

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Toxicidad del cromo trivalente sobre el alga verde dictyosphaerium chlorelloides y su adaptación a ambientes acuáticos altamente contaminados con este estado de oxidación del metal pesado

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Pereira Martín

Director

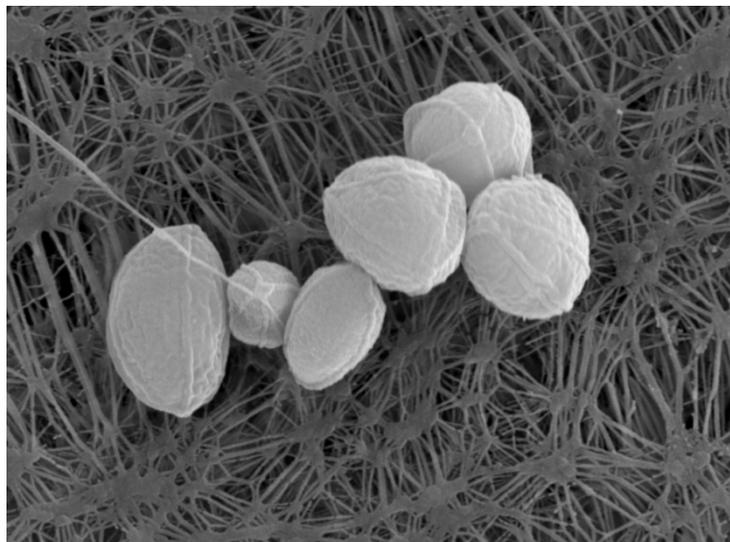
Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Dpto. Toxicología y Farmacología

*TOXICIDAD DEL CROMO TRIVALENTE
SOBRE EL ALGA VERDE
DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES
Y SU ADAPTACIÓN A AMBIENTES
ACUÁTICOS ALTAMENTE CONTAMINADOS
CON ESTE ESTADO DE OXIDACIÓN DEL
METAL*



MARÍA PEREIRA MARTÍN

MADRID, 2.012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Dpto. Toxicología y Farmacología



**TOXICIDAD DEL CROMO TRIVALENTE SOBRE EL
ALGA VERDE DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES
Y SU ADAPTACIÓN A AMBIENTES ACUÁTICOS
ALTAMENTE CONTAMINADOS CON ESTE ESTADO
DE OXIDACIÓN DEL METAL**

Memoria presentada por:

María Pereira Martín

Licenciada en Veterinaria

Bajo la dirección de:

Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

para optar al grado de Doctor en Veterinaria

y para que así conste, lo firma en Madrid el 30 de Abril de 2012

La doctoranda: María Pereira Martín



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

El Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez, Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

INFORMA

Que el trabajo de Tesis titulado *“Toxicidad del cromo trivalente sobre el alga verde Dictyosphaerium chlorelloides y su adaptación a ambientes acuáticos altamente contaminados con este estado de oxidación del metal”* ha sido realizado en el Departamento de Toxicología y Farmacología bajo su dirección.

Y para que conste, lo firma en Madrid, a 30 de Abril de dos mil doce.

Fdo.: Dr. Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez
Profesor Titular de Universidad
Dpto. Toxicología y Farmacología
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Universidad Complutense de Madrid la posibilidad que me ha brindado de estudiar en la Facultad de Veterinaria, donde he recibido la formación y experiencia de su Equipo Docente, necesarias para llegar hasta este punto.

También agradecer al Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, y en especial al Dr. Sebastián Sánchez-Fortún, la paciencia y dedicación a la hora de ir perfilando esta Tesis hasta lo que es ahora.

A Ñita, compañera de laboratorio, de publicaciones y de mucho más que pipetas Pasteur.

Este documento no sería posible sin la colaboración del Dpto. de Producción, área de Genética, especialmente al Dr. Eduardo Costas y la Dra. Victoria López Rodas, gracias a los cuales pude acceder a su magnífica colección de algas.

Tampoco estarían completos estos agradecimientos sin la presencia del personal del ICTS-Centro Nacional de Microscopía Electrónica Luis Bru, en especial a Ana Vicente y Agustín Fernández, tanto por la preparación de las muestras como en su observación a través de los equipos que nos fueron facilitados.

Mención especial al Dr. José María Alunda, Catedrático del Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, y a su equipo, por su asesoramiento científico en el estudio de las proteínas.

Con relación a ese mismo apartado, he de agradecer al Dr. Ernesto García López, de Grupo de Genética Bacteriana del Dpto. de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, no sólo por abrirnos la puerta a sus instalaciones, sino también por facilitarnos el entendimiento de la Proteómica, sin la cual no habríamos llegado a realizar muchas de las hipótesis que se plantean en este manuscrito.

Madrid, 30 de Abril de 2012

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	Pág. 7
1.1. Cromo	Pág. 8
1.1.1. Identidad, Producción y Usos	Pág. 8
1.1.2. Incorporación del Cromo en el Medio Ambiente	Pág. 9
1.1.3. Destino Medioambiental del Cromo	Pág. 11
1.1.4. Impacto del Cromo en el Medio Acuático	Pág. 13
1.1.5. Recuperación y Reciclaje del Cromo	Pág. 15
1.1.6. Tratamiento Utilizados para la Eliminación de Cromo	Pág. 16
1.2. Importancia del Cr(III) en Toxicidad Acuática	Pág. 18
1.3. Detoxicación de Metales Pesados en Algas Verdes	Pág. 22
1.3.1. Características generales de las Metalotioneínas III (MtIII)	Pág. 24
1.3.1.1. Estructura general de las MtIII	Pág. 24
1.3.1.2. Identificación Génica de la Fitoquelatina Sintasa	Pág. 25
1.3.1.3. Biosíntesis y Regulación de las MtIII	Pág. 25
1.3.1.4. Iones Sulfuro y Función en MtIII	Pág. 26
1.3.1.5. Secuestro y compartimentación vacuolar	Pág. 27
1.4. Metalotioneínas tipo (MtIII) en Algas	Pág. 29
1.4.1. Síntesis	Pág. 29
1.4.2. Función Fisiológica e Importancia Ecológica	Pág. 29
1.4.3. Iones Sulfuro	Pág. 30
1.4.4. Secuestro Vacuolar	Pág. 31
1.4.5. Secuestro en Cloroplastos y Mitocondrias	Pág. 32
1.4.6. Tamaño de la cadena de las MtIII	Pág. 33
1.4.7. MtIII y otros Mecanismos Relacionados con la Desintoxicación de Metales Pesados	Pág. 33
1.4.8. Genómica funcional del estrés por metales pesados en algas	Pág. 35
1.4.8.1. Genes que Codifican Metalotioneínas en Algas	Pág. 36
1.5. Eliminación de Metales Pesados por Microalgas	Pág. 37
1.5.1. Biotecnologías Basadas en Algas para la Remediación de Metales Pesados	Pág. 37
1.5.2. Capacidad de Diferentes Especies de Microalgas para Eliminar Metales Pesados	Pág. 39
1.6. Proteómica	Pág. 39

1.6.1.	Secuenciación de novo de Péptidos y Proteínas por Espectrometría de Masas	Pág. 39
1.6.2.	Secuenciación Peptídica	Pág. 41
1.6.3.	Derivación y Etiquetado	Pág. 42
1.6.4.	Precisión de Masa	Pág. 43
1.6.5.	Diferenciación Proteica a partir de la Secuencia Peptídica	Pág. 44
1.6.6.	Secuenciación “Top-Down”	Pág. 45
1.6.7.	Análisis e Interpretación de los Datos	Pág. 45
1.7.	Estrés Medioambiental y Proteómica	Pág. 46
1.7.1.	Observaciones Generales sobre Proteómica en Medio Ambiente	Pág. 47
1.7.2.	Estrategias para la Identificación de Proteínas en el Medio Ambiente	Pág. 49
1.7.2.1.	<i>Bioinformática: Herramientas de Identificación de Proteínas</i>	Pág. 50
1.7.3.	Resultados obtenidos con la Proteómica a Nivel Medioambiental	Pág. 52
2.	OBJETIVOS	Pág. 56
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	Pág. 58
3.1.	Principio Químico	Pág. 59
3.2.	Material Biológico	Pág. 59
3.2.1.	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Pág. 59
3.3.	Medio de Cultivo de <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Pág. 60
3.4.	Obtención y Mantenimiento de las Poblaciones	Pág. 61
3.5.	Ensayos de Toxicidad del Cr(III)	Pág. 62
3.5.1.	Inhibición del Crecimiento Poblacional	Pág. 62
3.5.2.	Determinación de Rendimiento Cuántico Fotosintético (Φ_{PSII})	Pág. 63
3.5.3.	Determinación del Balance de Oxígeno	Pág. 63
3.6.	Obtención de Células de <i>D. chlorelloides</i> Tolerantes a Cr(III)	Pág. 65
3.7.	Estudio Ultramicroscópico Celular	Pág. 66
3.7.1.	Preparación de las Muestras para Microscopía Electrónica	Pág. 66
3.7.1.1.	<i>Fijación</i>	Pág. 66
3.7.1.2.	<i>Deshidratación</i>	Pág. 67
3.7.1.3.	<i>Post-fijación</i>	Pág. 68
3.7.1.4.	<i>Punto crítico y recubrimiento metálico</i>	Pág. 69

3.7.1.5.	<i>Inclusión</i>	Pág. 70
3.7.2.	Microscopios Electrónicos Utilizados para el análisis	Pág. 71
3.8.	Análisis Proteómico	Pág. 72
3.8.1.	Preparación de las Muestras para el Análisis de Proteínas	Pág. 72
3.8.2.	Electroforesis SDS-PAGE	Pág. 73
3.8.3.	Identificación de Proteínas por Espectrometría de Masas	Pág. 75
3.8.3.1.	<i>Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación de péptidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).</i>	Pág. 75
3.9.	Análisis Estadístico de los Resultados	Pág.77
4.	RESULTADOS	Pág. 80
4.1.	Ensayos de Toxicidad Aguda	Pág. 81
4.2.	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> tolerante a Cr(III)	Pág. 84
4.2.1.	Estudio Morfológico	Pág. 85
4.2.1.1.	<i>Resultados Obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	Pág. 86
4.2.1.2.	<i>Resultados Obtenidos por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	Pág. 85
4.2.1.3.	<i>Acúmulo de Cromo Celular por Energía Dispersiva de Rayos X (EDX)</i>	Pág. 88
4.2.2.	Estudio Proteico	Pág. 91
4.2.2.1.	<i>Diferenciación proteica por Electroforesis SDS-PAGE</i>	Pág. 91
4.2.2.2.	<i>Identificación de Proteínas mediante Huella Peptídica y Fragmentación de Péptidos mediante Espectrometría de Masas</i>	Pág. 92
4.2.2.2.1.	<i>Banda proteica de 23,052 KDa</i>	Pág. 92
4.2.2.2.2.	<i>Banda proteica de 153,793 KDa</i>	Pág. 99
4.2.2.2.3.	<i>Identificación Proteica a partir de Bases de Datos</i>	Pág. 106
5.	DISCUSIÓN	Pág. 107
5.1.	Análisis Toxicológico	Pág. 108
5.2.	Análisis Ultraestructural	Pág. 109
5.3.	Análisis Proteómico	Pág. 111
6.	CONCLUSIONES	Pág. 115
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 118

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cromo

1.1.1. Identidad, Producción y Usos

El cromo (Cr), con número atómico 24 y peso atómico relativo de 52.0, pertenece al grupo VIB de la tabla periódica. El cromo elemental es un metal gris, brillante que es extremadamente resistente a los agentes corrosivos ordinarios. A pesar de haber sido identificados más de 40 minerales que contienen cromo, y de ser el séptimo elemento más abundante en la Tierra, está normalmente presente sólo en pequeñas cantidades (es decir, <1000 µg/g) en la corteza terrestre. Casi todas las formas de cromo de la corteza terrestre aparecen en estado de oxidación trivalente en cromita mineral más importante (FeCr₂O₄). Aunque el cromo puede existir en nueve estados de oxidación diferentes, a partir de (II) a (VI), sólo el cromo (III) y (VI) son comunes en ambientes naturales.

La capacidad mundial de obtención de mineral de cromita, así como la producción de ferrocromo, cromo metálico, productos químicos de cromo y acero inoxidable, junto con su consumo aparente en 2008 (Fuente: *Index Mundi*), se incluye en la Tabla 1.1.1-1.

Mineral	Ferrocromo	Metal	Químicos	Acero inox.	Consumo
6.950	4.780	43	272	5.210	6.149

Tabla 1.1.1-1. Obtención y utilización mundial de cromo en 2008.

El ferrocromo es una aleación utilizada en la producción de acero inoxidable y resistente al calor, utilizado en ambientes corrosivos como el procesamiento de petroquímicos, entornos de alta temperatura (turbinas y calderas) y en bienes de

consumo tales como los cubiertas y decoración (Phillips, 1988). Aleaciones de cobre-cromo se utilizan en aplicaciones eléctricas que requieren alta resistencia y buena conductividad, mientras que el cobre-níquel-cromo se aplica en aleaciones utilizadas en equipos marinos que requieren alta resistencia a la corrosión (Nriagu, 1988). La industria del automóvil es un importante usuario de las aleaciones de cromo en forma de componentes de acero inoxidable, convertidores catalíticos, adornos cromados, y para el control de otros sistemas de decoración. Existen superaleaciones que contienen cromo, con alta resistencia al calor, y que se utilizan en motores de aviones y equipos aeroespaciales (Nriagu, 1988).

1.1.2. Incorporación del Cromo en el Medio Ambiente

El cromo se encuentra, relativamente inerte como Cr(III) en las fases sólidas, y se libera al el medio acuático en cantidades limitadas por acciones climáticas y de erosión. Las emisiones atmosféricas de cromo a partir de fuentes naturales vienen derivadas del elemento en suspensión, ya que el polvo transportado por el viento es la principal fuente natural de cromo en la atmósfera de la Tierra (Nriagu, 1990). La erosión eólica de los suelos puede ser una fuente natural importante de aire con cromo. Aunque la mayoría de cromo liberado de fuentes naturales es, probablemente, en la forma trivalente, tanto el Cr(III) como el Cr(VI) pueden estar presente en los desechos antropogénicos liberados al medio ambiente.

Se estima que cada país desarrollado puede liberar alrededor de 84 toneladas anuales de cromo (incluyendo tanto las formas tri cromo hexavalente) a la atmósfera provenientes de fuentes antropogénicas. De ellas, aproximadamente un 54% son atribuibles a la combustión de elementos fósiles, un 29% para diversos procesos industriales (producción de hierro y acero, procesamiento de refractarios y productos químicos, etc.), y un 12% a actividades relacionadas con el transporte, tales como la combustión de vehículos de motor. Las fuentes secundarias incluyen el desgaste de los neumáticos y pastillas de freno, uso de convertidores catalíticos de automóviles basados en cromo, o la liberación de polvo cromado utilizado en los *toners* de fotocopiadoras (ATSDR, 1988).

La información disponible es insuficiente para permitir un inventario completo acerca de la carga de cromo presente en aguas superficiales. Sin embargo, dado que el cromo se utiliza en una amplia variedad de productos manufacturados, lo más probable es que penetre al medio ambiente acuático a partir de muy diversas fuentes industriales. Según los datos disponibles en países con alto consumo de cromo, como por ejemplo Canadá, por lo menos 27 toneladas de cromo se vierten anualmente, en forma de vertido líquido, a partir de fundiciones, refinerías y plantas de acabado de metales básicos (MacLatchy, 1992).

Debido a la gran cantidad de pequeñas industrias que utilizan cantidades de cromo, resulta importante tener en cuenta que el cromo también puede ser descargado a las plantas de tratamiento de aguas residuales. En un estudio realizado en Ontario (Canadá), implicando un total de 37 plantas de tratamiento, las concentraciones medias geométricas de cromo en las aguas residuales que entraban en dichas plantas fue de 51 ug/L (MOE, 1988). Niveles similares de cromo se han encontrado en aguas residuales de otros municipios (Nielsen y Hrudey, 1983; Rao y Viraraghavan, 1992).

Otras fuentes potencialmente significativas de cromo en el medio acuático incluyen las descargas de las industrias de curtido de cuero, escorrentías de aguas pluviales, a partir de efluentes las plantas de celulosa y papel, o los vertidos de instalaciones térmicas (Ontario Hydro, 1992).

El contenido de cromo de los residuos domésticos europeos por lo general están en el rango de 50-100 mg/g (Rousseaux *et al.*, 1989). Según estos datos, la eliminación anual de cromo de por esta vía podría ser estimada en 600-1.200 Tm. Asumiendo una eficiencia de remoción de tratamiento de más del 80%, la mayoría del cromo que entra en las aguas residuales municipales cada año se retira unido al lodo, con el consiguiente peligro al ser éste utilizado para prácticas agrícolas (Webber y Shames, 1987).

