig. 14a se muestra la acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$  en células de medio Hutner y medio Hutner sin  $\text{Ca}^{2+}$  a las 120h, en donde claramente se observó que hay una disminución en la capacidad de acumular  $\text{Pb}^{2+}$  en las células crecidas en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo cual resultó diferente a lo esperado, ya que se consideraba obtener un aumento en la acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$  debido a que ya no habría dicha competencia por la entrada con el metal esencial. En cuanto a la cantidad intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se notó que para las células de medio Hutner hay una tendencia de aumentar conforme se incrementó la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$ . Sin embargo, en las células sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido no se mostró un claro comportamiento de la concentración intracelular de este metal esencial (Fig. 14b).

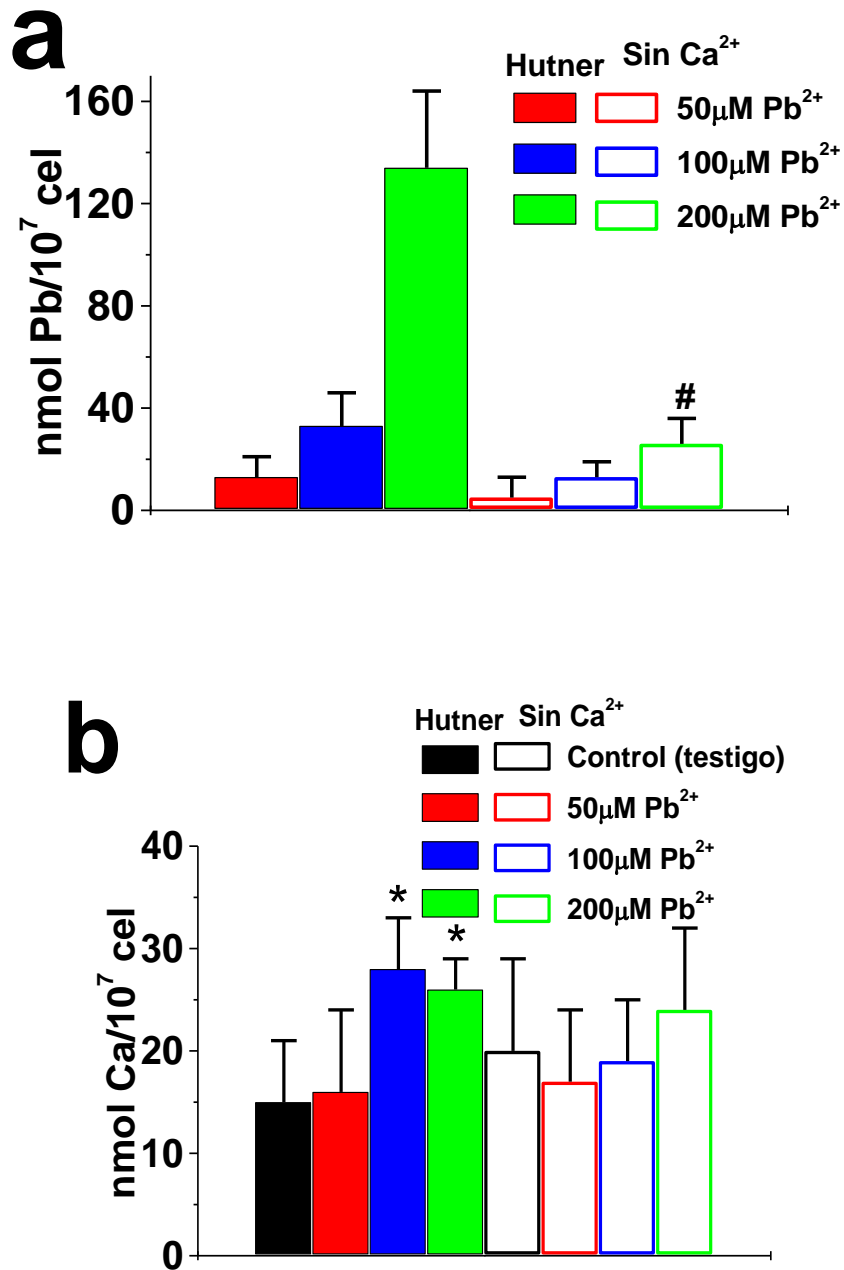


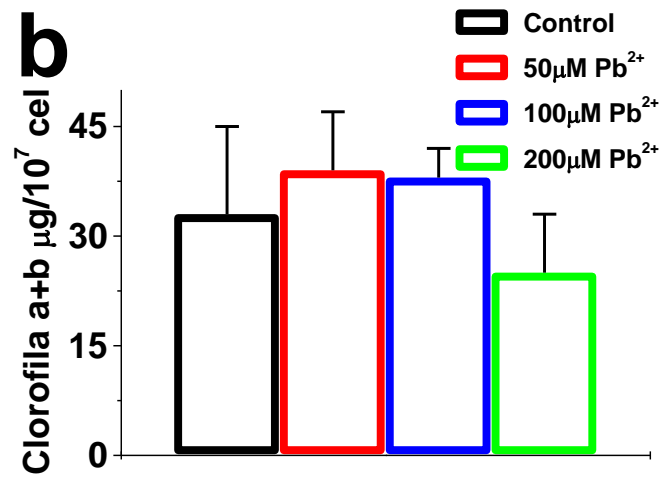
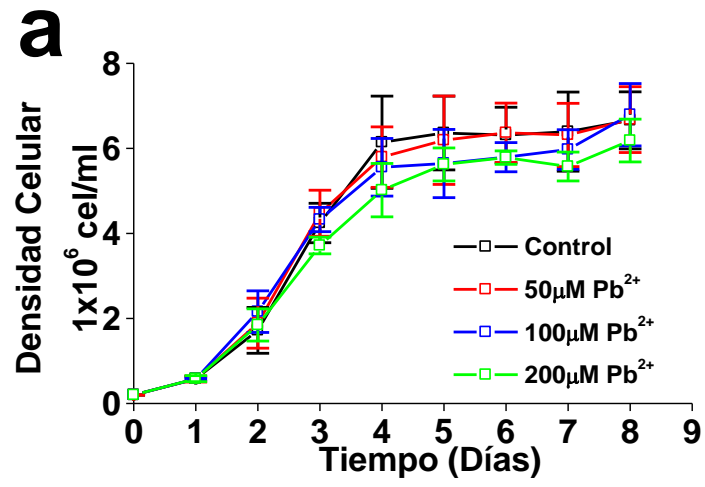
Figura 14. Acumulación de Pb<sup>2+</sup> (a) y Ca<sup>2+</sup> (b) al quinto día en *E. gracilis* expuestas a 50, 100 y 200 μM de Pb<sup>2+</sup>, cultivadas en medio Hutner (■) y medio Hutner sin Ca<sup>2+</sup> (□). Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes. #*P* < 0.05 versus 200 μM Pb<sup>2+</sup> en medio Hutner (ANOVA). \**P* < 0.05 versus Control en medio Hutner (ANOVA).