Finalmente, la manipulación y almacenamiento de productos químicos para conservación de la madera que contienen cromo pueden inducir a la transferencia de grandes cantidades de cromo hexavalente a suelos (Bamwoya *et al.*, 1991). El desgaste de la madera tratada expuesta a la lluvia ácida también puede liberar cromo a los suelos (Warner y Solomon, 1990). Escasa información existe acerca de las

concentraciones de cromo en lixiviados, pero algunos estudios indican que las concentraciones de Cr(VI) en éstos podrían superar los 120 mg/L (MOE, 1991)

1.1.3. Destino Medioambiental del Cromo

El destino de cromo vertido en el medio ambiente puede variar dependiendo de su forma química (Murray *et al.*, 1983; Campbell y Yeats, 1984). El cromo trivalente tiende a estar asociado con fases sólidas relativamente inertes, y por lo tanto puede acumularse y persistir en sedimentos y suelos, pero la disponibilidad para su absorción por la biota puede ser limitada. Los resultados de estudios recientes indican que las formas lábiles de Cr(III) pueden ser oxidadas fotoquímicamente a Cr(VI) en aguas superficiales aeróbicas. La mayoría de las formas de Cr(VI) son muy solubles y no son fácilmente adsorbidas en la materia particulada. El cromo hexavalente puede persistir en su forma biodisponible en la aguas superficiales y aguas aeróbicas, pero se reduce a formas menos móviles de Cr(III) cuando se encuentra en condiciones anaeróbicas.

El cromo es liberado a la atmósfera principalmente en forma de partículas. Aunque se sabe poco acerca de la forma química del cromo en el aire, los óxidos de Cr(III) se espera aparezcan fruto de la combustión de combustibles fósiles y plantas de procesamiento del mineral, mientras que el Cr(VI) deberían estar presentes en la fabricación de cromato y en plantas de procesamiento. Si bien no se ha identificado la especiación de cromo en el aire, se cree que el cromo hexavalente constituye el 3-8% del cromo total en aire (California Air Resources Board, 1985). Ya que el cromo en el aire se asocia principalmente con las fases de partículas en suspensión (Davidson y Wu, 1989), se elimina de la atmósfera principalmente por medio de las precipitaciones húmedas. El tiempo de residencia de cromo en la atmósfera se estima en menos de 14 días (Nriagu *et al.*, 1988).

El Cr(III) forma óxidos altamente insolubles, hidróxidos y fosfatos, y es adsorbido por las partículas en suspensión. En disolución, el Cr (III) se elimina rápidamente de la superficie de las aguas por sedimentación de las partículas (Cranston y Murray, 1978). Sin embargo, el Cr(III) también puede formar complejos estables con muchos ligandos disueltos o en forma coloidal, orgánicos e inorgánicos. Estos

complejos Cr(III) son relativamente poco afectados por la adsorción y las reacciones de precipitación, y por lo tanto pueden permanecer en la columna de agua (Masscheleyn *et al.*, 1992). Estudios realizados por Johnson *et al.* (1992) indican que, en el agua anóxica profunda coloidal, el Cr(III) puede ser la especie dominante de cromo. Aunque hay algunos oxidantes capaces de convertir Cr(III) a Cr(VI), la cinética de la oxidación es normalmente muy lenta, si bien se ha sugerido que las formas lábiles (incluyendo disueltas y coloidales) de Cr(III) se pueden convertir en Cr(VI) con relativa rapidez por medio de potentes oxidantes, tales como el H₂O₂, que se producen en las aguas superficiales fotoquímicamente aeróbicas (Pettine y Millero, 1990; Pettine *et al.*, 1991 y 1992; Nriagu *et al.*, 1993).

Debido a su asociación con las fases de partículas en suspensión, una gran proporción del Cr(III) presente en aguas superficiales se transfiere a los sedimentos. Sin embargo, en los sedimentos aeróbicos el Cr(III) puede ser oxidado por óxidos de manganeso e hidróxidos presentes en la interfase agua-sedimento (Saleh *et al.*, 1989; Bartlett y James, 1988), y se ha sugerido que como resultado de ello, el Cr(VI) puede ser liberado al medio acuático (Gaillard *et al.*, 1986).

En contraste con el Cr(III), el Cr(VI) no es fácilmente absorbido en aguas de superficie, ya que la mayoría de sus sales son solubles. Gran parte del Cr(VI) aparece en las aguas superficiales aeróbicas en forma de hidrocromato o cromato, y en formas iónicas dicromato (Rai *et al.*, 1989). Sin embargo, el Cr(VI) disuelto se puede convertir a Cr(III) por un grupo de agentes reductores tales como S²⁻, Fe(II), ácido fúlvico, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y por proteínas, por lo que es removido de la solución, sobre todo en aguas más profundas anaeróbicas (Nriagu *et al.*, 1993). La efectividad de estos agentes reductores varía con el pH, condiciones redox, y las concentraciones de cromo total (Nriagu *et al.*, 1993). Una pequeña cantidad de Cr(VI) también puede ser absorbido por el plancton y lanzado como Cr(III) a mayores profundidades, donde el oxígeno está muy reducido (Beaubien, 1993).

Aunque el cromo natural está presente como formas relativamente inertes de Cr(III) en la mayoría de los suelos, con el tiempo el Cr(III) puede ser movilizado por lixiviación ácida (Bartlett y James, 1988). El cromo(III) puede ser oxidado a Cr(IV) por los óxidos de manganeso presentes en los suelos, pero sólo un pequeño porcentaje

del Cr(III) en el suelo suele estar presente en forma oxidable (Bartlett y James, 1988). La oxidación de Cr(III) a Cr(VI) se facilita por la presencia de humedad y pequeñas cantidades de materia orgánica, y se puede mejorar en los suelos superficiales mediante elevadas temperaturas, por ejemplo las creadas en incendios forestales (Cary, 1982).

El cromo (VI) que se añade o se forma en suelos puede ser eliminado de la solución mediante la absorción por organismos vivos, lixiviación, adsorción, o reducción, a formas Cr(III) relativamente inmóviles (Bartlett y James, 1988). En general, la reducción se ve favorecida en suelos anaeróbicos (por ejemplo, anegados o de gran riqueza orgánica) o ácidos (Bartlett y James, 1988; Masscheleyn *et al.*, 1992). La adsorción se espera que sea más eficaz en suelos neutros a ligeramente ácidos, especialmente aquellos que contienen cantidades grandes de óxidos de hierro (Rai *et al.*, 1989). La adsorción de Cr(VI) puede reducirse o inhibirse completamente por reducción a Cr(III), o con el aumento del pH del suelo (encalado, adición de fertilizantes de fosfato), dando lugar probablemente a una removilización de Cr(VI) adsorbido (Bartlett y James, 1988).

En general, el Cr(VI) se absorbe a nivel celular más fácilmente que el Cr(III) (Nieboer y Jusys, 1988). El cromo es fácilmente acumulado por la biota acuática (NAS, 1974; Jackson, 1988; Havas y Hutchinson, 1987), aplicando factores de corrección entre 100 y 1000 para expresar el riesgo de bioconcentración (CCREM, 1987). El cromo no sufre, sin embargo, un fenómeno de biomagnificación en las cadenas tróficas, ya sean acuáticas o terrestres (Mance, 1987; Outridge y Scheuhammer, 1993). En la mayoría de los organismos, el Cr(VI) se reduce a Cr(III), forma que comúnmente es encontrada en proteínas, enzimas y nucleótidos (Nieboer y Jusys, 1988).

1.1.4. Impacto del Cromo en el Medio Acuático

Todos los sectores de nuestra sociedad generan residuos: industria, agricultura, minería, energía, transporte, construcción, consumidores etc., y éstos contienen contaminantes que son eliminados en forma de materiales como tal, como productos

derivados de su tratamiento, o directamente como sustancias químicas. La contaminación aparece como consecuencia de la liberación de estos contaminantes más allá de la capacidad de asimilación del medio ambiente. Los residuos industriales se generan a partir de diferentes procesos y la cantidad y toxicidad de los residuos liberados varía de acuerdo con sus propios procesos industriales específicos (Shen, 1999).

El cromo, a altas concentraciones, se comporta como tóxico, mutagénico, teratógeno y carcinogénico. El cromo existe en los estados de oxidación de +2, +3 y +6. El estado de oxidación trivalente es la forma más estable de cromo, es esencial para los mamíferos a concentraciones traza y relativamente inmóvil en los sistemas acuáticos, debido a su baja solubilidad en agua. El cromo hexavalente es mucho más tóxico para la mayoría de las plantas, animales y bacterias que habitan ambientes acuáticos. La mayoría de los microorganismos son sensibles al efecto tóxico del Cr(VI), pero algunos grupos poseen mecanismos de resistencia para tolerar altos niveles de este elemento. En las aguas naturales persisten dos estados de oxidación estables de cromo (III y VI), ambos con alta biodisponibilidad y ejerciendo efecto tóxicos, siendo el Cr(VI) más soluble en agua, con mayor grado de toxicidad, y actuando como un fuerte agente oxidante que causa graves daños a las membranas celulares (Marchese *et al.*, 2008).

La contaminación de cromo en todo el mundo ha surgido principalmente de la práctica común de eliminación de residuos de diferentes industrias con la forma dominante de Cr(III) termodinámicamente estable. Sin embargo, la reciente detección de niveles tóxicos significativos de Cr(VI) en aguas superficiales y subterráneas en diferentes partes del mundo plantean cuestiones críticas relacionadas con la disposición actual de los residuos que contienen cromo. A pesar de la estabilidad termodinámica de Cr(III), la presencia de ciertos minerales naturales, en especial los óxidos de MnO₂, puede aumentar la oxidación de Cr(III) a Cr(VI) en el medioambiente. Este factor es de interés público, porque a un pH elevado, Cr(VI) es biodisponible, siendo esta forma muy móvil y por lo tanto, representa el mayor riesgo de contaminación de las aguas (Avudainayagam *et al.* 2003).

Actividades industriales como galvanoplastia, limpieza de metales, procesos de tintaciones, cementeras o curtido del cuero son los principales sectores que desempeñan

un importante papel en la liberación de cromo al medioambiente. Un estudio indicó que el efecto tóxico de este elemento puede ser variable, dependiendo de las especies involucradas, y así, efluentes industriales presentaron un ratio de movilización menor a 5 (potencialmente tóxico) en determinadas plantas, mientras que dicho ratio sobrepasaba el nivel 5 en otras, catalogadas como malas hierbas, que presentaban un excelente aspecto en la etapa de floración temprana (Kisku *et al.*, 1999). Estos resultados hicieron que diferentes autores estudiaran el fenómeno acumulativo del cromo en la cadena trófica, y así, Marchese *et al.*, (2008), estudiando cuatro plantas de agua dulce, almenas, cangrejos y peces, encontraron unos preocupantes niveles de de cromo y demostraron su alto potencial de acumulación. Esto indicaba claramente un problema para los seres humanos, que se encuentran en la parte superior de la cadena alimentaria.

1.1.5. Recuperación y Reciclaje del Cromo

Como norma general, en muchos procesos industriales en los que se utiliza cromo, sólo un 60-70% del total empleado es realmente usado, mientras que el resto permanece en el sistemas y, en el mejor de los casos, es enviado a una planta para tratamiento de aguas residuales. Este uso ineficiente del cromo y su liberación al medio ambiente tiene que ser compensado mediante el diseño de una buena recuperación y reciclaje (Cassano *et al.*, 2007).

Varias técnicas de recuperación, tales como la precipitación química, paso de membrana, adsorción, redox o intercambio iónico se han propuesto para este fin. Distintos estudios han demostrado que la combinación de nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI) puede proporcionar una mejor recuperación del cromo que no ha reaccionado en el proceso tecnológico. Sin embargo, esta técnica precisa una alta demanda biológica de oxígeno (DBO) que puede ocasionar un fallo, temporal o permanente, en las siguientes partes del sistema (Cassano *et al.*, 2007).

En la práctica, hay dos metodologías de reciclaje del cromo, una de forma directa y otra de forma indirecta. El reciclaje directo implica la recuperación sobre el elemento industrial para ser reutilizado de nuevo, mientras que el reciclaje indirecto

lleva consigo la precipitación y separación del cromo, para posteriormente volver a disolver en medio ácido para su reutilización. La eficacia de ambos métodos puede ser muy alta (más del 90%), dependiendo de la eficacia del proceso de recolección y la técnica de reciclaje/reutilización. De los dos enfoques, la recuperación del cromo que se utiliza más ampliamente es la precipitación, pero sin embargo, se hace obligatorio adoptar y practicar las nuevas tecnologías más eficientes en la recuperación de este producto químico (Ludvík, 2000).

El uso de compuestos químicos para el tratamiento de cromo no es un fenómeno nuevo. Un estudio realizado por Ali-Awan *et al.* (2003) identificó tres oxidantes acuosos, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio, de forma independiente en la oxidación del cromo(III), que contenían aguas residuales en condiciones alcalinas. Entre ellos, el peróxido de hidrógeno era potencialmente el oxidante adecuado, ya que podría recuperar cromato (CrO_4^{2-}) hasta el 98% (de solución sintética Cr^{3+}), y el 88% si era a partir de los mismos efluentes. La recuperación de cromo podría ayudar a reducir la posibilidad de oxidación de Cr(III) a Cr(VI) y ayudar a rescatar el costo financiero y ambiental producido como consecuencia de ello. Otros elementos, como el pH, temperatura y tiempo, deben ser controlados para una recuperación más eficiente.

1.1.6. Tratamientos Utilizados para la Eliminación de Cromo

Una amplia gama de procesos físicos y químicos están disponibles para la eliminación del Cr(VI) de los efluentes. Un gran inconveniente de los sistemas de tratamiento es la producción de lodos, además de los costos operativos elevados, que hacen complicado su gestión. En realidad, esto hizo que la aplicación de estas tecnologías se limitara únicamente a países desarrollados. En respuesta a ello, se llevaron a cabo estudios para hacer factible y rentable su uso mayoritario. Nomanbhay y Palanisamy (2005) elaboraron un nuevo absorbente a base de quitosano, el cual tiene una mayor capacidad de absorción de distintos iones metálicos, incluyendo el cromo.

Un estudio comparativo llevado a cabo por lixiviación, a través de columnas de vermiculita, ha sido evaluado para remover cromo de efluentes. El sistema era

capaz de extraer hasta el 74,6% del cromo, al igual que otros cationes como Ca, Na, Mg y K. Por supuesto, el alto grado de intercambio iónico ayudaba a hacer más eficiente el sistema (Jayabalakrishnan y Aselvaseelan, 2007).

Diferentes estudios realizados recientemente se están concentrando el uso de medios combinados bajo control de las condiciones laborales, que incluyen tiempo y pH. Tadesse *et al.* (2006) comprobaron la eficiencia de remoción de cromo de aguas residuales, que llegó a cubrir un rango de 58-95% para Cr(III) cuando se incrementaba el pH, llegando a ser óptimo a un valor de 8.

Una cantidad significativa de cromo también ha podido ser eliminado de lagunas de acumulación, teniendo la presencia de sulfuros un papel fundamental en la eliminación total de cromo. El proceso tiene un efecto de coagulación, además de mantener un pH favorable para la formación de un precipitado de Cr(OH)₃. Sin embargo, dado que el cromo no tiene ningún precipitado estable con sulfuro, no tiene ningún efecto en la remoción química del cromo. Sin embargo, con Cr(III), y mediante sedimentación en tanques, se ha llegado a cumplir con la mayoría de los actuales límites de descarga de Cr(III). Este estudio es importante en la búsqueda de formas de lograr la máxima eliminación de cromo y la producción de un efluente que cumple los criterios estándar para la descarga al medio acuático (Tadesse *et al.*, 2006).

La preocupación creciente por el deterioro de las condiciones ambientales puede ser una fuerza impulsora para evaluar y remediar los procesos contaminantes en los ecosistemas. En este sentido, el uso de especies vegetales, especialmente algas, está reconocido en la gestión de la contaminación con este metal. Rai *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre la variación estacional de crecimiento de algas en el potencial de acumulación de efluentes para el plan de eliminación de cromo. Estos autores han observado diferentes especies de algas con cromo acumulado en sus tejidos, lo que podría ser utilizado en el desarrollo de la estrategia de biorremediación para reducir la contaminación. Por supuesto, factores como la densidad de población, el volumen de efluentes, la naturaleza de la mezcla entre biomasa de algas y el efluente, deben ser considerados y examinados mucho antes de la promoción de una amplia aplicación de estos sistemas (Rai *et al.*, 2005).

La caracterización de aguas residuales es un paso importante en el diseño de instalaciones de tratamiento eficaces para las aguas residuales industriales. La

caracterización también es necesaria para evaluar el desempeño de las operaciones unitarias y procesos individuales. La mayoría de los contaminantes en aguas residuales parecen existir ya sea en forma de partículas o bien están asociados con partículas. Este conocimiento llevó a la estrategia del tratamiento de aguas residuales en un primer paso de eliminación de partículas y materia coloidal, utilizando coagulantes adecuados. Entre ellos, el alumbre ha resultado ser el coagulante adecuado para aguas residuales en un rango de dosis de 200-240 mg/L como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, eliminando entre el 98.7-99.8% del cromo total (Haydar y Aziz, 2007).

1.2. Importancia del Cr(III) en Toxicidad Acuática

El cromo es un elemento ampliamente utilizado en la industria (Stoecker, 2004), y al que se le ha prestado especial atención para establecer la toxicidad relativa en organismos acuáticos en ambas formas redox trivalente y hexavalente, es decir, en los estados de oxidación predominantes en aguas superficiales. La mayor parte de la literatura publicada (Pawlisz *et al.*, 1997; Stoecker, 2004; Munn *et al.*, 2005; Shanker *et al.*, 2005) concluye que el cromo hexavalente es más tóxico y tiene mayor biodisponibilidad que el cromo trivalente, si bien estudios recientes no se ajustan a esta conclusión (Thompson *et al.*, 2002; Kaszycki *et al.*, 2004; Ksheminska *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005).