Debido a la estrecha relación fisiológica y bioquímica que posee el  $\text{Ca}^{2+}$  en la toxicidad por  $\text{Pb}^{2+}$ , se realizaron los experimentos para determinar la susceptibilidad a  $\text{Pb}^{2+}$  ahora en condiciones sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Se realizaron curvas de crecimiento en exposición 0, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  a lo largo de 8 días en medio Hutner sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido (Fig. 15a). Los resultados indicaron que no hay cambios significativos entre las condiciones testigo y las células expuestas a  $\text{Pb}^{2+}$ , aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . También se determinó la viabilidad la cual permaneció en el rango del 98 al 100%, sin tener relación con el aumento en la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$ .

La cantidad de clorofila de las células crecidas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  presentaron una disminución general comparadas con las células cultivadas en medio Hutner (Fig. 15b), pero éstas no denotaron una caída al comparar la condición testigo sin  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las expuestas a  $\text{Pb}^{2+}$ , y aunque se observó una disminución para la muestra con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$ , ésta no resultó ser significativa.

Por último, en la Fig. 15c se evidenció una tendencia a aumentar en cuanto al consumo de  $\text{O}_2$ , el cual podría estar relacionado con alguna modificación en la actividad de las enzimas que participan en el ciclo de Krebs, ya que se ha visto que la mayoría de éstas se encuentran mediadas por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para el proceso de fotosíntesis se observó una disminución en la condición de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  que pudo estar relacionada a los efectos tóxicos de este metal, a pesar de ello no fue estadísticamente diferente con respecto a la condición testigo.





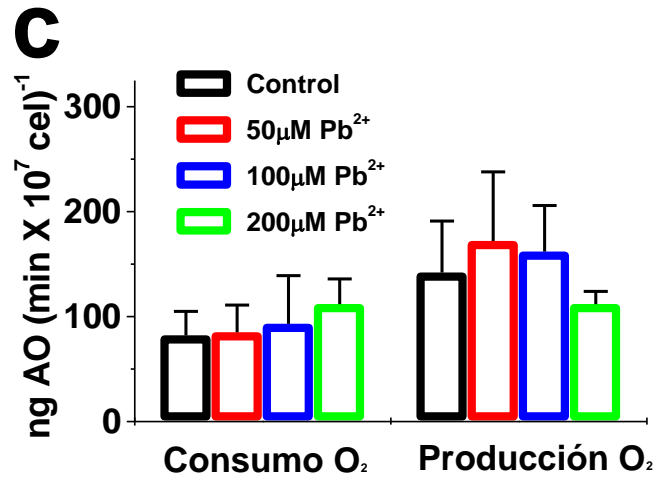


Figura 15. (a) Cinéticas de crecimiento de *E. gracilis* expuesta a medio Hutner sin Ca con 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  en un periodo de 8 días. (b) Determinación de la cantidad de clorofila en células control y expuestas a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  en medio Hutner sin  $\text{Ca}^{2+}$  al quinto día. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar obtenida de al menos 3 determinaciones independientes.  $P > 0.05$  versus control (ANOVA) sin diferencias significativas.

## 8. DISCUSIÓN

La biorremediación es un conjunto de procesos que pretende mejorar la degradación o remoción de contaminantes ambientales haciendo uso de los procesos naturales en los que están implicados principalmente microorganismos, plantas, enzimas microbianas o vegetales que tienen la capacidad de inmovilizar, remover o bioadsorber a los metales pesados (Igiri *et al.*, 2018). Sin embargo, existen limitaciones para algunos organismos, dado que los componentes con los que interactúan como los metales pesados, resultan ser muy tóxicos incluso a bajas concentraciones. En microalgas ya se ha reportado que el crecimiento puede verse inhibido a concentraciones menores a 35  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  (Tabla 8), lo cual al ser comparado con *E. gracilis*, es posible notar que incluso a concentraciones cercanas a 90  $\mu\text{M}$  el crecimiento permanece sin modificaciones. Debido a esto, este protista puede ser considerado como un microorganismo altamente resistente

a  $Pb^{2+}$ , un metal que como ya se mencionó anteriormente es letal para la mayoría de los seres vivos.

**Tabla 8. Concentración inhibidora del crecimiento al 50% ( $IC_{50}$ ) por  $Pb^{2+}$  ( $\mu M$ ) en microalgas.**

<b>Especie</b>	<b><math>\mu M</math></b>	<b>Referencia</b>
<i>Scenedesmus regularis</i>	34.74	Wan Bayani <i>et al.</i> , 2017
<i>Phormidium ambiguum</i>	24- 48	Shanab <i>et al.</i> , 2012
<i>Chaetoceros gracilis</i>	3.4	Setiawati <i>et al.</i> , 2009
<i>Phaeocystis antarctica</i>	2.75	Miazek <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus</i>	0.38	Stokes, 1981

Por ejemplo, existen organismos fotosintéticos que expuestos a  $Pb^{2+}$  muestran un efecto negativo sobre la cantidad de los pigmentos fotosintéticos y por lo tanto en la fotosíntesis. Mishra *et al.* (2006) demostraron que la cantidad de clorofila total a y b en *Ceratophyllum demersum L.*, desciende hasta un 67% después de la exposición por 7 días a 100  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$ . Una disminución en la tasa fotosintética se ha relacionado con el hecho de que el  $Pb^{2+}$  es capaz de reemplazar metales esenciales para el funcionamiento de los pigmentos fotosintéticos tales como  $Mn^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , esto puede aumentar la actividad de la enzima que degrada a la clorofila (clorofilasa) y puede distorsionar la ultraestructura del cloroplasto (Drazkiewicz, 1994; Sharma y Dubey, 2005). En *E. gracilis* se observó que la cantidad de clorofila tiende a disminuir en presencia de 200  $\mu M$   $Pb^{2+}$ , esto indica que este microorganismo ha desarrollado mecanismos de resistencia, como los que puedan estar asociados al  $Ca^{2+}$ . En este sentido se sabe que el  $Ca^{2+}$  podría estar afectando de dos maneras: (i) en la alteración de la actividad de algunas proteínas, ya que este ión actúa como segundo mensajero de las cinasas dependientes de calcio y las cinasas dependientes de calcio-calmodulina que interactúan con sus proteínas blanco y alteran su actividad biológica, y por lo tanto, inciden principalmente en la síntesis de clorofila durante la producción de  *novo* de  $NADP^+$ , y (ii) porque la concentración de  $Ca^{2+}$  se relaciona con la toma de iones esenciales, principalmente de hierro, nitrógeno y magnesio que se

requieren para el aparato fotosintético (Pal y Laloraya, 1972; Hochmal *et al.*, 2015). Esto correlaciona con el proceso de producción de O<sub>2</sub> (fotosíntesis) que se mantuvo estable (Fig. 9), en donde el Pb<sup>2+</sup> podría haber estado tomando el lugar de metales esenciales en el fotosistema II, ya que está constituido por dos monómeros que consisten en 17 ó 18 subunidades integrales de membrana, cada monómero contiene 35 clorofilas a, 1-12 moléculas de β-caroteno, 1 complejo de oxígeno (Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>), 1 hemo β, 1 hemo c, 2 ó 3 plastoquinonas, 2 feofitinas, 1 Fe no hemo y 20-25 lípidos. Además, existen antecedentes que indican que en *Chlorella* la exposición a Pb<sup>2+</sup> ocasiona cambios en el aspecto estructural y funcional del aparato fotosintético, inhibiendo el rendimiento del fotosistema II, pero no así para *Pseudomonas* expuesta a Pb<sup>2+</sup> (Dao y Beardall, 2016), ya que en este individuo solo se ve parcialmente afectado, sin embargo, no se da una explicación de dicho efecto.

Tomando en cuenta lo anterior, es importante señalar que existen organismos que son altamente resistentes a la exposición a metales pesados debido a que no internalizan al metal (Jarosławiecka y Piotrowska-Seget, 2014). Sin embargo, este no es el caso de *E. gracilis*, ya que a pesar de que no fue susceptible a Pb<sup>2+</sup>, los resultados indican que se encuentra en la categoría de los organismos hiperacumuladores de Pb<sup>2+</sup>, ya que supera la concentración de 1000 mg Pb<sup>2+</sup>/Kg<sub>PS</sub> (Ali *et al.*, 2013) con 4627 mg Pb<sup>2+</sup>/Kg<sub>PS</sub>. Sin embargo, hay que resaltar que se observó un posible proceso de expulsión de este metal (Fig. 6), lo cual no sería ideal si se tiene el objetivo de utilizar a este microorganismo en un proceso de biorremediación. Este fenómeno ya había sido reportado anteriormente en *E. gracilis* expuesta a Ni<sup>2+</sup>, donde se observó que después de las 24 horas, las células expulsaban dicho metal (García-García *et al.*, 2018). No obstante en nemátodos se encuentran proteínas que funcionan como bombas expulsoras de metales pesados que requieren ATP y por lo tanto promueven la tolerancia a Cd<sup>2+</sup> y As<sup>3+</sup>, y que se consideran homólogas a las que en mamíferos están involucradas en la resistencia celular a los fármacos quimioterapéuticos (Broeks *et al.*, 1996). Además, en *E. gracilis* existe evidencia parcial de que este sistema está presente, donde se propuso que la presencia de una P-glicoproteína (MDR1) semejante a la de mamífero puede estar involucrada en la resistencia a Cd<sup>2+</sup> en este microorganismo (Einicker-Lamas *et al.*, 2003).

*E. gracilis* puede acumular Pb<sup>2+</sup>, sin embargo, no induce la síntesis de moléculas con grupos tiol aunque se ha reportado que para Cys y GSH la constante de asociación es de 1.58 x10<sup>12</sup> M y 3.98 x10<sup>10</sup> M, respectivamente (Sillen y Martell, 1964). Los valores de

constantes de asociación de estas moléculas son muy similares con respecto al  $\text{Cd}^{2+}$ , el cual es un excelente inductor de estos metabolitos (Coppellotti, 1989; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a), debido a que es capaz de activar al factor de transcripción Nrf2 como un efecto del estrés oxidante que genera este metal, y que a su vez regula la transcripción de genes relacionados con la síntesis de GSH (Schwartzbach y Shigeoka, 2017). Por lo tanto, estos resultados podrían ser un reflejo de que la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$  en *E. gracilis* no genera estrés oxidante. A pesar de esto, es común que los mecanismos de acumulación inducidos por diferentes metales pesados en *E. gracilis* y otros organismos no coincidan entre ellos, un ejemplo de ello es *Arabidopsis thaliana* en donde se relacionó la acumulación de  $\text{Zn}^{2+}$  con la síntesis de fitoquelatinas (Kühnlenz *et al.*, 2016), mientras que *E. gracilis* es capaz de acumular y resistir altas concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  sin la inducción de moléculas con grupos tiol (Sánchez-Thomas *et al.*, 2016). Por lo tanto, este microorganismo representa una oportunidad para entender diferentes mecanismos asociados a la acumulación de metales pesados.

Para el caso de las moléculas fosfatadas, la constante de asociación del  $\text{Pb}^{2+}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$  corresponde a  $1.73 \times 10^{11} \text{M}$  y por  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  es de  $1.99 \times 10^{12} \text{M}$  (Sillen y Martell, 1964), lo que indica claramente que puede existir la unión de las moléculas con grupos fosfato en su forma libre con el  $\text{Pb}^{2+}$ , que es posible atribuir al incremento de Plibre observado al día 8 a lo que sucede en la Fig. 11, en las células expuestas a  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 11c). En Keasling y Hupf (1995), se mencionan experimentos que dan una posible explicación a lo anterior. En este trabajo los autores utilizaron como modelo a *Escherichia coli* para evaluar los efectos de los metales pesados, en cepas que fueron modificadas genéticamente para manipular la actividad de las enzimas que participan en la formación y degradación de PolyP (polifosfatocinasa y polifosfatasa). Se observó que para una cepa mutante con ausencia de la actividad de ambas enzimas y en exposición a diferentes concentraciones de cadmio (0.25- 10ppm), se aceleró la tasa de duplicación y en altas concentraciones las células no se duplicaban, mientras que al modificar solo la polifosfatasa, que genera Plibre, se vió que el crecimiento disminuyó parcialmente. La aceleración del crecimiento no fue observada en la cepa que mantuvo la actividad de ambas enzimas, y por lo tanto una concentración estable de PolyP, lo cual refleja la importancia de las moléculas fosfatadas, en forma de complejos o como Plibre, en la tolerancia a un metal pesado.

Los cuerpos de PolyP, también conocidos como acidocalcisomas, son organelos que contienen gran parte de las moléculas fosfatadas y que su función principal es mediar la concentración de cationes, como el calcio y magnesio, dentro de la célula (Moreno y Docampo, 2009). En este sentido, en *Chlamydomonas acidophila* (Nishikawa *et al.*, 2003), *Anabaena variabilis* (Hashemi *et al.*, 1994), *C. saccharophila*, *N. incerta* y *N. closterium* (Jensen *et al.*, 1982), se ha correlacionado el aumento de estos cuerpos electrodensos en presencia de metales pesados como cadmio, zinc, cobre y plomo. Lo anterior y la gran afinidad que poseen estas moléculas por el  $Pb^{2+}$  sugieren que la cantidad basal de PolyP o Plibre en *E. gracilis*, contiene con la acumulación que se observa en este trabajo. Fue por lo que se decidió realizar una prueba experimental que consistió en no adicionar las sales de fosfato en el medio de cultivo Hutner, para así disminuir las pozas intracelulares de fosfato, al reducir del suministro de fósforo a las vías de síntesis de moléculas fosfatadas, para determinar en que medida se afecta la acumulación de  $Pb^{2+}$  y la susceptibilidad a este metal. Y como se observa en la Fig. 12, hay una clara disminución en la acumulación de  $Pb^{2+}$ , lo cual sugiere que la cantidad basal de estos metabolitos están involucrada en la quelación del  $Pb^{2+}$  intracelular. Sin embargo, al no verse inducido como en los otros organismos, es decir, que no se ve un incremento en la cantidad de PolyP, no se le puede llamar un mecanismo de resistencia sino de tolerancia.