En recientes estudios de toxicidad sobre algas, realizados por Vignati *et al.* (2008), se puso de manifiesto que el Cr(III) llegó a disminuir entre un 60-90% los estándares medios de prueba en exposiciones de 72 horas de duración, mientras que estos mismos ensayos se mantuvieron aproximadamente al 20% para el Cr(VI).

Datos adicionales, similares a éste, han justificado la necesidad de verificar experimentalmente la exposición de las concentraciones de los distintos grupos de contaminantes acuáticos durante las pruebas de toxicidad y, en el caso de sustancias poco solubles, las recomendaciones específicas han sido propuestas por organismos internacionales competentes (OECD, 2000; ISO, 2006). Sin embargo, con excepción

del óxido de dicromo, las sales inorgánicas de Cr(III), utilizadas en las pruebas de toxicidad son bastante solubles y por lo tanto no han sido recogidas en estas normas.

El problema con las sales inorgánicas de Cr(III) es que se someten a hidrólisis y forman hidróxidos de cromo en rango de pH circumneutral (Sass y Rai, 1987; Rai *et al.*, 1989), que incluye valores de pH estándar para medios de cultivo de algas. La formación de hidróxidos puede reducir la solubilidad del Cr(III) por debajo de 5 mg/L (Sass y Rai, 1987; Rai *et al.*, 1989), concentración mucho menor que los valores de NOEC y concentración eficaz media documentada en las diversas revisiones existentes en la literatura (Pawlisz, 1997; INERIS, 2005; Munn *et al.*, 2005). Este límite de solubilidad es también inferior a los criterios de concentración máxima (CMC) y continua (CCC), que han sido establecidas por la USEPA (2006) en 574 y 74 mg/L, respectivamente, pero muy cercana a la concentración prevista sin efecto (PNEC), establecida en 4,7 mg/L en el informe de evaluación de la Unión Europea sobre los compuestos de cromo (Munn *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta todas las consideraciones, es particularmente digno de mención que los primeros estudios sobre algas (Den Dooren de Jong, 1965; Meisch y Schmitt-Beckmann, 1979; Turbak *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1988; IUCLID, 1999) fueron los utilizados para obtener las pautas europeas y canadienses para Cr(III) (Pawlisz *et al.*, 1997; INERIS, 2005; Munn *et al.*, 2005). En ellos, no se controlaba la permanencia del cromo en el medio, e incluso hoy en día existen muchos trabajos que no lo controlan, o sólo lo hacen al inicio de los ensayos. Pero el hecho es que dichas concentraciones, según lo comentado anteriormente y atendiendo a las conclusiones de Vignati *et al.* (2008), se pueden modificar significativamente durante el tiempo de exposición, por lo que hace posible que la toxicidad del Cr(III) sobre algas de agua dulce esté subestimado.

En un posterior estudio realizado por Vignati *et al.* (2010), sobre las algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Chlorella kessleri*, concluyeron que el Cr(III) resultaba más tóxico que el Cr(VI), sin que estos hallazgos inesperados pudieran atribuirse, al menos totalmente, a la disminución temporal de las concentraciones de Cr(III) en el medio. Un dato a tener en cuenta era que ensayos complementarios, practicados por un laboratorio independiente sobre *Chlorella kessleri*, demostraron que estas algas se habían vuelto excesivamente sensibles a

Cr(III) debido a las condiciones de cultivo, algo que ya había sido descrito por Janssen y Heijerick (2003).

El cromo (VI) es altamente tóxico, ya que atraviesa fácilmente las membranas celulares, pero sus efectos se deben a la formación de moléculas activas durante su reducción intracelular a Cr(III) y/o las interacciones posteriores entre el Cr(III) intracelular y el ADN (Standeven y Wetterhahn, 1991; Ortega *et al.*, 2005). Warren *et al.* (1981) estudiaron el efecto mutagénico del Cr(III) sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* concluyendo que dicho efecto puede ser considerable. La capacidad del Cr(III) para inducir mutaciones ha sido confirmada *in vitro* y en trabajadores profesionalmente expuestos a Cr(III) (Medeiros *et al.*, 2003).

Otro aspecto que merece consideración es la presencia de EDTA en los medios estándar de cultivo de algas, del que se conoce como reduce notablemente el grado de bioacumulación de Cr(III) en algas (Meisch y Schmitt-Beckmann, 1979). La toxicidad del Cr(II) sobre *P. subcapitata* incubado en medio ISO es mayor que cuando se cultiva en medio AAM/AAP (Greene *et al.*, 1988; Turbak *et al.*, 1986), que contiene más EDTA. Por tanto, en éste último es más fácil que se produzcan complejos, y por tanto la toxicidad del Cr(III) se reduzca. Otras diferencias entre medios de cultivo, como por ejemplo la concentración de carbonatos o la forma de nitrógeno añadido al medio, pueden provocar también diferencias en la respuesta tóxica (Janssen y Heijerick, 2003).

También parece tener mayor influencia en Cr(III) que en Cr(VI) aspectos incluidos en los protocolos, como por ejemplo el uso de microplacas en vez de matraces Erlenmeyer, duración del ensayo, agitación, etc. Vignati *et al.* (2008) confirmaron que, para las soluciones de sales de Cr(III), una mayor disminución temporal de las concentraciones de Cr se producía en microplacas, y cuando las soluciones se prepararon en matraces con medio AAP.

Otros informes acerca de la mayor toxicidad y biodisponibilidad del Cr(III) comparado con el Cr(VI) para algas y levaduras están presentes también en la literatura reciente. Una inspección detallada de estos resultados revela que se utilizaron medios de cultivo con pH relativamente bajo (pH = 6,8) y sin EDTA (Pereira *et al.*, 2005.), o enriquecidos con extractos orgánicos (Kaszycki *et al.*, 2004; Ksheminska *et al.*, 2005), es decir, condiciones que aumentan la biodisponibilidad del Cr(III) y la creación de un

"ligando medioambiental adecuado" para la toxicidad del Cr(III). Thompson *et al.* (2002) señalan grandes variaciones, del orden de 2-3 unidades, en el pH de sus soluciones para los ensayos con Cr(III), pero no con Cr(VI). Estas fluctuaciones en el pH claramente fueron responsables de la mayor toxicidad de Cr(III), en comparación con el Cr(VI). Minouflet (2008) indica un mayor consumo de Cr(III) en ríos contaminados que de Cr(VI) por algas. Dazy *et al.* (2008) informan de efectos similares relativos a la actividad enzimática del musgo *Fontinalis antipyretica*.

En contraposición, otros estudios confirman que el Cr(VI) es más tóxico que el Cr(III) para el jacinto de agua (Paiva *et al.*, 2009) y varias plantas terrestres (Han *et al.*, 2004; Vernay *et al.*, 2008; López-Luna *et al.*, 2009). Sin negar el rigor científico de estos estudios, se debe señalar que utilizan Cr₂O₃ insoluble para probar la toxicidad del Cr(III) (Paiva *et al.*, 2009), o exponen las plantas a través de suelos contaminados siguiendo los procedimientos aceptados, pero sin examinar el comportamiento del Cr en detalle (Han *et al.*, 2004; Vernay *et al.*, 2008; López-Luna *et al.*, 2009). Estas consideraciones ponen de manifiesto que las condiciones de ensayo (y el seguimiento de los mismos cuando sea necesario) son críticas para el resultado final de cualquier estudio comparativo sobre la toxicidad del Cr(III) vs Cr(VI).

Todas estas consideraciones ponen igualmente de relieve que los protocolos para el manejo de sustancias poco solubles (por ejemplo, OCDE, 2000) deben ser utilizados para estudiar la toxicidad de Cr(III) en algas para evitar la subestimación de la toxicidad del Cr(III). Por otra parte, se debe establecer un protocolo de seguimiento de las concentraciones de Cr(III) durante todo el desarrollo de los ensayos, ya que diversos estudios sugieren una rápida absorción de Cr(III) por parte de las algas (Brady *et al.*, 1994). La admisión de todos estos conceptos podría ayudar a comprender la compleja interacción química del cromo y la respuesta de los organismos en la valoración de la toxicidad del Cr(III) en los ensayos laboratoriales con algas.

A nivel de determinar el riesgo del Cr(III) en ensayos de campo, la disminución de sus concentraciones en aguas naturales hacen que este sea considerado como bajo, y por tanto representaría un menor riesgo que el presentado por Cr(VI). Sin embargo, los valores de toxicidad de Cr(III) para *P. subcapitata* y *C. kesslerii* han sido descritos como dentro del rango de la concentración de cromo en aguas contaminadas por determinados efluentes (Walsh y O'Halloran, 1996; Pereira de Abreu, 2006; Dominik

et al., 2007), e incluso con valores inferiores a los establecidos por la EPA, es decir por debajo de los niveles de protección basado en los ensayos con *P. subcapitata*.

Por otro lado, la PNEC para Cr(III) establecida por la Unión Europea en su informe de evaluación de riesgos sobre los compuestos de cromo (Munn *et al.*, 2005) es de 4,7 mg/L, alrededor de 4 veces inferior al valor de concentración efectiva media (17,4±4,8 mg/L) estimada para *P. subcapitata*. Si tenemos en cuenta que al valor de PNEC se le aplicó un factor de corrección de 10, estaríamos en torno a 47 mg/L. Ello lleva a la conclusión de que, sobre la base de estos resultados, investigaciones adicionales sobre la toxicidad del Cr(III) son necesarias para evaluar su riesgo en ambientes acuáticos.

Una última advertencia en el desarrollo de ensayos de campo se referiría a la aparición de Cr(III) por reducción bacteriana a partir de Cr(VI). Bencheikh-Latmani *et al.* (2007) demostró como esta circunstancia aparecía en el medio por la presencia de ligandos complejantes adecuados, reduciendo el nivel tóxico sobre la cepa MR-4 de *Shewanella* sp. En todo caso, estos resultados confirman que el Cr(III), es intrínsecamente muy tóxico, pero este grado puede ser más o menos perjudicial en función de las condiciones reales de campo. Por todo ello, parece claro que las sales inorgánicas de Cr(III) no son representativas del Cr(III) que se forma en el medio, y ni tan siquiera de las distintas compuestos a base de Cr(III) que están presentes en los efluentes (Walsh y O'Halloran, 1996; Pereira de Abreu, 2006). Y, sin embargo, el concepto clásico de ecotoxicología se basa en los ensayos de toxicidad sobre estos inorgánicos, por lo que la evaluación del riesgo toxicológico derivado del Cr(III) debería ser revisado de cara a una mejor gestión y protección ambiental.

1.3. Detoxicación de Metales Pesados en Algas Verdes

Durante el proceso evolutivo, los organismos acuáticos y terrestres han desarrollado diversas estrategias para mantener una relación equilibrada con iones de metales pesados presentes y disponibles en el medio circundante. Las células se enfrentan a dos tareas, la primera es seleccionar aquellos metales pesados esenciales para el

crecimiento y excluir a aquellos que no lo son, y el segundo mantener los iones esenciales en óptimas concentraciones intracelulares (Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Las plantas terrestres, plantas acuáticas y las algas han atraído una atención considerable a la capacidad de eliminar metales pesados. Gran parte del conocimiento aplicado a las algas está basado en observaciones sobre plantas superiores. Sin embargo, algunas investigaciones han aportado descubrimientos relacionados con las microalgas, por ejemplo, la evidencia de la importancia ecológica de algas obtenida mediante mecanismos de quelación en entornos reales (Ahner *et al.*, 1995).

Las microalgas, al igual que otros organismos eucariotas fotosintéticos y algunos hongos, han desarrollado la producción de péptidos capaces de inmovilizar los metales pesados. Estas moléculas, como complejos organometálicos, son particionadas en el interior de las vacuolas para facilitar el control adecuado de la concentración citoplasmática de los iones de metales pesados, y por tanto prevenir o neutralizar sus posibles efectos tóxicos (Cobbett y Goldsbrough, 2002). En contraste a este mecanismo utilizado por los eucariotas, las células procariotas utilizan un flujo de salida de ATP contra estos metales pesados, o un cambio enzimático de especiación para lograr la desintoxicación (Nies, 1999).

Estos péptidos se pueden agrupar en dos categorías:

1. Polipéptidos de cadena corta sintetizados enzimáticamente, y llamados Fitoquelatinas (metalotioneínas de clase III), que se encuentran en plantas superiores, algas y ciertos hongos.
2. Proteínas genéticamente codificadas, tales como metalotioneínas de clase II identificadas en cianobacterias, algas y plantas superiores; y metalotioneínas de clase I encontradas en la mayoría de los vertebrados pero no en algas (Robinson, 1989b; Rauser, 1990; Steffens, 1990; Thiele, 1992; Gaur y Rai, 2001).

Los polipéptidos de cadena corta, cuando se descubrieron por primera vez, recibieron el nombre de Fitoquelatinas (PCs), ya que fueron aisladas de una planta superior (Fito) y tenían la capacidad de unirse a iones de cadmio (Grill *et al.*, 1985; Steffens, 1990). Más tarde, cuando las metalotioneínas de clase II resultaron ser relevantes en las respuestas de las plantas al estrés por metales pesados, se propuso cambiar el nombre de Fitoquelatinas a las metalotioneínas de clase III (Rauser, 1990).

1.3.1. Características generales de las Metalotioneinas III (MtIII)

1.3.1.1. Estructura general de las MtIII

La estructura general se ha determinado que es una $(\gamma EC)_n$ -Gly donde la longitud de la cadena "n" fluctúa entre 2 y 11 unidades (Rauser, 1990; Steffens, 1990; Cobbett y Goldsbrough, 2002). El peso molecular varía desde 2000 hasta 10000 DA (Steffens, 1990; Gaur y Rai, 2001). Es importante señalar que los residuos de ácido glutámico no están vinculados con cisteína por medio de un grupo α -carboxilo, como en la transcripción de aminoácidos, sino con un grupo de γ -carboxilo. Además de una serie de variantes estructurales, por ejemplo, $(\gamma CE)_n$ -Bala, $(\gamma CE)_n$ -Ser y $(\gamma CE)_n$ -Glu, se han identificado en otras especies vegetales (Gaur y Rai, 2001; Cobbett y Goldsbrough, 2002).

La estructura principal del complejo MtIII con iones de metales pesados ha sido difícil de obtener debido a fallos en la cristalización. Aproximaciones llevan a proponer una coordinación $Cd(S)_4$, donde los tiolatos cisteína resultan ser los ligandos principales (Rauser, 1990; Strasdeit *et al.*, 1991).

El vínculo gamma entre Glu y Cys, el cual no puede ser realizado por los ribosomas, conduce a la búsqueda de un camino, mediado enzimáticamente, para la producción de MtIII. Grill *et al.* (1989) demostraron que las MtIII son sintetizadas por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS), que es una γ -glutamilcisteína dipeptidil transpeptidasa (Vatamaniuk *et al.*, 2004). Ésta cataliza la transpeptidación de la fracción γ -Glu-Cys del glutatión (γECG) sobre una segunda molécula γECG , para formar $MtIII_2$, o en una molécula de MtIII para producir un oligómero n+1. La enzima fue descrita como un tetrámero con un peso molecular de 95.000, y con una K_m para glutatión de 6,7 mM (Steffens, 1990; Cobbett y Goldsbrough, 2002). El mecanismo general involucrado es:



1.3.1.2. Identificación Génica de la Fitoquelatina Sintasa

Tres grupos de investigación han aislado simultáneamente los genes que codifican la actividad de la fitoquelatina sintasa (PCS) en *Schizosaccharomyces pombe* (Ha *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Vatamaniuk *et al.*, 1999) y *Triticum aestivum* (Clemens *et al.*, 1999). Los productos génicos esperados, estarán acordes al peso molecular de enzimas PCS, caracterizado previamente. La PCS se vio que era una enzima constitutiva, sin aparente actividad reguladora de los genes.

Otro trabajo indica que el genoma de *A. thaliana* posee una PCS adicional a *AtPCS1*, denominada como *AtPCS2*, y cuando esta nueva enzima fue clonada y expresada, mostró actividad catalítica, siendo su mRNA detectado en la planta (Cazale y Clemens, 2001). Por otra parte, las mutaciones descritas anteriormente, que carecen de *AtPCS1*, resultaron sensibles a Cd^{2+} (Howden *et al.*, 1995b), por lo que la presencia de una segunda transcripción, que no puede sustituir a *AtPCS1*, es ciertamente intrigante. Cazale y Clemens (2001) han propuesto que diferentes compartimentaciones de esta enzima se producen cuando se traducen dos *AtPCS*.

1.3.1.3. Biosíntesis y Regulación de las MtIII

Se ha demostrado que la síntesis de MtIII podría potenciarse con sales de diversos metales, siendo el Cd^{2+} el activador más potente, seguido generalmente por Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y otros metales pesados. Algunos metaloides, como As y Se, también aumentan la producción de MtIII, pero con menor actividad que los metales pesados (Grill *et al.*, 1987). Los tratamientos con calor, radiación fría, luz ultravioleta (UV), hormonas, anoxia o estrés oxidativo no inducen la síntesis de MtIII (Steffens, 1990).

Se ha demostrado que la actividad PCS *in vitro* tiende a mantener iones de metales pesados en el medio cuando ésta se retira, asimismo la adición *in vivo* de una amplia variedad de iones de metales pesados activa la síntesis de MtIII, lo que conduce a la propuesta de que PCS fuese una enzima activada por metales pesados (Loeffler *et al.*, 1989).