Por otra parte, la toxicidad del  $Pb^{2+}$  se ha asociado ampliamente a su potencial para sustituir al  $Ca^{2+}$ , ya que es capaz de competir con el  $Ca^{2+}$  por sitios de unión a proteínas, y porque puede ingresar a la célula por transportadores de  $Ca^{2+}$  principalmente debido a su radio iónico similar ( $Pb^{2+}$  1.17 Å  $Ca^{2+}$  1.18 Å) (Huang y Cunnigham 1996; Wang *et al.*, 2007; Cotton y Wilkinson, 1999). En raíz de *Vicia faba* se realizó un bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  y se modificó la concentración de  $Ca^{2+}$  en el medio, estos experimentos permitieron relacionar el aumento de ROS debido a la entrada de  $Pb^{2+}$  a las células (Pourrut *et al.*, 2008). Con base en estos antecedentes, se esperaba que al remover el  $Ca^{2+}$  del medio las células fueran más susceptibles y acumularan más  $Pb^{2+}$ . Sin embargo, es evidente que la presencia de  $Ca^{2+}$  favorece la acumulación de  $Pb^{2+}$ . En plantas como el maíz, el centeno, el tomate y la mostaza, se observó que el  $Ca^{2+}$  añadido puede modular la toxicidad del  $Pb^{2+}$  (Antosiewicz, 2005); en este trabajo se proponen dos categorías de acuerdo con su capacidad de resistencia a  $Pb^{2+}$ , i) la tolerancia a la ausencia de  $Ca^{2+}$  (0.3 mM) y ii) tolerancia a la exposición a  $Pb^{2+}$ . Por ejemplo, la mostaza es sensible a la ausencia de  $Ca^{2+}$  (Ca-NTd), razón por la cual la exposición a  $Pb^{2+}$  fue prácticamente letal, en cambio el maíz, el centeno y el tomate fueron organismos que

resisten a la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ca-Td), lo cual contribuye de manera sustancial a su resistencia a  $\text{Pb}^{2+}$ . Por lo tanto, es posible definir a *E. gracilis* como un microorganismo no sensible a la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que mantiene su crecimiento a pesar de quitar a este ion esencial en el medio, lo cual sugiere que las células tienen una alta regulación al mantener las pozas basales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que le provee de resistencia durante la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$ . Con respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  y su papel en la acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$ , se vió en el trabajo de Antosiewicz, 2005 que la mostaza, a pesar de su baja resistencia a  $\text{Pb}^{2+}$  presentaba la mayor acumulación al compararla con los ejemplares que tenían una mayor tolerancia, esto es debido a que el  $\text{Pb}^{2+}$  desplazaba fácilmente a los sitios con  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que se sabe que el  $\text{Pb}^{2+}$  tiene uniones mas fuertes que las del  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la estructura de sus orbitales (Simons, 1993). Existe otro estudio en donde relacionan que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para que células expuestas a  $\text{Al}^{3+}$  resistan, además de que la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es lo que promueve a la acumulación de  $\text{Al}^{3+}$ . Lo cual no ocurre así para *E. gracilis* con el  $\text{Pb}^{2+}$ , ya que es claro que la acumulación está siendo regulada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o que el  $\text{Pb}^{2+}$  tendría que verse inmovilizado dentro de las células para que se evite una interacción con los sitios de unión disponibles, por lo que el mecanismo de resistencia que *E. gracilis* podría estar utilizando para tolerar al  $\text{Pb}^{2+}$  además de la contribución de los mecanismos ya descritos en este microorganismo es la presencia de cristales de oxalato. Éstos se encuentran normalmente en células de algunos organismos como plantas y hongos en forma de oxalato de calcio cuando se exponen a un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, aunque también se ha observado que los tienden a formar durante un estrés a metales pesados, como el Co, Cu, Mn, Sr y Zn, ya que esto les permite inmovilizar a estos metales, limitando su disponibilidad para la protección de los procesos fundamentales que lleva a cabo la célula (Jáuregui-Zúñiga *et al.*, 2005; Glasauer *et al.*, 2005; Erdemoğlu, 2006; Skinner *et al.*, 2007). Sin embargo, habría que evaluar a profundidad si este mecanismo se desarrolla en *E. gracilis* durante la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$ .

## 9. CONCLUSIONES

- *E. gracilis* es un microorganismo no susceptible a la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$
- La máxima acumulación de  $\text{Pb}^{2+}$  en *E. gracilis* corresponde a 4627mg  $\text{Pb}^{2+}/\text{Kg}_{\text{PS}}$ , lo cual lo hace un microorganismo hiperacumulador.

- La cantidad basal de PolyP contribuye a la tolerancia de *E. gracilis* a  $Pb^{2+}$  pero no representan un mecanismo de resistencia.
- La concentración de  $Ca^{2+}$  modula la acumulación de  $Pb^{2+}$ , ya que la célula podría estar expresando transportadores de  $Ca^{2+}$  menos afines en la ausencia de este metal esencial

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar si disminuye la acumulación de  $Pb^{2+}$  en medios con una concentración de  $CaCO_3$  diferente o con células precondicionadas en un medio sin  $Ca^{2+}$ .
- Determinar si la tolerancia a  $Pb^{2+}$  esta mediada por el transporte de  $Ca^{2+}$  usando inhibidores específicos.

## 11. REFERENCIAS

Aickin R.M. y Dean A.C.R. (1977). Lead accumulation by microorganisms. *Microbios Lett* Vol. 5: 129-133.

Aickin, R.M. y Dean, A.C.R. (1979). Lead accumulation by *Pseudomonas fluorescens* and by *Citrobacter* sp. *Microbios Lett* Vol. 9: 55-66.

Aickin, R.M., Dean, A.C.R., Cheethama, K. y Skarnulias, A. J. (1979). Electron microscope studies on the uptake of lead by a *Citrobacter* species. *Microbios Lett*. Vol. 9: 7-15.

Ali H., Khan E. y Sajad M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. *Chemosphere*. Vol. 91(7): 869-881.

Antosiewicz D.M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ Pollut*. Vol. 134 (1): 23-34.