Sin embargo, Vatamaniuk *et al.* (2000) pusieron a prueba la afinidad de los PCS de *A. thaliana* (AtPCS) frente a diferentes sustratos tales como el glutatión, y glutationes con el grupo S bloqueado químicamente. Las constantes de afinidad obtenidas indican que las glutatión S, bloqueadas con grupos orgánicos, son un ligando mejor para PCS, y curiosamente el mejor ligando era un glutatión S-bloqueado con Cd^{2+} . Además, se encontró que en ausencia de iones de metales pesados, PCS podría inducir la formación de S-metil-MtIII a partir de S-PCS metil-glutatión lo que indica que es una enzima que no necesariamente depende de la activación de metales pesados, aunque la activación por metales pesados sigue siendo muy importante, alrededor del 50%.

Los estudios sobre la regulación MtIII han puesto en evidencia que las enzimas implicadas en la síntesis de glutatión- γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS) y glutatión sintetasa (GS), cuando se producen en exceso o mutado en *Brassica* spp., produce un fenotipo tolerante o sensible a los metales pesados en el medio (Zhu *et al.*, 1999a, b). Cuando las plantas de *A. thaliana* están genéticamente modificadas con sentido o antisentido γ ECS, éstas producen altos o bajos niveles de glutatión, respectivamente. Así, las plantas bajas en glutatión son sensibles a Cd^{2+} (Xiang *et al.*, 2001). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que el glutatión es el péptido principal implicado en la unión con metales pesados (Howe y Merchant, 1992; Vatamaniuk *et al.*, 2000) y el sustrato para la síntesis de MtIII (Grill *et al.*, 1989; Howden *et al.*, 1995a).

1.3.1.4. Iones Sulfuro y Función en MtIII

La cisteína es parte del núcleo quelante de la MtIII, activador de PCS (Horno *et al.*, 2002), por lo que su síntesis también parece importante para la producción de MtIII y, quizás, el factor limitante para la construcción de nuevos fenotipos adecuados para fitorremediación. Domínguez-Solís *et al.* (2001) expresaron la *O*-acetilserina(tiol)liasa en *A. thaliana*. Esta enzima es responsable de la síntesis final de la cisteína. Ellos encontraron que la planta puede crecer en concentraciones muy altas de Cd^{2+} acumulaban más metal en las hojas.

Los Iones sulfuro (S^{2-}) también están presentes en los complejos de metal-MtIII (Steffens, 1990). Estos iones mejoran la estabilidad de los compuestos metal-MtIII (Kneer y Zenk, 1997), y en consecuencia, la detoxicación también es mejorada (Dameron *et al.*, 1989). La inclusión de iones sulfuro en MtIII es la base de la división de los complejos MtIII en dos categorías: formas de bajo peso molecular (LMW), en los que el metal se une a los grupos tiol, y formas de alto peso molecular (HMW), en las que los iones sulfuro inorgánicos (S^{2-}) se han incorporado a estos complejos para formar partículas de tamaño nanométrico (Kneer y Zenk, 1997; Scarano y Morelli, 2003). La formación de partículas parece ser un proceso matricial por biomineralización, en el que la unión del metal a péptidos γ -glutamil proporciona la matriz necesaria (Scarano y Morelli, 2003).

El origen de estos iones inorgánicos de azufre todavía no está claro. Los resultados obtenidos en un mutante de *S. pombe* sensible a Cd^{2+} , sugieren que una proteína sulfuro oxidorreductasa se encargaría de mantener un adecuado equilibrio del sulfuro producido durante un estrés por metales pesados (Vande y Ow, 1999).

1.3.1.5. Secuestro y compartimentación vacuolar

El complejo metal-MtIII termina acumulado la vacuola celular. Esto ya fue observado hace más de 15 años en la microalga *Dunaliella bioculata* (Heuillet *et al.*, 1986), pero sólo se ha caracterizado en detalle en la levadura *S. pombe* (Ortiz *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que el gen *hmt1* complementa a un mutante *S. pombe* deficiente en la producción de complejos metálicos de alto peso molecular-MtIII, y que su producto (proteína HMT1) es un transportador vacuolar capaz de interiorizar complejos de bajo peso molecular-MtIII (LMW) en las vacuolas de estas levaduras (Ortiz *et al.*, 1992).

En avena (*Avena sativa*) se ha demostrado la existencia de un transportador, dependiente de ATP, del complejo de bajo peso molecular Cd-MtIII (Salt y Rauser, 1995), lo que indica que la internalización mediada por ATP de los complejos MtIII es un mecanismo de desintoxicación común. De todo ello, se puede proponer un mecanismo de acción como el presentado en la Figura 1.3.1.5-1.

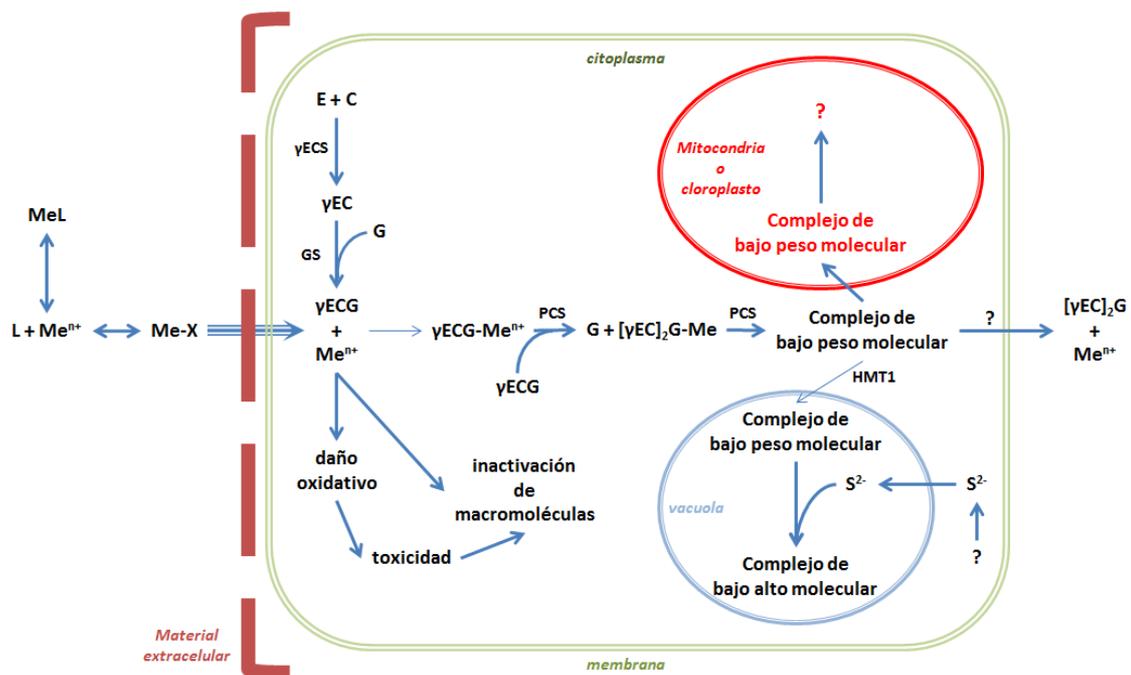


Figura 1.3.1.5-1. Esquema del mecanismo de detoxificación de metales pesados mediado por las metalotioneínas de clase III e microalgas. (MeL): complejo metálico en solución; (Me^{n+}): ión metal pesado libre; (X): ligando extracelular biótico; (E): ácido glutámico; (C): cisteína; (G): glicina; (γEC): γ -glutamilcisteína; (γECG): glutatión; ($[\gamma\text{EC}]_2\text{G}$): metalotioneína $n=2$; (γECS): γ -glutamilcisteína sintetasa; (GS): glutatión sintetasa; (PCS): fitoquelatina sintetasa; (HMT1): transportador vacuolar.

1.4. Metalotioneínas tipo (MtIII) en Algas

1.4.1. Síntesis

Stokes *et al.* (1977) descubrió por primera vez la síntesis del complejo MtIII en la microalga *Scenedesmus acutiformis*. Este hecho fue confirmado posteriormente en otras 11 algas pertenecientes a seis géneros diferentes, demostrando que el complejo MtIII n=2 era el predominante en todos los péptidos sintetizados por estas algas (Gekeler *et al.*, 1988). Posteriormente, Gaur y Rai (2001) hicieron un listado de las diez divisiones y 24 géneros de algas en las que aparece la presencia de MtIII.

La biosíntesis de MtIII puede estar inducida por diversos metales pesados, como el Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} o Au^{2+} , tanto *in vivo* como *in vitro* (Robinson, 1989a). Pawlik-Skowronska *et al.* (2004) encontraron una acumulación de MtIII en *Stichococcus bacillaris* expuesto a As^{3+} .

Concentraciones de Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ y Hg^{2+} pueden aparecer en aguas naturales no contaminadas, y sin embargo en ellas también se produce la inducción a la síntesis de MtIII en algunos organismos, como en *Thalassiosira weissflogii* (Ahner y Morel, 1995). Knauer *et al.* (1998) encontraron el mismo patrón en el microalga de agua dulce *Scenedesmus subspicatus*.

1.4.2. Función Fisiológica e Importancia Ecológica

Algunas de las especies y ecotipos de algas pueden vivir en presencia de concentraciones de metales tóxicos que son letales para otras especies o poblaciones. La MtIII claramente puede tener un papel importante en la desintoxicación de metales. Howe y Merchant (1992) detectaron el secuestro de aproximadamente el 70% de Cd^{2+} citosólico por MtIII en *Chlamydomonas reinhardtii*. Se ha encontrado que la síntesis de MtIII se relaciona con el grado de contaminación en el medio acuático. Ahner *et al.* (1994) detectaron un gradiente de producción de MtIII en el fitoplancton en una bahía que recibía fuertes descargas de metales pesados de origen antropogénico, con mayor

producción MtIII en zonas cercanas a la costa, donde era probable que contuviera mayor concentración metales.

Toricelli *et al.* (2004), trabajando con dos cepas de *Scenedesmus acutus* (una de tipo salvaje y otra tolerante a Cr^{6+}) observaron que la concentración constitutiva de cisteína fue mayor en la cepa tolerante. Cuando las células fueron expuestas a Cd^{2+} , la cepa tolerante mostraba mayores niveles de glutatión reducido y MtIII en comparación con la cepa salvaje.

Tsuji *et al.* (2002) sugirieron que las MtIII en algas podrían desempeñar un papel no sólo en la desintoxicación de metales pesados, sino también en la reducción del estrés oxidativo. Por ejemplo, Morelli y Scarano (2004), trabajando con *Phaeodactylum tricorutum* y Cu^{2+} encontraron algunas MtIII sin acoplamiento a metales presentes en los extractos celulares. A partir de esto, plantearon la hipótesis de que podrían representar una forma oxidada de MtIII recogida por especies reactivas de oxígeno. Por lo demás, las MtIII pueden desempeñar un papel importante en la homeostasis de iones metálicos esenciales y el metabolismo de azufre en microalgas, así como en plantas superiores (Robinson, 1989b; Rauser, 1990; Cobbett y Goldsbrough, 2002).

1.4.3. Iones Sulfuro

El papel de los iones sulfuro en los cultivos de algas ha sido menos investigado que en cultivos de levaduras, pero la evidencia experimental de un mal funcionamiento en algas marinas (*Skeletonema costatum* y *Tetraselmis suecica*) en el metabolismo de sulfuro a concentraciones tóxicas de metales ha sido observado. Estos metales se almacenan en las algas como complejos metálicos quelados, lo más probable como MtIII, y también como sales insolubles en el citoplasma (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999). Procesos similares se han observado en mutantes de levadura, que carecen de un control del sulfuro intracelular adecuado, cuando son expuestas a concentraciones tóxicas de cadmio (Vande y Ow, 2001).

Toricelli *et al.* (2004), trabajando con dos cepas de *S. acutus* con tolerancia diferente a Cd^{2+} encontraron que, en respuesta a diferentes concentraciones de metales, las dos cepas producían mayores cantidades de Cys y γ ECG, en comparación con las algas no

expuestas. Scarano y Morelli (2003) indican que algas de la especie *P. tricornutum* expuestas a Cd^{2+} forman complejos Cd-MtIII donde los iones de sulfuro (S^{2-}) pueden ser incorporados para estabilizar las MtIII recubiertos de nanocristales de CdS. Domínguez *et al.* (2003), trabajando con *C. reinhardtii*, pusieron en evidencia que la presencia de Cd^{2+} en el medio de cultivo aumenta la tasa de absorción de sulfato y los componentes del complejo cisteína sintasa en el interior de la célula, tales como la actividad serina acetiltransferasa, o la *O*-acetil-L-serina(tiol)liasa.

1.4.4. Secuestro Vacuolar

La inclusión de los complejos metal-MtIII en las vacuolas ha generado la hipótesis bioquímica que intenta explicar la tolerancia y bioacumulación de iones metálicos en organismos fotosintéticos y hongos.

Aunque el transporte de estos complejos unidos a MtIII sólo ha sido bien caracterizado en levaduras, en las algas hay varios análisis microscópicos y de rayos X que demuestran que este mecanismo de desintoxicación también está ocurriendo en ellas. En el alga verde *Dunaliella bioculata* se han detectado materiales electrodensos en el interior de las vacuolas, los cuales estaban constituidos por cadmio y azufre en una proporción entre 2 y 2.4, cuando estas algas se exponían a concentraciones de Cd^{2+} de 100 mg/L (Heuillet *et al.*, 1986). Células de *T. suecica* expuestas a Cd^{2+} mostraron la acumulación del metal en la pared celular y en organelas intracelulares, además de en vacuolas como precipitados de Cd^{2+} con calcio y azufre (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991).

En las diatomeas *S. costatum* fue detectada la acumulación vacuolar de Cd^{2+} y Cu^{2+} cuando se cultivaban en presencia de estos metales. Una vez más un elemento predominante en el contenido las inclusiones era el azufre en una proporción de azufre/metal de 1.5 (Nassiri *et al.*, 1997).

1.4.5. Secuestro en Cloroplastos y Mitocondrias

El organismo conocido como *Euglena gracilis*, protista fotosintético con alta tolerancia a Cd^{2+} , tiene una alta capacidad de acumulación de Cd^{2+} . Sin embargo, este organismo no posee un orgánulo reservorio especializado similar a la vacuola (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004). Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez (2005) trabajando con *E. gracilis*, observaron que más del 60% del Cd^{2+} acumulado se encontraba dentro de los cloroplastos. Este hecho se correlaciona con un aumento de 4.4 veces más compuestos tiol y sulfuro, comparado con un cloroplasto control. En esencia, un cloroplasto expuesto a Cd^{2+} poseía una cantidad significativamente mayor de MtIII, y los valores de glutatión y γCE representaron el 66% del contenido total de tioles orgánicos.

Avilés *et al.* (2003), trabajando con células heterotróficas de *E. gracilis* pretratadas con Hg^{2+} , pudieron ver que el 79% del total del metal acumulado se encontraba en mitocondrias. También encontraron un notable aumento en la concentración de Cys y de glutatión en las células tratadas con Cd^{2+} . La cantidad de MtIII en mitocondrias era alrededor del 17% de la MtIII total que se encontraba en las células tratadas.

Mendoza-Cózatl *et al.* (2004) concluyeron que la presencia de MtIII y Cd^{2+} en cloroplastos y mitocondrias de *Euglena gracilis* podría ser el resultado de cualquiera de los siguientes procesos:

1. Las MtIII se sintetizan en el citosol, donde secuestran Cd^{2+} , y los complejos Cd-MtIII posteriormente son transportados a los cloroplastos y mitocondrias.
2. Las MtIII se sintetizan en el interior de la organela donde se unen al Cd^{2+} , se transportan en forma de iones libres y forman complejos de alto peso molecular.
3. Ambos procesos coexisten, y las MtIII se sintetizan en los tres compartimentos celulares.

Curiosamente, cDNAs codificando fitoquelatinas, y glutatión sintetasa, se han localizado en mitocondrias de la parte radicular de *Brassica juncea* (Schäfer *et al.*, 1988). Similares resultados han sido observados en *C. reinhardtii*, donde el 60% de la acumulación de Cd^{2+} se localizó dentro de los cloroplastos, y los complejos MtIII aparecieron en esta organela (Nagel *et al.*, 1996). Soldo *et al.* (2005) observaron que

Oocystis nephrocytioides expuestos a altas concentraciones de Cu^{2+} , inducían a un alto grado de acumulación del metal en tilacoides y pirenoide, llegando a la conclusión de que esta localización de Cu^{2+} sugiere una interacción de éste con ligandos localizados en el cloroplasto. Por otra parte, el Cu^{2+} podría haber sido transportado desde el citosol hacia el cloroplasto como un complejo Cu^{2+} -ligando.

1.4.6. Tamaño de la cadena de las MtIII

Ha sido demostrado mediante ensayos *in vitro* que las MtIII de cadena larga pueden unirse a los metales pesados y formar un complejo estable (Mehra *et al.*, 1995).

En diatomeas *P. tricornutum* Cd^{2+} tolerantes ($\text{EC}_{50} = 22,3$ mg Cd/L), se encontró que el tamaño de la cadena de MtIII estaba entre $n = 5$ y 9 (Torres *et al.*, 1997). Complejos MtIII- Pb^{2+} en las mismas algas estaban inducidos igualmente por cadenas largas de MtIII. Sin embargo, los mismos estudios en Cd^{2+} (Morelli y Scarano, 2001) y en Cu^{2+} (Rijstenbil y Wijnholds, 1996) sólo presentaron tamaños de MtIII del orden de $n = 2$. En *Dunaliella tertiolecta*, un alga verde marina, un valor de $n = 5$ era el principal tipo de MtIII producido con exposiciones a Zn^{2+} (Hirata *et al.*, 2001).