Archibald J.M. (2012). *The Evolution of Algae by Secondary and Tertiary Endosymbiosis. Genomic Insights into the Biology of Algae*. Elsevier. 87-118.

Arnon D.I. (1949). Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. Vol. 24 (1): 1-15.



- Atkins P. y Jones L. (1998) Química: Moléculas, Materia y Cambio. 3ª ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona. 266-267.
- Augé P. y Brès A. (2010). Estonian Biotechnology Programme. Feasibility study for an Estonian biotechnology programme. Republic of Estonia. Ministry of Economic Affairs and Communications of the Republic of Estonia. 53-54.
- Aviles C., Loza-Tavera H., Terry N. y Moreno-Sánchez R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch Microbiol. Vol 180 (1):1-10.
- Azizullah A., Murad W., Adnan M., Ullah W. y Häder D.P. (2013). Gravitactic orientation of *Euglena gracilis*—a sensitive endpoint for ecotoxicological assessment of water pollutants. Front Environ Sci. Vol. 1 (4).
- Banik S., Das K.C., Islam M.S. y Salimullah M. (2013). Recent Advancements and Challenges in Microbial Bioremediation of Heavy Metals Contamination. JSM Biotechnology & Biomedical Engineering. Vol. 2 (1): 1035.
- Barakat M. A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. Arab. J. of Chem. Vol. 4 (4): 361-377.
- Barstad J.A.B. (1977). Pesticides and Heavy Metals as Food Contaminants. Toxicological Aspects of Food Safety: Proceedings of the European Society of Toxicology. Springer-Verlag. 50.
- Bhagavan N.V. (2002). Medical Biochemistry. 4ª ed. Academic Press. 1016.
- Bergonia H.A., Franklin M.R., Kushner J.P. y Phillips J. D. (2015). A method for determining  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase activity in homogenized cells and tissues. Clin Biochem. Vol. 48 (12): 788-795.
- Bert V., Macnair M.R., De Laguerie P., Saumitou-Laprade P. y Petit D. (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). New Phytol. Vol. 146: 225-233.
- Biological Magnetic Resonance Data Bank. (2017, 18 enero). *BMRB Featured System: Calmodulin*. <http://www.bmrb.wisc.edu/featuredSys/calmodulin/calmodulin2.shtml>

- Brochin R., Leone S., Phillips D., Shepard N., Zisa D. y Angerio A. (2008). The Cellular Effect of Lead Poisoning and Its Clinical Picture. *J Health Sci.* Vol. 5 (2).
- Broeks A., Gerrard B., Allikmets R. y Plasterk R.H.A. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* Vol. 15 (22): 6132-6143.
- Burriel F., Lucena F., Arribas S. y Hernández J. (2008). *Química Analítica Cualitativa*. 18ª ed. Thomson Editores. 426-431.
- Calderón-Sánchez F., Castro J.J., Moreno-Rojas R., Tamariz-Castro-González N.P., Pérez-Sato M. y Soní-Guillermo E. (2017). Heavy metals in cow's milk and cheese produced in areas irrigated with waste water in Puebla, Mexico. *Food Addit & Contam: Part B.* Vol 11(1): 33-36.
- Cheng S., Grosse W., Karrenbrock F. y Thoennesen M. (2002). Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. *Ecol Eng.* Vol. 18 (3): 317-325.
- CODEX STAN 193-1995. Norma general del CODEX para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Comisión del CODEX Alimentarius. Adoptada 1995- Anmendada en 2009.
- Cotton A.F. y Wilkinson G. (1999). *Química inorganica avanzada*. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editoriales. 457-487.
- Covarrubias S.A. y Peña-Cabriales JJ. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategia de fitorremediación. *Rev Int Contam. Ambie.* 33 (Especial de Biotecnología e Ingeniería Ambiental): 7-21.
- Coppellotti O. (1989). Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium. *CBP Part C: Comparative Pharmacology.* Vol. 94 (1): 35-40.
- Cortés-Jiménez E.V., Mugica-Álvarez V., González-Chávez M.C., Carrillo-González R., Martínez-Gordillo M. y Vaca-Mier M. (2013). Natural revegetation ofalkaline tailing heaps at Taxco, Guerrero, Mexico. *Int J Phytoremediat.* Vol. 15: 127-141.

Das N., Vimala R. y Karthika P. (2008). Biosorption of heavy metals- An overview. Indian J. Biotechnol. Vol. 7: 159-169.

Dao L.H.T. y Beardall J. (2016). Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. Chemosphere. Vol. 147: 420-429.

Devars S., Avilés C., Cervantes C. y Moreno-Sánchez R. (2000). Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. Arch Microbiol. Vol. 174 (3):175-180.

Drazkiewicz M. (1994). Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. Photosynthetica. Vol. 30: 321-331.

Dzionic A., Wojcieszńska D. y Guzik U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. Electron J Biotechn. Vol. 23: 28-36.

Environmental Health Trust. (s. f.). *Lead*. Recuperado 2018, de <https://ehtrust.org/key-issues/toxins/lead/>

Emenike C., Jayanthi B., Agamuthu P. y Fauziah S.H. (2018). Biotransformation and Removal of heavy metals: A Review of Phyto and Microbial Remediation Assessment on Contaminated Soil. Environ Rev. Vol. 26 (2):156-168.

Einicker-Lamas M., Antunes G., Benavides T., Silva F., Guerra F., Miranda K., Attias M. y Oliveira M. (2002). *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> toxicity and accumulation in eukaryotic cells. Environ Pollut. Vol. 120 (3): 779-786.

Flora G., Gupta D. y Tiwari A. (2012). A review with recent uptades. Interdiscip Toxicol. Vol. 5 (2): 47-58.

Flora S.J. y Pachauri V. (2010). Chelation in metal intoxication. Int J Env Res Pub He. Vol. 7 (7): 2745-2788.

Freeley M., Kelleher D. y Long A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. Cell Signal. Vol. 23 (5): 753-762.

Förstner U. y Wittmann G. (1981). Metal Pollution in the Aquatic Environment. 2<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag. 484.