Torres *et al.* (1997) sugieren que una alta tolerancia a los metales en *P. tricornutum* no sólo se debe a un aumento en la producción de MtIII, sino también a un aumento en la longitud de los péptidos tiol de las MtIII, en comparación con otras especies tales como *Chlorella fusca* y *Stichococcus bacillaris*. Pérez-Rama *et al.* (2001) llegaron a la conclusión de que *T. suecica* sería una de las microalgas más tolerantes a Cd^{2+} , ya que es capaz de sintetizar MtIII con cadenas más largas que otras especies.

1.4.7. MtIII y otros Mecanismos Relacionados con la Desintoxicación de Metales Pesados

Además de los mecanismos MtIII en el interior celular, se debe tener en cuenta que mecanismos de exclusión pueden ser también una alternativa que poseen algas con el fin de estar en equilibrio con los metales pesados en el medio. Por ejemplo, Pistocchi

et al. (2000) observaron en grupos de diatomeas y dinoflagelados que las algas más resistentes al estrés por metales pesados eran aquellas capaces de producir MtIII y polisacáridos exocelulares, macromoléculas que constituían una barrera eficaz contra la adsorción de metales pesados. Este mecanismo de exclusión es una característica general de las microalgas, no sólo al estrés por metales pesados, sino también para otras sustancias tóxicas como el diclorofenol (Marsalek y Rojícková, 1996).

Lee *et al.* (1996) describieron en la diatomea *Thalassiosira weissflogii* un sistema de exportación que implica a las MtIII. Otros autores han encontrado pruebas de la expulsión o degradación de complejos MtIII-metales en *P. tricorutum* (Morelli y Scarano, 2001).

Rijstenbil *et al.* (1994) observaron como el *Ditylum brightwellii* (marino) o la *Thalassiosira pseudonana* (continental) respondían al estrés por Cu^{2+} , Zn^{2+} o Cd^{2+} con un aumento de la actividad de especies oxígeno reactivas limpiadoras de moléculas SH. La *T. pseudonana*, una de las diatomeas más tolerantes, mantiene importantes niveles de actividad antioxidante, además de la producción de MtIII y de agentes quelantes exocelulares, pero no lo hace así, por ejemplo, el *Ditylum brightwellii*.

La reproducción sexual es promovida bajo el estrés por Cu^{2+} , y puede servir como otro mecanismo de protección (Rijstenbil y Gerringa, 2002). La reproducción sexual, como una respuesta a estrés por metales pesados también se ha observado en *Scenedesmus* spp. (Abd-el-Monem *et al.*, 1998). En el caso de Cd^{2+} y Cu^{2+} , se ha observado que el *Scenedesmus incrassatulus* puede responder al estrés de metales mediante una expresión de la plasticidad fenotípica que permite que estas células sobrevivan en un entorno hostil (Peña-Castro *et al.*, 2004).

En el alga verde *C. reinhardtii* se encontró que el Hg^{2+} no era quelado por MtIII pero sí por glutatión, proporcionando la evidencia de que el glutatión puede actuar no sólo como donante de $\gamma\text{Glu-Cys}$ para MtIII, sino también como una molécula de desintoxicación por sí misma, mediante un fenómeno de quelación directa (Howe y Merchant, 1992).

Es conocido como las especies del género *Tetraselmis* son productoras de MtIII (Ahner *et al.*, 1995; Perrein-Ettajani *et al.*, 1999), pero la especie *Tetraselmis tetrathele* mostró un comportamiento interesante en proceso de estrés por Hg^{2+} , ya que no

produce MtIII a pesar de vaciar los niveles de glutatión, sino que utiliza un tripéptido, Arg-Arg-Glu, lo que abre una posible nueva en la desintoxicación de este metal (Satoh *et al.*, 1999).

Pawlik-Skowronska (2003) trabajando con *Stigeoclonium tenue*, encontró que sólo el ecotipo Zn-adaptado, expuesto a altas concentraciones de Zn y Pb, fue capaz de producir grandes cantidades de péptidos relacionados con MtIII, que contenían un adicional grupo-SH más que las MtIII.

Otro mecanismo por el que muchas plantas y algas responden a los metales pesados es la producción de prolina (Pro) (el-Enany e Issa, 2001; Backor *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2006). Siripornadulsil *et al.* (2002), trabajando con *C. reinhardtii*, observaron que prolina libre actuaba como antioxidante en células estresadas con cadmio.

1.4.8. Genómica funcional del estrés por metales pesados en algas

Hoy en día sólo se poseen conocimientos básicos acerca de la genética y bioquímica involucrada en este proceso. Por ejemplo, la acumulación de prolina en respuesta a un estrés por Cu^{2+} , observado en *Chlorella* (Wu *et al.*, 1998) es una característica muy interesante que no se ha estudiado a este nivel. Otros ejemplos son la alta y baja afinidad de transportadores-metales pesados que se han caracterizado en algas verdes (Knauer *et al.*, 1997; Sunda y Huntsman, 1998). Sin embargo, en levaduras ya se han descrito a nivel molecular. Además, hay otros mecanismos que se han descrito en otros organismos eucariotas, pero siguen siendo desconocidos en las algas. Un ejemplo es la actividad de proteínas chaperonas (ayudan al plegamiento de otras proteínas recién formadas), descrito en células animales estresadas por metales pesados.

Con el avance de los proyectos de genómica en microalgas, una forma de reunir información biológica básica de obtener respuestas al estrés con metales pesados en microalgas, es el empleo de herramientas de genómica funcional de plantas, tales como la selección de alto rendimiento de la expresión génica diferencial. Existen varias metodologías disponibles para lograr este último, y han sido revisadas por diferentes autores (Holtorf *et al.*, 2002; Shrager *et al.*, 2003).

Rubinelli *et al.* (2002), mediante visualización de ARNm diferencial, fueron capaces de obtener 13 secuencias de cDNA expresado en *C. reinhardtii* bajo estrés con cadmio. Algunos de ellos se relacionan con el mantenimiento de los fotosistemas I y II, otros con la biosíntesis de cisteína o con la deficiencia de Fe. Y lo más importante, algunas secuencias no tenían similitud con cualquier otra incluida en las bases de datos.

1.4.8.1. Genes que Codifican Metalotioneínas en Algas

Los animales están provistos de péptidos genéticamente codificados, que se pueden unir metales pesados, y cuya producción está fuertemente regulada (Thiele, 1992). La identificación de las secuencias en plantas y hongos, en relación con las metalotioneínas de clase II (MtII) en los animales amplía el espectro de mecanismos disponibles para mantener equilibradas las concentraciones de iones metálicos en estos organismos (de Miranda *et al.*, 1990), pero las zonas de competencia de MtIII y MtII en las plantas todavía no están claras, y se han presentado pruebas en el sentido de que la preferencia para seleccionar uno de estos mecanismos se relaciona con la edad de la planta, la sensibilidad de las enzimas implicadas en la síntesis de glutatión a cierto tipo de metales pesados que impiden una adecuada respuesta MtIII, y el carácter esencial o no esencial de los metales pesados (Schäfer *et al.*, 1997).

Sólo una secuencia relacionada con MtII se ha identificado en el macroalga marina *Fucus vesiculosus*. Su transcripción regula el fenómeno de estrés por Cu^{2+} , pero aunque la proteína se una al cobre, también se ha visto que lo hace con iones cadmio (Morris *et al.*, 1999). Como en esta macroalga se ha descrito el mecanismo de respuesta de MtIII frente a Cd^{2+} , pero no frente a Cu^{2+} (Jervis *et al.*, 1997), se abre una interesante discusión sobre la competencia de los mecanismos de MtIII y MtII en un organismo capaz de responder con ambos metales.

1.5. Eliminación de Metales Pesados por Microalgas

La contaminación del medio acuático, por descarga de metales pesados en aguas residuales de origen antropogénico, ha sido motivo de preocupación en todo el mundo durante varias décadas (Nriagu y Pacyna, 1988) y ha dado lugar al establecimiento de una regulación más estricta del medio ambiente relativa a la liberación de estos contaminantes. Las normas han sido propuestas sobre la base de toxicidad humana, impacto ambiental, viabilidad técnica para la reducción de las concentraciones en los efluentes, y aplicación rentable de las tecnologías disponibles (Fan, 1996). La mayoría de las tecnologías utilizadas actualmente se basan en reacciones físico-químicas, principalmente precipitación y adsorción por resinas de intercambio iónico. Estos procesos se enfrentan a diversos problemas, como la falta de selectividad, la intolerancia a las especies orgánicas, la baja eficiencia en la eliminación de concentraciones trazas y la generación de grandes residuos secundarios, con los consiguientes altos costos puestos a disposición (Eccles, 1999).

1.5.1. Biotecnologías Basadas en Algas para la Remediación de Metales Pesados

El tratamiento biológico con microorganismos más estudiado se basa en la utilización bacterias sulfato reductoras (SRB), que eliminan metales pesados a través de la producción de precipitados sulfuro con el metal metal. Esta tecnología ha tenido un éxito relativo en aplicaciones a gran escala, pero los problemas principales son largos tiempos de residencia (semanas), la necesidad de suministro continuo de sustrato orgánico y grandes biorreactores de acero (White *et al.*, 1997).

Biotecnologías basadas en algas, para el control de contaminación acuática, se han utilizado para la extracción de nutrientes inorgánicos (Hoffmann, 1998). Los elementos más comunes son estanques con alta tasa de algas nocivas (HRAP) (Oswald, 1988) y el sistema patentado de algas “*Turf Scrubber*” (ATS) (Craggs *et al.*, 1996), que emplea la biomasa en suspensión de algas verdes comunes (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*), cianobacterias (*Spirulina*, *Oscillatoria*, *Anabaena*) o consorcios de ambos.

Los sistemas antes mencionados de algas han sido probados para la eliminación de metales pesados. Toumi *et al.* (2000) compararon las tasas de eliminación de metales pesados de las tradicionales lagunas de estabilización (WSP) y un HRAP donde ambos estaban recibiendo agua contaminada con concentraciones traza de origen urbano de Zn^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} . Sus resultados demostraron que HRAP tuvo una tasa de extracción superior por unidad de volumen y día, con valores de hasta 10 veces más eficiente en el caso de Cu^{2+} . Los valores obtenidos podrían ser consecuencia del pH alto logrado como resultado de la fotosíntesis de las algas, que aumentaba la precipitación de metales.

Rose *et al.* (1998) informaron de un proceso híbrido patentado, que combinaba las ventajas de HRAP y SRB. La precipitación de metales pesados se lograba mediante la entrada directa del drenaje ácido de una mina en un HRAP con valores de pH altos y biomasa viva con propiedades de adsorción. La biomasa de este HRAP se recupera para ser utilizado como fuente de carbono para SRB, y la remoción de sulfuro (a través de la oxidación con oxígeno fotosintéticamente producido) se realizaba en otro HRAP.

Sistemas de ATS con suspensiones de consorcios de algas verdes filamentosas y cianobacterias han sido probados para el tratamiento de las aguas subterráneas contaminadas (Adey *et al.*, 1996). Este estudio ha demostrado la utilidad de los sistemas ATS para la eliminación eficiente de metales pesados en niveles permitidos, así como la eliminación de cloro y compuestos orgánicos aromáticos. Los autores plantearon la hipótesis de que las bacterias podrían haber ayudado a la biodegradación de compuestos aromáticos. La degradación de estos productos químicos por las algas, por tanto, quedó demostrada, y supuso un creciente campo de investigación en microbiología ambiental (Semple *et al.*, 1999).

Tecnologías basadas en la construcción de humedales para la atenuación de residuos metálicos procedentes de minas pueden tener dificultades con la extracción de manganeso y la neutralización del pH ácido (Mitsch y Wise, 1998). En otro orden, Phillips *et al.* (1995) demostraron que los consorcios de algas y cianobacterias podrían reducir eficazmente las concentraciones de manganeso hasta niveles ecológicos y seguros, mediante biomasa de adsorción, precipitación e inmovilización.

1.5.2. Capacidad de Diferentes Especies de Microalgas para Eliminar Metales Pesados

Varias cepas de algas han demostrado propiedades adecuadas para la eliminación de metales pesados, pero la mayoría de los estudios se basan en el crecimiento de poblaciones de microalgas.

Matsunaga *et al.* (1999) diseñaron un protocolo donde fueron capaces de caracterizar una cepa *Chlorella* capaz de sostener un crecimiento poblacional en 11,24 mg Cd²⁺/L, con un 65% de remoción del metal cuando se exponían a 5,62 mg Cd²⁺/L. Travieso *et al.* (1999), trabajando con cepas de *Chlorella* y *Scenedesmus* en cultivos discontinuos de 20 mg Cr⁶⁺/L se encontraron porcentajes de remoción del 48% y 31%, respectivamente. Una cepa de *P. tricornutum* cadmio-tolerante (CE₅₀ = 22.3 mg/L), que fue caracterizada con respecto a patrones de producción MtIII (Torres *et al.*, 1997) también ha demostrado tener la capacidad de eliminación de este metal (Torres *et al.*, 1998).

Las microalgas del género *Scenedesmus* han sido comúnmente utilizadas en los experimentos de extracción de metales pesados. Han demostrado tener capacidad de eliminación para U⁶⁺ (Zhang *et al.*, 1997), Cu²⁺, Cd²⁺ (Terry y Stone, 2002) y Zn²⁺ (Aksu *et al.*, 1998; Travieso *et al.*, 1999; Cañizares-Villanueva *et al.*, 2001).

1.6. Proteómica

1.6.1. Secuenciación de novo de Péptidos y Proteínas por Espectrometría de Masas

La aparición de la secuenciación genómica a gran escala ha simplificado enormemente la tarea de determinar las estructuras primarias de péptidos y proteínas en muchos organismos, debido a elementos de lectura abierta en la secuencia de nucleótidos que pueden servir de modelo para la construcción de las proteínas correspondientes. Las

masas de los péptidos producidos por digestión proteolítica de una proteína desconocida se puede comparar con los previstos que surjan de cada proteína mediante el uso de base de datos, lo que el *mapeado por masas* es a menudo suficiente para identificar las proteínas cuya secuencia contienen (Mann, 2001; Aebersold and Mann, 2003).

Sin embargo, las secuencias del genoma de la mayoría de los organismos aún no se conocen. Incluso para aquellos que se sabe, las modificaciones post-traduccionales puede impedir la identificación de todas o parte de la secuencia proteica, o al menos la definición de las modificaciones. Por lo tanto, la caracterización completa de la estructura primaria de proteínas a menudo requiere la determinación de la secuencia proteica con una ayuda mínima de datos genómicos, con la secuenciación de proteínas *de novo*. En un principio, la secuenciación de proteínas *de novo* estuvo basado en el modelo de degradación de Edman (Simpson, 2003), pero la espectrometría de masas (MS) ha reducido la necesidad de esta técnica, ya que es más sensible y ofrece un mayor rendimiento de la muestra. También se puede lidiar mejor con mezclas proteicas y con modificaciones de la proteína N terminal.

La secuenciación de proteínas *de novo* por MS se remonta a más de 30 años (Biemann and Martin, 1987; Papayannopoulos, 1995; Biemann, 2002), al principio en combinación con la degradación de Edman y luego por sí misma. Las primeras mediciones se realizaron sobre todo en *sector MS* o triple cuadrupolo, y con ionización electrónica, lo que casi en su totalidad fragmentaba las proteínas casi en toda su totalidad (compuestos normalmente no volátiles e inestables), a menos que fueran modificadas químicamente (Roth *et al.*, 1998). Sin embargo, las determinaciones más recientes se han conseguido en gran medida por avances técnicos posteriores. En primer lugar, técnicas de ionización menos agresivas, como la ionización por electrospray (ESI), y láser asistido por matriz de desorción ionización (MALDI) ha sido desarrolladas, las cuales producen iones de péptidos y proteínas con una fragmentación mucho menor. En segundo lugar, ahora se dispone de otros tipos de espectrómetros de masas (atrapadores de masas, TOF, FTICR, etc.), que aportan ventajas en el estudio de secuenciación. En tercer lugar, derivaciones más eficientes han sido desarrolladas. Y finalmente el gran desarrollo del *software*, sobre todo en automatización, ha permitido descifrar más eficazmente los espectros de masas, reduciendo la demanda de interpretación manual de datos.

1.6.2. Secuenciación Peptídica

La medición directa del espectro de masas del grupo de péptidos resultantes de la digestión proteolítica enzimática de una proteína desconocida, es a menudo suficiente para la identificación proteica. Junto con una medición de masa proteica (MALDI) general, es un paso inicial habitual en la secuenciación *de novo* de la proteína, a través de las respectivas masas de los péptidos individuales.

El siguiente paso es determinar las secuencias peptídicas. La medición MS puede proporcionar información importante sobre la composición aminoacídica de péptidos, especialmente cuando se incluye mediciones precisas de iones de baja masa, como los iones imonio (Nielsen *et al.*, 2002; Schlosser y Lehmann, 2002). Sin embargo, mediante esta técnica no se puede determinar el orden de los residuos aminoacídicos. En consecuencia, la secuenciación *de novo* de péptidos requiere espectrometría de masas en tándem, por lo general MS/MS (Kinter y Sherman, 2000). Mediante esta técnica, a partir del precursor el ion es seleccionado a partir de las colisiones, y los valores del resultante aparecen en el segundo MS (Laskin y Futrell, 2003). En condiciones favorables, este procedimiento puede generar una serie de iones que contienen información suficiente para determinar la secuencia peptídica. Mayor información se puede obtener con determinados instrumentos, como las trampas de iones por ejemplo, mediante la ruptura de los iones obtenidos, para producir un espectro de otros grupos iónicos.

Para los péptidos derivados y sin etiqueta, mediciones secuenciación *de novo* ESI se han llevado a cabo tras disociación inducida por colisión (CID) en analizador de masas de triple cuadrupolo (Wilm *et al.* 1996; Shevchenko *et al.*, 2000; Shevchenko *et al.*, 2002), por cuadrupolo/TOF (QqTOF) (Morris *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1997; Van Der Wel, 2001), por resonancia de excitación en trampa de iones cuadrupolo (Vandenberghe *et al.*, 2001). La secuenciación *de novo* MALDI se ha llevado a cabo utilizando la descomposición CID metaestable en una sola (Schilling *et al.*, 1999) o en dos etapas (Medzihradzky *et al.*, 2000), utilizando TOF y CID en dispositivos QqTOF (Wattenberg *et al.* 2002; She *et al.*, 2001).

Los mecanismos de fragmentación CID han sido debatidos ampliamente (Wysocki *et al.*, 2000; Brechi *et al.*, 2003). La extracción de la secuencia peptídica de los espectros depende de la integridad de la serie observada, la exactitud con que las diferencias de masa entre los picos de iones relevantes y el grado en que el espectro de la fragmentación puede ser interpretado correctamente. Un péptido resultante de la digestión trípica normalmente tiene un residuo básico (arginina o lisina) en su extremo C terminal y se produce un pico prominente con doble carga de iones cuando es ionizado por ESI. Si este ion es elegido como el ion inicial para realizar una medición de MS/MS, la producción de una serie de iones procedentes de él (iones resultantes de la escisión en los enlaces amida y que contienen el término C) se ve favorecida y el espectro resultante es probable que sea más fiable (Gu *et al.*, 2000). Por esta razón, ESI ha sido una opción popular para la secuenciación de péptidos *de novo*.

Por otro lado, el CID de iones MALDI (en su mayoría con una sola carga) tiende a producir espectros de iones que incluyen iones *b* e *y*, este último correspondiente a la división en el enlace peptídico y que contiene el terminal N (Cramer y Corless, 2001; Zhang *et al.*, 2003). La sensibilidad y precisión del instrumento utilizado para el análisis másico son particularmente importantes.

El proceso de ionización MALDI tiene varias propiedades atractivas para el análisis de péptidos. En particular, tiene una tolerancia relativamente alta a impurezas y aditivos comunes, lo que reduce las exigencias en materia de depuración de la muestra en comparación con el ESI. Además, la muestra MALDI se puede utilizar hasta que se acaba, por lo que los datos se pueden obtener de muchas especies diferentes de iones producidos a partir de una mezcla de péptidos individuales, y con una calidad aceptable. Estas cualidades han estimulado últimamente el interés por la secuenciación MALDI, sobre todo después del pretratamiento de la muestra por derivación o marcaje isotópico.

1.6.3. Derivación y Etiquetado

Como se mencionó anteriormente, el uso de ionización electrónica requiere una modificación química (derivación) de los péptidos para producir un espectro de masa.

Aunque esto ya no es un requisito absoluto, el procedimiento aún puede producir mejoría de la calidad espectral de masas. Diferentes técnicas se han desarrollado recientemente para tal efecto (Shen *et al.*, 1999; Lindh *et al.*, 2000; Muenchbach *et al.*, 2000). Un ejemplo notable es la sulfonación del péptido N terminal, obtenido por Keough *et al.* (2003). Esta modificación suele conducir a la producción de una serie de iones C-terminales, por separado de los originarios y por lo tanto con gran ventaja en las transferencias de MALDI. Por otra parte, los reactivos necesarios se pueden obtener convenientemente como un kit disponible comercialmente. La principal desventaja del método es la reducción de la sensibilidad por un factor de aproximadamente 10.

Una técnica alternativa es la llamada *por etiquetado de isótopos* (Cagney y Emili, 2002; Gu *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003), la cual ayuda a distinguir los iones C-terminal del N-terminal, y también puede proporcionar información sobre su cuantificación. Una gran ventaja de esta técnica es que el protocolo de digestión normal se realiza sin perder la sensibilidad. Además de las posibles ambigüedades derivadas de la incorporación de uno o dos átomos [69], la principal desventaja es el alto costo del H₂^{18o} necesario para ello.

1.6.4. Precisión de Masa

La precisión con la que se determinan los valores m/z tiene un efecto pronunciado sobre la fiabilidad de las asignaciones de secuencia (Clauser *et al.*, 1999). Los veinte residuos aminoácidos comunes tienen composiciones elementales específicas, y por lo tanto tienen masas específicas, a excepción del par L/I. Sin embargo, una medición de baja precisión puede ser incapaz de discriminar entre D y N, o entre E y Q/K (1 casos en los que $\Delta m \sim 1$ Da), por lo que una precisión mucho mayor es necesaria para distinguir Q de K, donde $\Delta m = 36$ mDa. Además, hay combinaciones de residuos de aminoácidos que producen el mismo número de masa (Papayannopoulos, 1995) o incluso la misma composición elemental, por ejemplo $(G + G) = N = C_4H_6N_2O_2$; $(G + A) = Q = C_5H_8N_2O_2$, que pueden crear ambigüedades si los iones intermedios no se

ven. Cuando los péptidos modificados son considerados, hay muchas posibilidades adicionales de que lleguen a ser reconocidos.

Sin embargo, hay varios tipos de instrumentación que son lo suficientemente precisos como para resolver algunas de estas incertidumbres. Ejemplos recientes de éxito con QqTOF incluyen K frente a Q, y VV contra PT (ambos con $\Delta m = 36$ mDa) (Zhang *et al.*, 2003), así como de R-G en función de V ($\Delta m = 11,2$ mDa) (She *et al.*, 2001). La fosforilación de sulfatación también se ha puesto en evidencia ($\Delta m = 9,5$ mDa) por FTICR (Marshall *et al.*, 2002; Bossio and Marshall, 2002).

1.6.5. Diferenciación Proteica a partir de la Secuencia Peptídica

Las secuencias de péptidos proporcionan la materia prima para la determinación de la secuencia de la proteína total. El problema es entonces ordenar las secuencias de péptidos individuales. Un método puramente MS es la búsqueda de fragmentos proteolíticos que abarcan las iniciales. Éstas pueden surgir en la digestión inicial (generalmente por tripsina), debido a las divisiones perdidas, o pueden ser producidas por la digestión con otras proteasas.

La secuencia proteica completa sólo se puede obtener por este método si la cobertura del péptido también está completa. Esto es difícil de obtener en una sola digestión, pero la digestión de varias proteasas diferentes es probable que mejore la cobertura. Un eficaz control sobre la integridad de la cobertura será proporcionada por la medición de la masa MALDI de las proteínas en general.

Una combinación de técnicas puede proporcionar la secuencia de la proteína completa, incluso si sólo está disponible una información parcial de la secuencia del péptido, ya que una secuencia de péptidos sólo permite la construcción de un oligonucleótido corto de utilidad para el aislamiento del gen que codifica la proteína de interés. Sin embargo, este tipo de clonación es más eficaz si se lleva a cabo una secuencia larga del péptido, es decir, si contiene aminoácidos codificados por el triplete base de un solo (Met, Trp) o dos (Phe, Tyr, Gln, Glu, Asn, Asp, Cys). Estos requisitos no siempre son fáciles de cumplir.

1.6.6. Secuenciación “Top-Down”

El método desarrollado recientemente que evita algunas de las dificultades es el denominado como *Secuenciación “Top-Down”*, desarrollado por primera vez por McLafferty *et al.* (2001). La técnica ha sido más frecuentemente aplicada a la medición con espectrómetros de masas FTICR, ya que proporcionan una alta resolución y precisión de la masa. En este método, la proteína ionizada sí se introduce en la celda de ICR. Las mediciones m/z se llevaron a cabo en el mismo espectrómetro, tanto con la proteína intacta como en los productos de su disociación, evitando así la necesidad de unir los productos de la secuenciación de péptidos. Además, las mediciones FTICR son capaces de hacer uso de varios métodos para manipular los iones en la celda de ICR, incluyendo disociación multifotónica CID y IR. Lo más importante es que los iones se pueden dividir por la técnica ECD (captura de electrones por disociación) (Ge *et al.*, 2003). La ECD induce a divisiones de mejor que otros métodos, brindando una información más extensa de las secuencias proteicas de tamaño aproximado a 40 kDa.

Sin embargo, a pesar de la exactitud de masa fraccional aportada por FTICR, las mediciones se hacen en iones de gran tamaño, por lo que la masa de precisión absoluta, lo que determina la capacidad de distinguir entre las alternativas de secuencias diferentes, es algo limitada. Este es un argumento utilizado para el uso de una combinación de *Bottom-up* y *Top-down* como método de secuenciación habitual (VerBerkmoes *et al.*, 2002).

1.6.7. Análisis e Interpretación de los Datos

Varios algoritmos informáticos se han ideado para tratar de deducir la secuencia *de novo* a partir de los datos de MS/MS (Taylor y Johnson, 2001; Johnson y Taylor, 2002; Liska y Shevchenko, 2003) Resulta evidente que todas estas técnicas tienen un gran potencial para mejorar la secuenciación *de novo* de péptidos y proteínas por espectrometría de masas.

1.7. Estrés medioambiental y Proteómica

Miles de sustancias químicas artificiales son constantemente liberadas en el medio ambiente por la agricultura, el transporte, las industrias y otras actividades humanas (Depledge y Galloway, 2005). Ello provoca fenómenos de toxicidad aguda como primera oleada de escorrentía o de accidentes es un escenario de exposición. Sin embargo, los efectos causados por la exposición crónica a mezclas subletales de sustancias químicas de origen antropogénico y sus metabolitos, en combinación con temas globales como el aumento de las temperaturas y la radiación UV, son situaciones de estrés para los organismos acuáticos que son mucho más difíciles de evaluar (Eggen *et al*, 2004; Eggen y Suter, 2007). Además, las sustancias químicas antropogénicas pueden acumularse en suelo y organismos inferiores, y desembocar en una bioacumulación importante en los mayores predadores de la cadena alimentaria (Lalonde *et al*, 2001; Van Lipzig *et al*, 2005).

En general, para evaluar el estado químico de un ecosistema específico, es necesario realizar un análisis químico de muestras ambientales procedentes de diversos compartimentos, tales como suelo, agua, sedimentos y biota (Kolpin *et al*, 2002; Dowling y Sheehan, 2006). Sin embargo, una evaluación significativa de la calidad química de un ecosistema en particular, mediante un análisis químico, solo se ve obstaculizada por la complejidad de las mezclas químicas, y en algunos casos por los umbrales de toxicidad muy bajos de las sustancias químicas presentes (Dowling y Sheehan, 2006). Además, el análisis químico sólo puede proporcionar información sobre la amenaza que plantean los contaminantes ecotoxicológicos, si va acompañada de una acción biológica (Eggen y Segner, 2003).

En un enfoque complementario, el número y la normalidad fisiológica de cada especie se utilizan como indicadores de contaminación química crónica en los ecosistemas (Peakall, 1994; Chèvre *et al*, 2006), que conducen a la identificación de biomarcadores de toxicidad (Kolpin *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, hay una creciente conciencia en que la investigación de los efectos toxicológicos dentro de un ecosistema se define en gran medida en el hecho de si se beneficiarían de la utilización de múltiples biomarcadores (Depledge y Galloway, 2005). En ese sentido, un enfoque proteómico derivaría en su capacidad para detectar cambios sutiles en la expresión proteica y

aminoacídica a través de las modificaciones secuenciales, como respuesta a un ambiente alterado (Unwin *et al.*, 2006), y si tiene aplicaciones obvias en el campo de la ecotoxicología. Así, no solo permite la identificación de biomarcadores de proteínas nuevas de toxicidad sino, más importante aún, ayudaría a aclarar los mecanismos subyacentes de toxicidad.

El uso de la proteómica en toxicología ambiental ha sido promovida por una serie de grupos (Witzmann *et al.*, 1995; Shepard *et al.*, 2000; Vido *et al.*, 2001), y el número de publicaciones dedicadas al tema es cada vez mayor (Dowling y Sheehan, 2006). Aplicaciones de la proteómica aparecen en un rango que abarque desde microorganismos (bacterias, hongos) y plantas, hasta invertebrados (almejas, mejillones, gusanos, insectos) y vertebrados (peces de agua dulce y marinos) (Dowling y Sheehan, 2006; Zhao y Poh, 2008). Sin embargo, la mayoría de los informes en este campo siguen utilizando técnicas tradicionales (Santos *et al.*, 2004), dejando de lado los progresos de los últimos años a nivel proteómico, realizados con espectrometría de masas.

1.7.1. Observaciones Generales sobre Proteómica en Medio Ambiente

La investigación de los proteomas, que se definen como el conjunto total de proteínas expresadas por el genoma de una célula, tejido u organismo (Wilkins *et al.*, 1996; Wasinger *et al.*, 1995), permite asociar las proteínas individuales o grupos de proteínas con una enfermedad o exposición a tóxicos. Estas proteínas posteriormente pueden ser utilizadas como biomarcadores para enfermedades específicas, o frente a la exposición a compuestos tóxicos. La comparación de los patrones proteicos obtenidos bajo condiciones de estrés frente a los controles permite la detección de cambios específicos en la expresión de la proteína (Blackstock y Weir, 1999) y una comprensión de los modos de acción subyacentes. Este enfoque representa un cambio de paradigma en la biología molecular. En lugar de fijar una determinada familia de proteínas, trata de proporcionar puntos de vista cualitativos y cuantitativos sobre el proteoma completo, que es esencial para la vida y funcionalidad del organismo. Combinado con los datos de transcriptómica y metabolómica, la información global de proteínas proporciona un

enfoque verdaderamente integral para la comprensión del ciclo de vida de un organismo. Los análisis de proteómica convencionales por lo general se centran en proteínas con masa molecular >10 kDa. El análisis de péptidos y pequeñas proteínas con un peso molecular entre 0,5 y 15 kDa es objeto de una disciplina relacionada denominada peptidómica (Schulz-Knappe *et al.*, 2001).

En general, el enfoque de la proteómica ofrece varias ventajas prácticas, como mayor rapidez de detección de efectos tóxicos y la posibilidad de detectar los efectos tóxicos en dosis significativamente más bajas cuando se utilizan nuevas técnicas analíticas de alta sensibilidad (Domon y Aebersold 2006a), en comparación con los métodos establecidos, tales como la histología y la bioquímica clínica (Kennedy, 2002). Además, cuando se combina con los métodos convencionales de química clínica e histopatología, la proteómica permite obtener nuevos conocimientos sobre los mecanismos de toxicidad y ofrece distinguir entre los efectos específicos intraespecie, proporcionando así una evaluación más exacta del riesgo (Kennedy, 2002).

Las aplicaciones toxicológicas de la proteómica se pueden dividir en dos clases (Kennedy, 2002). En la primera clase aparecerían los estudios de investigación, que se utiliza para identificar nuevas dianas moleculares de las sustancias tóxicas, y para proporcionar información sobre sus mecanismos de acción.

La segunda clase, relativa a la toxicología predictiva o de detección, utiliza los cambios en los patrones de expresión de proteínas específicas para identificar los biomarcadores toxicológicos y los compuestos que son responsables de su aparición. También se puede utilizar para estudiar relaciones estructura-actividad (SAR) dentro de un grupo de compuestos químicos (Kennedy, 2002). El campo de la proteómica va dirigido al análisis global o dirigido de las proteínas. En el análisis global, los investigadores pretenden identificar un número máximo de proteínas, mientras que el modo dirigido ofrece la oportunidad de ver subproteomas, por ejemplo, las proteínas en organelas y núcleo, o de las proteínas que forman parte de las vías de señalización.

Uno de los atributos importantes y mensurables de una proteína es su cantidad dentro de un volumen limitado de células. La diferencia de concentración entre las proteínas de mayor a menor abundancia y, a menudo definido como el rango dinámico, puede llegar a 10 órdenes de magnitud (Lipton *et al.*, 2002). Así, el diseño y la ejecución de cualquier experimento proteómico debe tener en cuenta el rango dinámico necesario, y

ajustar el protocolo experimental en consecuencia, para lograr una separación óptima de las proteínas y por lo tanto aumentar las posibilidades de su identificación (Wu y Han, 2006). Además de la amplia gama dinámica, otros aspectos contribuyen a las dificultades en el análisis del proteoma. Por ejemplo, los aminoácidos, bloques de construcción de las proteínas, pueden ser sometidos a una serie de modificaciones post-traduccionales (PTM), tales como la fosforilación y la glicosilación, que afectan a la polaridad de la proteína, hidrofobicidad, pI, estructura tridimensional proteica, y su afinidad a los ligandos.

Por otra parte, las proteínas se sintetizan y degradan constantemente, añadiendo el tiempo como otra dimensión al problema de la comprensión de las vías de señalización en una célula u organismo. Los retos antes mencionados, encontrados al tratar de caracterizar mezclas de proteínas muy complejas, se encontraron con importantes mejoras en las técnicas de separación, la espectrometría de masas y la bioinformática.

1.7.2. Estrategias para la Identificación de Proteínas en el Medio Ambiente

El análisis de un proteoma implica el aislamiento y la separación de proteínas, adquisición de datos e identificación sobre bases de datos de secuencias disponibles. La información sobre las proteínas puede ser derivada de los análisis de la proteína intacta (*top-down*) o sus péptidos (*bottom-up*). Estos dos métodos son complementarios y no pueden proporcionar la información completa de una proteína de interés.