- Furuhashi T., Ogawa T., Nakai R., Nakazawa M., Okazawa A., Padermschoke A., Nishio K., Hirai M., Arita M. y Ohta D. (2014). Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia. *Metabolomics*. Vol. 11(1): 175–183.
- Gad G.M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*. Vol. 122 (2-4): 109-119.
- García-García J.D., Rodríguez-Zavala J.S., Jasso-Chávez R., Mendoza-Cozatl D. y Moreno-Sánchez R. (2009). Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol*. Vol. 191: 431-440.
- García-García J.D., Sánchez-Thomas R. y Moreno-Sánchez R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechn Adv*. Vol. 34 (5): 859-873.
- García-García J.D., Peña-Sanabria K.A., Shánchez-Thomas R. y Moreno-Sánchez R. (2018). Nickel accumulation by the green algae-like *Euglena gracilis*. *J. Hazard. Mater*. Vol. 343: 10-18.
- García-Vargas G.G., Rubio-Andrade M., Rosales-González M.G., Goytia-Acevedo R., García-Arenas G., Candelas-Rangel J.L., Meza-Velazquez R. y Caravanos J. (2007). Metal Contamination in Soil of the City of Torreon, Coahuila, Mexico. *RChSZA* 6: 165-168.
- Garbisu C. y Alkorta I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *Eur J Miner Process Environ Protec*. Vol. 3 (1): 58-66.
- Gibbs S.P. (1978). The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can J Bot*. Vol. 56 (22): 2883-2889.
- Gissibl A., Sun A., Care A., Nevalainen H. y Sunna A. (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Front Bioeng Biotech*. Vol. 7 (108).
- Gómez-Álvarez A., Moreno-Zazueta A., Rivera J., Campillo A., Grandlic C.J., Anaya R. y Palafox-Reyes J. (2009). The impact of unconfined mine tailings in residential areas from a mining town in a semi-arid environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere*. Vol. 77, 140-147.

González-Flores E., Tornero-Campante M.A., Sandoval-Castro E., Pérez-Magaña A. y Gordillo-Martínez A.J. (2011). Biodisponibilidad y fraccionamiento de metales pesados en suelos agrícolas enmendados con biosólidos de origen municipal. *Rev Int Contam Ambie.* Vol. 27 (4): 291-301.

Grill E., Winnacker E.L. y Zenk M.H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Sci.* Vol. 283: 674-676.

Guédron S., Duwig C., Prado B.L., Point D., Flores M.G. y Siebe C. (2014). (Methyl) Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World's Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State-Mexico). *Water Air Soil Pollut.* Vol. 225 (8).

Gunatilake S.K. (2015). Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater. *J Multidiscip (JMESS).* Vol. 1 (1): 12-18.

Gupta A., Joia J., Sood A., Sood R., Sidhu C. y Kaur G. (2016). Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. *JMBT.* Vol. 8: 364-372.

Gurer H. y Ercal N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Bio Med.* Vol. 29 (10): 927-945.

Haiyan W. y Stuanes A. (2003). Heavy Metal Pollution in Air- Water- Soil- Plant System of Zhuzhou City, Hunan Province, China. *Water Air Soil Poll.* Vol. 147 (1-4): 79-107.

Harrison R.M. y Laxen Duncan P.H. (1980). Physicochemical speciation of lead in drinking water. *Nature.* Vol. 286: 791-793.

Hashemi F., Leppard G.G. y Kushnert D.J. (1994). Copper resistance in *Anabaena variabilis*: Effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microb Ecol.* Vol. 27(2): 159-176.

Hernberg S. (2000). Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med.* Vol. 38 (3): 244-54.

Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K. y Hippler M. (2015). Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1847(9): 993-1003.

Huang J.W. y Cunningham S.D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* Vol. 134, 75-84.

- Hutner S.H., Bach M.K. y Ross G.T.M. (1956). A Sugar-Containing Basal Medium for Vitamin B<sub>12</sub>-Assay with *Euglena*; Application to Body Fluids. *J Protozool.* Vol. 3(3): 101-112.
- Igiri B.E., Okoduwa S.I.R., Idoko G.O., Akabuogu E.P., Adeyi A.O. y Ejiogu I.K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicol.* 1-16.
- INEGI. (2016). Generación de escenario de potencial de contaminación en el acuífero Silao-Romita, en Guanajuato. *Revista Internacional de Estadística y Geografía.* Vol. 7 (2): 40-56.
- Ishii N. y Uchida S. (2006) Removal of technetium from solution by algal flagellate *Euglena gracilis*. *J Environ Qual* Vol. 35 (6): 2017–2020.
- Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N. Mathew B.B. y Beeregowda K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* Vol. 7 (2): 60-72.
- Jaishankar M., Mathew B., Shah M.S., Krishna M. y Sangeetha G. (2014b). Biosorption of Few Heavy Metal Ions Using Agricultural Wastes. *JEPHH.* Vol. 2 (1): 1-6.
- Jarosláwiecka A. y Piotrowska-Seget Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology.* Vol. 160 (1): 12-25.
- Jan A.T., Azam M., Siddiqui K., Ali A., Choi I., y Haq Q.M. (2015). Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *I J Mol Sci.* Vol. 16 (12): 29592-29630.
- Järup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* Vol. 68: 167-182.
- Jensen T.E., Baxter M., Rachlin J.W. y Jani V. (1982). Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: An X-ray energy dispersive study. *Environ Pollut A.* Vol. 27(2): 119–127.
- Kawabata A., Inui H., Miyatake K., Nakano Y., y Kitaoka S. (1990). Production and composition of *Euglena* wax esters at high temperature. *Agr Biol Chem,* 54(3): 811–812.

- Karrari P., Mehrpour O. y Abdollahi M. (2012). A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures. DARU J Pharm Sci. Vol. 20: 2.
- Keasling J.D. (1997). Regulation of Intracellular Toxic Metals and Other Cations by Hydrolysis of Polyphosphate. Ann NY Acad Sci. Vol. 829 (1): 242-249.
- Keasling J.D. y Hupf G.A. (1996). Genetic Manipulation of Polyphosphate Metabolism Affects Cadmium Tolerance in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. Vol. 62 (2): 743-746.
- Keppler D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. Free Radical Bio Med. Vol. 27 (9-10), 985-991.
- Kondo N., Isobe M., Imai K. y Goto T. (1983). Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Tetrahedron Lett. Vol. 24: 925-928.
- Krajčovič J., Matej V. y Schwartzbach S.D. (2015). Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. J Biotechnol. Vol. 202: 135-145.
- Kühnlenz T., Hofmann C., Uraguchi S., Schmidt H., Schempp S., Weber M., Lahner B., Salt D. E. y Clemens S., (2016). Phytochelatin Synthesis Promotes Leaf Zn Accumulation of *Arabidopsis thaliana* Plants Grown in Soil with Adequate Zn Supply and is Essential for Survival on Zn-Contaminated Soil. Plant Cell Physiol. Vol 57 (11): 2342-2352.
- Kulakovskaya T. (2018). Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms. World J Microb Biot. Vol. 34 (139).
- Kumar A. y Prasad M.N. V. (2018). Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. Ecotox Environ Safe. Vol. 166: 401-418.
- Kurniawan T., Chan G., Lo W.H. y Babel S. (2006). Physico-chemical treatment techniques for wastewater landen with heavy metals. Chem Eng J. Vol. 118 (1-2): 83-98.
- Lee J. y Pandey, B. D. (2012). Bio-processing of solid wastes and secondary resources for metal extraction- A review. J Waste Manag. Vol. 32: 3-18.

LeBel D., Poirier G.G., y Beaudoin A.R. (1978). A convenient method for the ATPase assay. *Anal Biochem.* 85(1): 86-89.

Lira-Silva E., Ramírez-Lima I.S., Olín-Sandoval V., García-García J.D., García-Contreras R., Moreno-Sánchez R. y Jasso-Chávez R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J Hazard Mater.* Vol. 193: 216-224.

Mantzorou A. y Ververidis F. (2019). Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Sci Total Environ.* Vol. 651: 3187-3201.

Malekirad A.A., Oryan S., Fani A., Babapor V., Hashemi M., Baeri M., Bayrami Z. y Abdollahi M. (2010). Study on clinical and biochemical toxicity biomarkers in a zinc- lead mine workers. *Toxicol Ind Health.* Vol. 26 (6): 331-337.

Masindi V. y Muedi K. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. *Heavy Metals.* IntechOpen: 115-133.

Méndez-García T., Rodríguez-Dominguez L. y Palacios Mayorga S. (2000). Impact of Irrigation with Polluted Water, Evaluated by the Presence of Heavy Metals in Soils. *Terra.* Vol. 18 (4): 277-288.

Mendoza-Cózatl, D., Devars S., Loza-Tavera H. y Moreno-Sánchez, R. (2002) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol Plant.* Vol. 115 (2): 276–283.

Mendoza-Cózatl D.G., Rangel-González E. y Moreno-Sánchez R. (2006a). Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> Uptake and Accumulation by Photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch Environ Contam Toxicol.* Vol. 51: 521-528.

Mendoza-Cózatl D. G., Rodríguez-Zavala J.S., Rodríguez-Enríquez S., Mendoza-Hernández G., Briones-Gallardo R. y Moreno-Sánchez R. (2006b). Phytochelatin-cadmium-sulfide high- molecular- mass complexes of *Euglena gracilis*. *FEBS J.* Vol. 273: 5703-5713.

Meza-Figueroa D., Maier R.M., de la O-Villanueva M., Gómez-Alvarez A., Moreno-Zazueta A., Rivera J. y Palafox-Reyes J. (2009). The impact of unconfined mine tailings in residential areas from a mining town in a semi-arid environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere.* 77(1): 140-147.



- Miot J., Morin G., Skouri- Panet F., Férard C., Poitevin A., Aubry E., Ona-Nguema G., Juillot F., Guyot F. y Brown G. (2009). Speciation of arsenic in *Euglena gracilis* cells exposed to As (V). *Environ Sci Technol.* Vol. 43 (9): 3315-3321.
- Mireles F., Dávila J.I., Pinedo J.L., Reyes E., Speakman R.J. y Glascock M.D. (2012). Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by instrumental neutron activation analysis. *Microchem J* Vol. 103, 158-164.
- Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Kumar R., Seth C.S. y Gupta D.K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum L.*) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere.* Vol. 65 (6): 1027-1039.
- Miazek K., Waldemar I., Remacle C., Richel A. y Goffin D. (2015). Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *Int J Mol Sci.* Vol. 16, 23929-23969.
- Morales-Calderón L.S., Armenta-Ortiz N., Méndez-Trujillo V., Ruiz-Sanchez E., Gonzalez-Mendoza D., Grimaldo-Juarez O., Cervantes-Diaz L. y Aviles-Marin M. (2012). Copper induced biofilm formation and changes on photosynthetic pigment in *Euglena gracilis*. *Afr J Microbiol Res.* Vol. 6 (8): 1833-1836.
- Moreno S.N. y Docampo R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol.* Vol 56(3): 208-213.
- Mosa K.A., Saadoun I., Kumar K., Helmy M. y Dhankher O.P. (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Front Plant Sci.* Vol. 7 (303).
- Nakashima A., Yamada K., Iwata O., Sugimoto R., Atsuji K., Ogawa T., Ishibashi-Ohgo N. y Suzuki K. (2017).  $\beta$ -Glucan in foods and its physiological functions. *J Nutr Sci Vitaminol.* Vol 64: 8-17.
- Navarro L., Torres-Márquez M.E., González-Moreno S., Devars S., Hernández R. y Moreno-Sánchez R. (1997). Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells. *Comp. Biochem Physiol.* Vol. 116C (3): 265-272.

Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I. y Tominaga N. (2003). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. FEMS Microbiol Ecol. Vol. 44 (2): 253-259.

Norma Oficial Mexicana-001-SEMARNAT-1996. que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. 6 de enero de 1997.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. 22 de noviembre de 2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000. Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente. Diario Oficial de la Federación. 30 de mayo de 2000.

Nosheen N. y Jawaid F. (2010). Physiological Responses of *Phaseolus vulgaris* Different Lead Concentrations. Pak J Bot. Vol. 42(1): 239-246.

Ogbonna J.C., Tomiyama S., y Tanaka H. (1999). Production of  $\alpha$ -tocopherol by sequential heterotrophic–photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. J Biotechnol Vol. 70 (1-3): 213-221.

Oliva R. (2006). Protamines and male infertility. Hum Reprod Update. Vol. 12(4): 417-435.

Ornelas M., Sanín L.H., Díaz-Barriga F., Reza S. y Romieu I. (2007). Risk assessment in an old lead smelter complex in Chihuahua, México. Tecnociencia Chihuahua. Vol. 1 (1): 26-35.

Pal R.N. y Laloraya M.M. (1972). Effect of Calcium Levels on Chlorophyll Synthesis in Peanut and Linseed Plants. Biochem Physiol. Pflanzen (BPP). Vol. 163: 443-449.

Parr J. (1996). Some recent coordination chemistry of lead (II). Polyhedron. Vol. 16 (4): 551-566.

Parrotta L, Guerriero G., Sergeant K., Cai G. y Hausman J.F. (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. Front Plant Sci. Vol. 6 (133).

- Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D. y Malecka A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*. Vol. 60: 153-162.
- Prasanna R., Ratha S.K., Rojas C. y Bruns M.A. (2011). Algal diversity in flowing waters at an acidic mine drainage “barrens” in central Pennsylvania, USA. *Folia Microbiol.* Vol. 56 (6): 491-496.
- Proudfoot A.T. y Vale J.A. (2003, 4a). *Oxford Textbook of Medicine. Poisoning by drugs and chemicals.* Oxford University Press. 901.
- Pourrut B., Perchet G., Silvestre J., Cecchi M., Guiresse M. y Pinelli E. (2008) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J Plant Physiol.* Vol. 165 (6), 571–579.
- Quintanilla-Vega B., Hoover D. J., Bal W., Silbergeld E.K., Waalkes M.P. y Anderson L.D. (2000). Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chem Res Toxicol.* Vol. 13 (7): 594-600.
- Rachlin J.W., Jensen T.E., Baxter M. y Jani V. (1982). Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch Environ Con Tox.* Vol. 11: 323-333.
- Robles-Osorio M.L. y Sabath E. (2014). Breve historia de la intoxicación por plomo: de la cultura egipcia al Renacimiento. *Revista de Investigación Clínica.* Vol. 66 (1): 88-91.
- Rodríguez A.A., Berlin J. y Mejia J.A. (2002). Arsenic and lead pollution of the Salamanca aquifer, Mexico: Origin, mobilization and restoration alternatives. *Groundwater Quality: Natural and Enhanced Restoration of Groundwater Pollution.* Vol. 275: 561-265.
- Rodríguez-Zavala J.S., García-García J.D., Ortiz-Cruz M.A. y Moreno-Sánchez R. (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J Environ Sci Health A.* Vol. 42: 1365- 1378.
- Rodríguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G., y Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of  $\alpha$ -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J Appl Microbiol.* Vol. 109 (6): 2160–2172.

Rubio-Franchini I, López-Hernández M., Ramos-Espinosa M.G. y Rico-Martínez R. (2016). Bioaccumulation of Metals Arsenic, Cadmium, and Lead in Zooplankton and Fishes from the Tula River Watershed, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* Vol. 227 (5).

Sánchez-Thomas R., Moreno-Sánchez R. y García-García J.D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environ Exp Bot.* Vol. 131: 19-31.

Sánchez-Thomas R., García-García J.D., Marín-Hernández Á., Pardo J.P., Rodríguez-Enríquez S., Vera-Estrella R. y Moreno-Sánchez R. (2020). The intracellular water volume modulates the accumulation of cadmium in *Euglena gracilis*. *Algal Res.* Vol 46: 101774.

Schwartzbach S.D. y Shigeoka S. (2017). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Springer International Publishing.

Schiff J.A., Lyman H. y Russell G.K. (1971). Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Methods in enzymology*. Academic Press. Vol. 23A: 62-143.

Scoullou M.J., Vonkeman G.H., Thornton I. y Makuch Z. (2001, 1ª Ed.) Mercury-Cadmium- Lead. *Handbook for Sustainable Heavy Metals Policy and Regulation*. Springer Science + Business Media Dordrecht. Environment and Policy. Vol. 31: 273-289.

Shanab S., Essa A. y Shalaby E. (2012). Bioremoval Capacity of Three Heavy Metals by Some Microalgae Species (Egyptian Isolates). *Plant Signal Behavior*. Vol. 7 (3): 1-8.

Sharma P. y Dubey R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol.* Vol. 17(1): 35-52.

Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. Norma Oficial Mexicana NOM-127- SSA- 1994 "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". 20 de junio de 2000.

Serafim A., Company R., Lopes B., Rosa J., Cavaco A., Castela G., Castela E., Olea N. y Bebianno M.J. (2012). Assessment of essential and non-essential metals and different metal exposures biomarkers in the human placenta in a population from the South of Portugal. *J Toxicol Environ Health A.* Vol. 75 (13-15): 867-877.

- Setiawati M.D., Hindarti D. y Kaswadji R. (2009). Testing Toxicity of Lead and Cadmium in Micro Algae *Chaetoceros gracilis*. Conference: The 16th Tri-University International Joint Seminar and Symposium. Vol. 16.
- Sicko-Goad L. y Stoermer E.F. (1979). A morphological study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyta). J Phycol. Vol. 15: 316-321
- Sillén G.L. y Martell A.E. (1964). Stability constants of metal-ion complexes. London: The Chemical Society, Burlington House. No. 17. England, London.
- Simons T.J.B. (1988) Lead-Calcium Interactions and Lead Toxicity. In: Baker P.F. (eds) Calcium in Drug Actions. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg. Vol. 83: 209-225.
- Singh R., Gautam N., Mishra A. y Gupta R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. Indian J Pharmacol. Vol. 43 (3): 246-253.
- Singh N., Kumar A., Gupta V.K. y Sharma B. (2018). Biochemical and Molecular Bases of Lead-Induced Toxicity in Mammalian Systems and Possible Mitigations. Chem Res Toxicol. Vol. 31 (10): 1009-1021.
- Stokes P.M. (1981). Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae. J Plant Nutr. Vol. 3(1-4): 667-678.
- Tamás M., Sharma S., Ibstedt S., Jacobson T. y Christen P. (2014). Heavy Metals and Metalloids as a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. Biomolecules. 4(1): 252-267.
- UNAM-CONAGUA. (2016). Diagnóstico ambiental en la cuenca del Río Sonora afectada por el derrame del represo "Tinajas 1" de la mina Buenavista del cobre, Cananea, Sonora. Fiduciaria del Fideicomiso 80724 Río Sonora.
- Valdivia M.M. (2005). Intoxicación por plomo (Lead poisoning). Rev Soc Per Med Inter. Vol. 18 (1): 22-27.
- Vázquez-Alarcón A, Cajuste L.J., Carrillo-González R., Zamudio-González B., Álvarez-Sánchez E. y Castellanos-Ramos J.Z. (2005). Límites permisibles de acumulación de cadmio, níquel y plomo en suelos del Valle del Mezquital, Hidalgo. Terra Latinoamericana. Vol. 23(4): 447-455.

- Vhahangwele M. y Khathutshelo L.M. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. Heavy Metals. Intechopen. 118.
- Waldron H.A. y Stöfen D. (1974). Sub-Clinical Lead Poisoning. Academic Press. 224.
- Wan B.W.O., Ahamad Z.H., Mat A.N. y Hidayah N. (2017). Responses of a freshwater microalga, *Scenedesmus regularis* exposed to 50% inhibition concentration of Pb<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>. Malaysian Applied Biology. Vol 46 (4): 213-220.
- Wang H., Shan X., Wen B., Owens G., Fang J. y Zhang S. (2007). Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. Environ Exp Bot Vol. 61 (3): 246-253.
- Wang Y., Seppänen-Laakso T., Rischer H. y Wiebe M.G. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. PloS one. Vol. 13(4): e0195329.
- Wershaw R.L. (1976). Organic chemistry of Lead in Natural Water Systems. Mineralogy and Geology of the Wagnerite Occurance on Santa Fe Mountain, Front Range. Colorado. U.S. Government Printing Office. 14.
- Wójcik M., Dresler S. y Tukiendorf A. (2015). Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit- the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. Plant Soil. Vol. 390 (1-2): 237-250.
- Wyatt J.C., Fimbres C., Romo L., Méndez R.O. y Grijalva M. (1998). Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico. Environ Res. Vol. 76 (2): 114-119.
- Yamada K., Suzuki H., Takeuchi T., Kazama Y., Mitra S., Abe T., Goda K., Suzuki K. e Iwata O. (2016). Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting. Sci rep. Vol. 6 (1): 26327.
- Yáñez L., García-Nieto E., Rojas E., Carrizales L., Mejía J., Calderón J., Razo I. y Díaz-Barriga F. (2003). DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. Environ Research. Vol. 93: 231-240.