En la proteómica *bottom-up*, las proteínas de interés se digieren y los péptidos resultantes son analizados por espectrometría de masas (MS). Es especialmente adecuado para la identificación de proteínas, a pesar de que sólo en una fracción de los péptidos detectados se produce una fragmentación útil. Sin embargo, por lo general, la secuencia proteica sufre de una cobertura incompleta, y posiblemente se pierda información sobre PTMs o degradación, como resultado de la digestión proteolítica. Esto limita el potencial del enfoque *bottom-up* para el análisis de PTMs y específicamente los puntos de mutación de las proteínas individuales, cuestiones que son importantes para su función biológica. Con el análisis de *bottom-up*, la

espectrometría de masas proporciona información sobre el peso molecular (MW) de la proteína intacta y sus fragmentos. Este enfoque permite deducir la estructura primaria completa de la proteína y revela la mayoría de sus modificaciones, así como cualquier combinación de PTM que posiblemente exista en distintas partes de la secuencia de la proteína (Chait, 2006). Sin embargo, el éxito del enfoque bottom-up está limitado por el hecho de que la activación de colisión no es capaz de transferir la energía necesaria para producir la fragmentación, como proceso que involucre a proteínas de más de 50 kDa.

Las proteómicas top-down y bottom-up se basan en herramientas bioinformáticas para cotejar los datos producidos experimentalmente mediante espectrometría de masas, con las proteínas y todo el genoma recogido en las diferentes bases de datos de secuencias.

Un enfoque tradicional de bottom-up se inicia con la separación de mezclas complejas de proteínas mediante electroforesis en gel (Görg, 1993; Jungblut *et al.*, 1996), donde las proteínas solubles se separan en función de su carga neta (punto isoeléctrico) y peso molecular. Las proteínas se visualizan por una serie de procedimientos de tinción (Patton, 2002), escindiéndolas del gel y analizadas con MS. La identificación de proteínas se logra ya sea por los perfiles de los péptidos, por derivados de la digestión de las proteínas por proteasas específicas, o por las secuencias de los péptidos obtenidas por MS/MS y una búsqueda en base de datos posterior. Las metodologías de gel están bien establecidas, relativamente fáciles de implementar, y siguen siendo un incondicional para la investigación proteómica.

1.7.2.1. Bioinformática: Herramientas de Identificación de Proteínas

La proteómica, para ser una herramienta eficaz, tiene una fuerte dependencia de la ayuda y los avances en bioinformática, que a su vez impulsa un mayor desarrollo en la instrumentación de MS y los métodos experimentales. Las herramientas bioinformáticas son indispensables en el análisis y comparación de geles y de análisis LC-MS, identificación de proteínas, caracterización, cuantificación y validación. Por

ejemplo, el análisis cuantitativo y el análisis de proteómica comparativa por electroforesis en gel 2D se basa en la comparación de los patrones de gel.

La identificación por separación proteica, ya sea por geles o por cromatografía multidimensional, es una de las principales aplicaciones de la moderna bioinformática. La identificación de proteínas se basa en la comparación de MS experimental y/o MS/MS de datos con los espectros teóricos generados a partir de secuencias de proteínas almacenadas en bases de datos. La identificación de proteínas basadas en los espectros de masas en tándem compara los datos experimentales y teóricos de la secuencia peptídica (Mann y Wilms, 1994; Wilms *et al.*, 1996). Por ejemplo, para identificar el péptido más probable que se ajuste a los fragmentos de iones observados en un espectro de masas en tándem, los programas como SEQUEST y MASCOT hacen coincidir los datos experimentales con el de los patrones de fragmentación producidos y obtenidos a partir de las secuencias de proteínas disponibles en las bases de datos; aunque hoy en día la mayoría de la proteómica de datos se genera a través de análisis MS/MS basados en la identificación.

Sin embargo, en la mayoría de las técnicas disponibles no es posible su uso para identificar proteínas de genomas desconocidos. Además, los espectros de buena calidad quedan muy a menudo sin explicación después de buscar en las bases de datos, debido a modificaciones inesperadas de proteínas o errores de secuencia en la base de datos. En todos estos casos, la única opción viable es la de extraer la secuencia del péptido de los espectros de masas en tándem experimental por sí mismos, un enfoque conocido como secuenciación *de novo*, donde las masas de los fragmentos de péptidos experimentales se utilizan para descifrar las secuencias de péptidos sin hacer referencia a las bases de datos. A partir de los algoritmos de secuenciación *de novo* se buscan todas las combinaciones posibles de secuencias que podrían explicar los iones observados experimentalmente en un espectro. Hoy en día se utiliza principalmente como herramienta de validación independiente de los resultados obtenidos en las bases, para la eliminación de falsos positivos, y la identificación de homologías (Grossmann *et al.*, 2005).

1.7.3. Resultados obtenidos con la Proteómica a Nivel Medioambiental

El cambio de enfoque desde proteínas individuales a un análisis del proteoma tiene una serie de profundas implicaciones para el diseño experimental, procesamiento de datos, almacenamiento y recuperación, visualización y publicación de datos proteómicos (Kremer *et al.*, 2005; Lisacek *et al.*, 2006).

Se esperaba que la capacidad de la proteómica para estudiar un gran número de proteínas acelerara significativamente el descubrimiento de biomarcadores y, eventualmente, daría lugar a su uso rutinario en la investigación médica y en el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de los enormes logros realizados en el campo durante los últimos 6 años, una serie de factores hacen peligrar el seguir avanzando. Hasta ahora, sólo unas pocas técnicas de cuantificación puede ser consideradas afianzadas, a menudo con equipos y reactivos bastante caros. La aplicación de nuevas técnicas a menudo se mantiene confinada a los laboratorios de sus respectivos inventores y colaboradores cercanos. Además, los resultados obtenidos sólo pueden ser considerados como pruebas iniciales, lo que puede explicar una cierta reticencia a aplicarlas por no estar validadas para importantes proyectos académicos e industriales (Leitner y Lindner, 2006).

La complejidad y el amplio rango de concentraciones de los componentes de un proteoma dificultan los esfuerzos para identificar a un número aún modesto de marcadores de proteínas. Esto, naturalmente, lleva a la necesidad de una subdivisión de la muestra y su fraccionamiento (Anderson, 2005). Informes sobre los análisis proteómicos de decenas (Pieper *et al.*, 2003), cientos e incluso miles de fracciones de plasma ya se han publicado (Rose *et al.*, 2004). Sin embargo, el costo de la mano de obra y la intensidad de tales métodos de fraccionamiento limita su aplicación a la investigación orientada a los laboratorios (Anderson, 2005). Además, es poco probable que las técnicas antes mencionadas pueden caracterizar todas las isoformas posibles de la proteína, una tarea que requiere estrategias dirigidas al respecto (Anderson, 2005).

A pesar de los recientes avances en instrumentación, las actuales técnicas basadas en MS no pueden cubrir por completo el proteoma de una célula o un organismo con más de 1.000 proteínas (de Godoy *et al.*, 2006). Un examen en profundidad de los datos

experimentales mostraron que el rango dinámico efectivo de aproximadamente 1.000, y el tiempo de ciclo del espectrómetro de masas, establece el límite de sensibilidad de la espectrometría de masas para proteómica a aproximadamente 500 femtomoles de muestra proteica (de Godoy *et al.* 2006). Este límite de detección es varios órdenes de magnitud mayor que la sensibilidad subfemtómole alcanzables con las proteínas individuales en los espectrómetros de masas actuales.

Un aumento de la cobertura proteómica parece ser factible, aumentando el tiempo de ciclo y el rango dinámico efectivo de los espectrómetros de masas (de Godoy *et al.*, 2006). El número limitado de péptidos detectado por un espectrómetro de masas de ionización y posterior *electrospray* sigue siendo uno de los principales desafíos y podría ser otro factor que impida una mayor cobertura proteómica. Se ha demostrado que la respuesta del MS a un péptido determinado, en una mezcla de péptidos complejos, rara vez se correlaciona con la química de las soluciones (Chakraborty *et al.*, 2007).

Además de la identificación de proteínas incompletas, la falta de reproductibilidad es un problema grave. Un análisis de los resultados obtenidos mediante proteómica sobre diferentes plataformas (Anderson *et al.*, 2004; Omenn, 2004) reveló una superposición limitada entre los conjuntos de proteínas. Cada plataforma presentaba un conjunto diferente de proteínas y biomarcadores candidatos, lo que llevó a la conclusión de que la plataforma definitiva para la identificación de proteínas todavía no se ha desarrollado. Además, el análisis, incluso repetido, utilizando la misma plataforma para la identificación de proteínas, no garantiza una buena superposición (Durr *et al.*, 2004). Las dificultades para comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios y en diferentes plataformas se deben principalmente a la falta de estándares para los formatos de datos, procesamiento de parámetros y evaluación de la calidad (Domon y Aebersold, 2006b).

La disparidad en los formatos de almacenamiento de datos fue reconocida por la Organización del Proteoma Humano (HUPO), lo que llevó oficialmente al lanzamiento de la Iniciativa de Estándares de Proteómica 2002, que tiene como objetivo “*definir los estándares de la comunidad para la representación de datos en proteómica, para facilitar la comparación de datos, el intercambio y la verificación*” (Hermjakob *et al.*, 2004). La necesidad de directrices (Bradshaw *et al.*, 2006) también fue impulsado por

la falta de validación y verificación de los resultados obtenidos a través de los espectros experimentales de masas en tándem de un péptido en una base de datos, que casi siempre es efectivo, pero no necesariamente correcto. Una búsqueda exitosa en la base de datos puede llevar a sobrestimar el número de informes de identificación proteica, debido a que un número significativo de estas identificaciones es probable que sean falsos positivos (Carr *et al.*, 2004).

La identificación de las proteínas presentes en una muestra es sólo el primer paso en el largo proceso de la comprensión de su función, ya que ahora es generalmente aceptado que la diversidad de los procesos biológicos se rige por interacciones moleculares en las células (Alberts, 1998). Por lo tanto, un modelo exitoso para la función proteica y la regulación requiere un amplio conocimiento y relación exhaustiva de la interacción molecular de una proteína con otras proteínas y ligandos. Las redes de interacciones moleculares se pueden utilizar para descubrir las posibles vías de señalización, los componentes individuales de los complejos interactivos, y revelar la función de proteínas previamente caracterizadas. También hay que tener en cuenta que todos los enfoques de la proteómica actuales proporcionan sólo una copia estática de un proteoma en un punto concreto temporal. La adición de una dimensión temporal traerá mejor comprensión de los procesos biológicos (Blagoev *et al.*, 2004), aunque a costa de tiempo, mano de obra y fondos.

La deficiencia de enfoques en proteómica general es especialmente aplicable a los análisis medioambientales. En particular, el estado de la técnica de alto rendimiento de métodos automatizados para la identificación de proteínas se ve obstaculizado por el limitado número de organismos totalmente cubiertos en las bases de datos de secuencias de proteínas y genes, un requisito previo para el análisis del proteoma con éxito. Además, la interpretación de los niveles de expresión proteica en estos organismos es un desafío debido a la alta variabilidad genética, la dependencia en el estado nutricional y reproductiva de los organismos, así como las variaciones climáticas y estacionales en el medio ambiente (Dowling y Sheehan, 2006) .

De particular preocupación es la tendencia existente de aplicación de geles en la proteómica medioambiental, ya que están basados en mediciones de EM con una precisión de masa relativamente baja (MALDI-TOF y las trampas de iones) para la identificación de proteínas (Zubarev y Mann, 2007). Por ejemplo, se pueden ver a

menudo búsquedas de bases de datos con rangos de 1-1-5 Da de masa, con tolerancias de 0.5-1 para iones fragmentados (Bhushan *et al*, 2007; Lantz *et al*, 2007; Torres *et al.*, 2007). Es obvio que la búsqueda en bases de datos con mayor tolerancia conduce inevitablemente a un mayor número de identificaciones, que no son necesariamente correctas. Esto requiere de rutinas de validación rigurosa que permitan determinar la tasa de identificaciones con falsos positivos. Sin embargo, incluso el uso de herramientas de validación correcta a veces no garantizan el tratamiento adecuado de los datos experimentales, como se muestra por Lantz *et al.* (2007), donde se limitan a eliminar falsas identificaciones positivas, en lugar de asignar tasas de falsos positivos para el conjunto de datos. También hay que mencionar que si bien la idea de replicar el análisis en gel está firmemente incrustada en la comunidad investigadora del medio ambiente, muy a menudo la identificación de proteínas se basa en una sola MS/MS de medición, lo que evidentemente deja de lado la naturaleza estocástica de los datos que dependen de las adquisiciones.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El OBJETIVO PRINCIPAL del presente trabajo es poner en evidencia las características, tanto toxicológicas como morfológicas y genéticas, de una cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* obtenida en el laboratorio a partir de la correspondiente cepa salvaje, que la hacen tolerante a una alta concentración de cromo trivalente, del orden de 30 mg/l, la cual resulta incompatible con la viabilidad de la cepa salvaje. La recopilación de estos datos permitirá una mejor evaluación del riesgo medioambiental derivado del vertido de este metal a los ecosistemas acuáticos, con la posible aparición de cepas resistentes, y su adaptación a ambientes extremos.

Para lograr este Objetivo Principal, una serie de Objetivos Secundarios han sido planteados:

1. Valorar el impacto que supone la presencia de cromo trivalente sobre el crecimiento de la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III), es decir, la viabilidad celular fruto de exposiciones a corto plazo con metal pesado, y compararlo con el correspondiente a la cepa salvaje.
2. Determinar el impacto sobre la capacidad fotosintética desarrollada por la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III), valorando el fotosistema II, mediante el análisis del rendimiento cuántico fotosintético, e igualmente compararlo con el correspondiente a la cepa salvaje.
3. Establecer igualmente el mismo tipo de impacto, pero con una valoración del balance de O₂, mediante el análisis de la capacidad de producción/consumo por parte de la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III), con su correspondiente comparación con la cepa salvaje.
4. Estudiar las posibles modificaciones morfológicas aparecidas en la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III), las cuales pudieran tener relación con la capacidad de tolerar esta alta concentración del metal.
5. Estudiar posibles diferencias de expresión génica entre la cepa salvaje y la tolerante a Cr(III), que pudieran aportar luz a la capacidad para tolerar estas concentraciones de cromo trivalente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Principio Químico

El cromo trivalente utilizado se obtuvo a partir de cloruro de cromo(III) hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), con una pureza de 96 %, de Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Para su estudio en los ensayos de toxicidad, el compuesto era disuelto en agua destilada y desionizada. A efectos prácticos, las diferentes diluciones se practicaban el mismo día de realización de las exposiciones celulares al compuesto, siendo desechado el material sobrante.

Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron obtenidos de Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

3.2. Material Biológico

Ambas cepas de *Dictyosphaerium chlorelloides*, tanto la salvaje como la tolerante a cromo trivalente, han sido obtenidas de la colección mantenida por el Grupo de Investigación ALBIOTOX de la Universidad Complutense de Madrid.

3.2.1. *Dictyosphaerium chlorelloides*

Los ensayos han sido practicados con *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman, citado por Komarek y Perman (1978).



Imperio: *Eukaryota*
Reino: *Plantae*
Subreino: *Viridaeplantae*
Phylum: *Chlorophyta*
Subphylum: *Tetraphytina*
Clase: *Trebouxiophyceae*
Orden: *Chlorellales*
Familia: *Chlorellaceae*
Género: *Dictyosphaerium*

Es una especie ampliamente distribuida en países de Europa como Gran Bretaña (John y Tsarenko 2002); Dinamarca, Islandia y en el Mar Negro ruso (Ettl y Gärtner 1995), y en España (Fanés-Treviño *et al.*, 2009). En Brasil también ha sido identificada (Menezes, 2010) (Figura 3.2.1-1).



Figura 3.2.1-1. Distribución de *Dictyosphaerium chlorelloides* en base a las identificaciones practicadas.

3.3. Medio de Cultivo de *Dictyosphaerium chlorelloides*

Para el cultivo en el laboratorio de fitoplancton de agua dulce se eligió medio de cultivo BG-11, el cual fue obtenido a partir del concentrado comercial *Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution* (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA), y cuya composición se incluye en la Tabla 3.3.1-1.

Este preparado está 50 veces concentrado, por lo que para preparar el medio de cultivo se añadieron 20 ml de concentrado y se completó hasta 1 litro con agua destilada y desionizada, de calidad Milli-Q (Millipore Co., MA, USA). Una vez obtenido el medio reconstituido, éste fue pasado por una unidad de filtrado al vacío Stericup-GP (Millipore) con membrana Millipore Express® Plus y diámetro de poro de 0.22 μm (Millipore Co., MA, USA).

COMPONENTE	mg/L
Ácido bórico	2.86
Cloruro cálcico dihidratado	36.00
Ácido cítrico	6.00
Nitrato de cobalto hexahidratado	0.0494
Sulfato cúprico pentahidratado	0.079
EDTA disodio magnesio	1.00
Citrato férrico amonio	6.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	75.00
Cloruro de magnesio tetrahidratado	1.81
Fosfato potásico dibásico	40.00
Carbonato sódico	20.00
Molibdato sódico dihidratado	0.39
Nitrato sódico	1500.00
Sulfato de zinc heptahidratado	0.222

Tabla 3.3.1-1. Composición del concentrado comercial *Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution* (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

3.4. Obtención y Mantenimiento de las Poblaciones

Todas las especies estudiadas fueron sometidas a un crecimiento axénico en frascos de cultivo (Grainer, Bio-One, Longwood, NJ, USA) con 20 ml de medio de cultivo BG-11. En todos los casos se mantuvieron a 21 °C bajo un ciclo de luz/oscuridad del 50 % y una intensidad de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un rango de banda entre 400 y 700 nm.

Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial semilogarítmico por medio de transferencias de inóculo unicelular a un medio fresco cada dos semanas. Antes de los experimentos, los cultivos fueron reclonados (mediante el aislamiento de una sola célula) para evitar la inclusión de los mutantes espontáneos anteriores acumulados en los cultivos.

3.5. Ensayos de Toxicidad del Cr(III)



El efecto tóxico del CrCl_3 fue estudiado en base a tres parámetros seleccionados: inhibición del crecimiento de poblaciones, inhibición del rendimiento cuántico fotosintético y valoración del balance de oxígeno en el medio. Para el desarrollo de los tres tipos de ensayos propuestos, células de cada una de los dos clones fueron expuestas a una concentración de 10^4 cel/ml y en un volumen final

de 10 ml fueron incluidas en tubos estériles de poliestireno con doble cierre (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) para su posterior exposición al contaminante. La exposición en estos tubos asegura que ni las células ni el compuesto químico quedan adheridos a las paredes de éstos (Costas *et al.*, 2001; García-Villada *et al.*, 2004).

Previamente a la realización definitiva de los ensayos, tests de toxicidad previos fueron desarrollados con el fin de definir el rango idóneo de concentraciones representativo entre el 0% y 100% del efecto buscado. En base a estos ensayos previos, los rangos de concentración de CrCl_3 aplicados a los estudios definitivos fueron de 10-17.5 ppm en ensayos de crecimiento celular, y 5-12.5 ppm para ensayos de actividad fotosintética en los estudios sobre la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*, y de 200-800 ppm para todos los estudios sobre la cepa tolerante DcCr(III)R30.

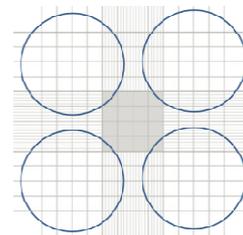
3.5.1. Inhibición del Crecimiento Poblacional

Los valores de disminución del crecimiento de ambas poblaciones celulares estudiadas se obtuvieron por contaje directo al microscopio óptico XSZ-107BN (Wincom Company Ltd., Hunan, China) con objetivo



x40, de los correspondientes alícuotas sobre una placa Neubauer.

Al ser un dato medio por observación directa, cada una de las muestras fueron observadas y las células contadas en las cuatro cuadrículas de que consta cada una de las dos partes de la cámara Neubauer. En total, son contadas las células que aparecen dentro de las 64 celdillas (16 por cuadrado). El conteo final admitido era la media aritmética de los cuatro conteos realizados.



Los resultados son presentados como porcentaje de inhibición del crecimiento poblacional, respecto a los valores control.

3.5.2. Determinación del Rendimiento Cuántico Fotosintético (Φ_{PSII})



Las variaciones en la actividad fotosintética se estimaron mediante la fluorescencia de la clorofila a para el fotosistema II (Φ_{PSII}) en cuatro medidas seriadas, con 30 segundos de intervalo de espera para cada una, mediante un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada, ToxiPAM 2000 (Walz, Effeltrich, Germany).

Inicialmente se procedía a obtener el modelo control de cada ensayo, exponiendo dos muestras del tubo control. De esta manera se obtenía el calibrado a cero. Posteriormente, las muestras procedentes de cada tubo, eran analizadas en una serie de concentración creciente, obteniendo los correspondientes porcentajes de inhibición de Φ_{PSII} , respecto al ensayo control.

3.5.3. Determinación del Balance de Oxígeno

Para la medición en las muestras, tanto de la producción (fase luminosa) como el consumo (fase oscura) de oxígeno, se ha utilizado un Sistema Chlorolab II (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Básicamente es un oxímetro basado en el electrodo de Clark situado dentro de una cámara oscura que puede ser iluminada en su interior.



La medición de oxígeno en fase líquida viene determinada por el hecho de que, cuando se aplica una diferencia de voltaje, el platino del que está hecho el cátodo del electrodo se polariza, incrementando el potencial eléctrico a 700 mV. El oxígeno entonces se reduce debido a la electronegatividad de la superficie del electrodo, de tal modo que se genera peróxido de oxígeno (H_2O_2) por lo que la polaridad tiende a disminuir debido a los electrones cedidos al oxígeno. Así, el circuito se cierra con el cloruro de potasio (KCl) aportado en la membrana del electrodo, y la plata del ánodo se oxida generando cloruro de plata. El oxígeno aportado por la muestra corresponde al consumido por la reducción ejercida por el cátodo, produciendo un ajuste estequiométrico en el electrodo (Figura 3.5.3-1.).

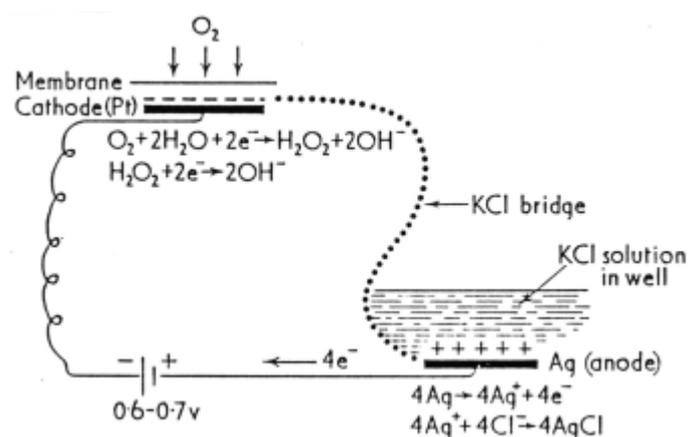


Figura 3.5.3-1. Esquema de las reacciones químicas llevadas a cabo en el electrodo de Clark.

Las mediciones de producción o consumo de oxígeno se practicaron introduciendo las muestras en la cámara oscura termostalizada a 21 °C, con agitación magnética a 75 rpm, y aplicando periodos de oscuridad para valorar el consumo, y periodos de luz para obtener los datos relativos a la producción de O_2 . Para esta segunda fase, el estímulo lumínico se practicó a través de una de las ventanas que la cámara oscura

tiene para tal efecto, mediante un grupo de diodos emisores de luz (LEDs) de color rojo con una intensidad de 650 nm, y un margen de error de ± 25 nm.

Los resultados son presentados como porcentaje de inhibición del balance producción/consumo de O₂ respecto a los valores control.

3.6. Obtención de Células de *D. chlorelloides* Tolerantes a Cr(III)

Para la obtención de una población estable de *D. chlorelloides* tolerante a cromo trivalente, se comenzó con cultivar en BG-11 inóculos de la cepa de colección en multiplacas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc GmbH & Co., Langensfeld, Germany), a partir de un cultivo que fue ajustado a una concentración celular de 10² cel/ml, e incluidas en cada pocillo en un volumen final de 200 μ l. Esta pequeña concentración celular permite suponer que ninguna célula mutante previa se encuentra presente.

Una vez alcanzado un conveniente número de células, en torno a 1.5x10⁵ cel/ml en cada pocillo, se añadía una solución de CrCl₃·6H₂O en medio de cultivo BG-11, de tal forma que en cada pocillo se estableciera una concentración final de 30 mg/l de Cr(III). Dicha concentración fue seleccionada después de haber practicado los ensayos de inhibición del crecimiento poblacional de *D. chlorelloides*, de los que se desprendía que provocaba el 100% de mortalidad en ensayos de 72 horas de duración.

Las multiplacas fueron cultivadas a 21 °C y con fotoperiodo de 12 h. durante un periodo de tiempo de 60 días, y llegado a ese punto, de todos aquellos pocillos en los que se observó crecimiento celular se procedió a un traspaso a frascos de cultivo Grainer (Grainer, Bio-One, Longwood, NJ, USA) con 20 ml de una solución en BG-11 de CrCl₃·6H₂O a 30 mg/l. De esta forma, se pudo mantener durante todo el periodo de estudio una población estable de *D. chlorelloides* tolerante a esta concentración de Cr(III), a partir de ahora DcCr(III)R30, para proceder a los ensayos de toxicidad propuestos y a su estudio morfológico mediante microscopía óptica.

3.7. Estudio Ultramicroscópico Celular

Para el análisis comparativo entre las características morfológicas que presentan las células de *D. chlorelloides* sensibles y tolerantes a Cr(III), se optó por la aplicación de las Técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Transmisión (TEM) y el análisis dispersivo de rayos X (SEM/EDX).

3.7.1. Preparación de las Muestras para Microscopía Electrónica

El procedimiento básico consiste en varias fases, en función del destino de la muestra (TEM o SEM), algunas de estas son comunes:

3.7.1.1. Fijación

Consiste en la preservación de las estructuras celulares de una forma rápida para mantener la morfología y la composición química similar al organismo vivo. Durante este proceso, y en función del elemento fijador, pueden surgir artefactos debido a los cambios de pH, temperatura, potencial osmótico o variaciones en la permeabilidad de las membranas.

El protocolo consiste en fijar las muestras en un buffer fosfato (PBS, Phosphate Buffer Solution 0.1 M, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) en el que se añade glutaraldehído (Glutaraldehído 25% en H₂O hasta conseguir que éste quede al 3%), y paraformaldehído al 0,5%. En esta solución se dejaron las células durante 4 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron en buffer PBS.

El PBS es uno de los buffers que más respetan la arquitectura celular, es relativamente poco tóxico y estabiliza el pH mejor que otros compuestos en un amplio rango de temperaturas; uno de los principales inconvenientes es la quelación de cationes que terminan precipitando. El glutaraldehído reacciona bien con los grupos α -amino de los

aminoácidos presentes en las proteínas de la muestra; con la excepción de algunos fosfolípidos que contienen aminos primarias, la mayoría de los lípidos no reaccionan bien con el glutaraldehído, lo que provoca que durante los procesos de deshidratación y fijación se extraigan de la muestra. La relación del glutaraldehído con los carbohidratos no está todavía establecida, pero se ha observado que del 40 al 65% del glucógeno es retenido en tejidos animales fijados con este compuesto (Hayat, 1981).

Deben tenerse en cuenta dos consideraciones a la hora de usar el glutaraldehído como elemento fijante. La primera consideración tiene relación con su poder de penetración en los tejidos puesto que este, por su gran tamaño molecular, no atraviesa las membranas celulares tan rápido como otros aldehídos de tamaño molecular más pequeño; es por ello por lo que se asocia su uso al del formaldehído. En la segunda consideración se tiene en cuenta que ningún aldehído ofrece opacidad electrónica a la muestra, ya que no hay átomos de metales pesados asociados a ellos; este problema puede solucionarse usando tetraóxido de osmio durante la post-fijación.

Después de la fijación química, el elemento fijante ha de ser eliminado mediante aclarado. Este procedimiento se realiza normalmente sustituyéndolo por soluciones tampón con el mismo pH y concentración al usado anteriormente. Con dos o tres lavados con el buffer suele ser suficiente, aunque también es útil añadir al aclarado agua destilada, para eliminar sales residuales que puedan afectar a la polimerización.

3.7.1.2. Deshidratación

Este proceso implica el desplazamiento del agua intracelular por un solvente orgánico. Aunque este paso produce alteraciones en los tejidos, es una parte muy importante en el procesamiento de la muestra. Tras este paso, es necesario incluir la muestra en un soporte sólido; en el caso de microscopía electrónica de barrido (SEM), se utiliza una matriz porosa de policarbonato para la extracción de la muestra (sistema Millipore®); mientras que para microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizan polímeros de resinas durante la inclusión que son incompatibles con el agua, por lo que este procedimiento es esencial.

En este trabajo se utilizaron diluciones de acetona (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) concentración-crecientes: al 30%, 50% y 70% durante media hora en cada una, ya que la acetona produce menos retracción celular que otros desecantes como el alcohol; además no provoca reacciones indeseables con el tetraóxido de osmio ni con las resinas poliméricas de la inclusión.

3.7.1.3. Post-fijación

Tras una deshidratación previa se realiza la post-fijación con la intención de mantener lo más intacta posible la estructura celular, ya que debido al proceso de deshidratación progresiva que se está llevando a cabo pueden producirse alteraciones estructurales importantes o artefactos.

Para realizar la post-fijación de las muestras se utilizó tetraóxido de osmio. El tetraóxido de osmio es un elemento fijante muy reactivo que puede disolverse tanto en solventes polares como apolares. Tiene un tiempo de penetración muy largo y produce retracción de la muestra, por eso se usa como fijante secundario tras la fijación primaria. Además de actuar como un excelente fijador de electrones gracias a los átomos de osmio también aumenta el contraste de la muestra.

El tetraóxido de osmio no reacciona bien con proteínas ni carbohidratos (situación que se aprovecha para neutralizar los residuos), es más útil para fijar lípidos, especialmente ácidos grasos insaturados; también puede reaccionar con las nucleoproteínas asociadas al ADN para mantener la estructura nuclear.

Posteriormente a la deshidratación con acetona al 70% se retiró el sobrenadante y se resuspendió la muestra en tetraóxido de osmio (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) al 1% durante una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y bajo una campana de extracción de gases. Después, se retiró el osmio y se lavó con agua destilada tres veces, para eliminar los residuos resultantes de la post-fijación.

Tras neutralizar el tetraóxido de osmio y los residuos resultantes del lavado de las muestras con leche en polvo, se continuó con la deshidratación de la muestra en acetona, esta vez en volúmenes de 80%, 90%, 95% y finalmente acetona pura.

Durante la preparación de muestras para SEM, este proceso se realizó mediante el filtrado de la muestra por un sistema Millipore[®], de 3µm de diámetro de poro (Millipore Ibérica, España), con la intención de usarlo como soporte para su posterior procesamiento. En este caso se emplearon 10-15 minutos por cada una de las concentraciones de acetona para terminar con la deshidratación y retener la muestra en el soporte poroso, acoplando el sistema Millipore[®] a una jeringa de 5 ml.

En caso de preparar muestras para TEM, la deshidratación post-fijación se realizará simultáneamente a la inclusión con resinas poliméricas.

3.7.1.4. Punto crítico y recubrimiento metálico

Las muestras que quieran ser investigadas mediante SEM deben ser secadas por completo antes de ser introducidas en el microscopio, para evitar que el vapor de agua y otros elementos volátiles alteren la estructura de la muestra; las muestras biológicas con un alto contenido en agua se deformarán si se dejan secar al aire ya que las fuerzas de tensión superficial asociadas a la salida del agua causarán daños estructurales. Para evitar estos efectos, durante el proceso de secado debe pasarse el límite entre la fase “líquido-gas”. Entre los métodos que existen para conseguirlo se encuentra el método del punto crítico en el cual el líquido pasa directamente a la fase gas. De este modo las fuerzas de deformación se evitan debido a que el proceso de secado tiene lugar por encima del punto crítico del líquido, donde el límite entre la fase líquida y la fase gas no existe.

El punto crítico es un estado particular de un gas que todavía puede licuarse. Este estado viene determinado por alteraciones de presión y temperatura, llamadas “presión crítica” y “temperatura crítica”. Ocurre que en el punto crítico el estado líquido y el estado gas son igualmente densos, por lo que el líquido pasa a la fase gas sin pasar por el límite de fases “líquido-gas”, y la muestra se seca sin los efectos dañinos del secado en aire.

Según los valores de presión y temperatura crítica del agua, 228.5 bar y 374 °C, si un espécimen contiene agua no puede ser secado mediante el método del punto crítico ya que los valores tan altos de presión y temperatura podrían destruirlo. Es por ello que se

usa otra sustancia como el dióxido de carbono, cuyos valores de punto crítico son considerablemente más ventajosos, 73.8 bar y 31 °C. En este caso el dióxido de carbono actúa como “fluido transicional”.

Tras realizar el punto crítico, se recubre la muestra con partículas metálicas para que ésta sea conductora ya que, de no ser así, aparecen distorsiones en la imagen por una acumulación de carga durante la irradiación.

La técnica empleada para mejorar la conductividad de las muestras se conoce como el recubrimiento por *sputtering*, depositando partículas metálicas en una capa de espesor comprendido entre 10 y 25 nm.

La elección del material con el que se va a recubrir la muestra depende fundamentalmente del estudio que se va a realizar. Así, para la observación de imágenes de electrones secundarios el oro y el oro-paladio son los materiales que conducen a los mejores resultados; al ser elementos pesados, producen mayor emisión. Cuando lo que se pretende es realizar un estudio microanalítico es recomendable emplear carbono. El bajo número atómico de este elemento lo hace prácticamente transparente a los rayos X emitidos por la muestra. También se emplean, a veces, aluminio, cromo, etc.

Para el tratamiento de las muestras del presente estudio se realizó el *sputtering* con oro coloidal (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

3.7.1.5. *Inclusión*

Este paso es exclusivo en la preparación de muestras para TEM, previo al corte con el ultramicrotomo en secciones lo suficientemente finas como para poder ser estudiadas. En principio se usan medios sólidos introducidos en un molde en forma líquida a modo de soporte de la resina de inclusión.

Las resinas que se utilizan en este proceso son compuestos poliméricos inmiscibles con el agua, por ello se usan medios de transición como la acetona o el etanol, los cuales se van mezclando en proporciones decrecientes hasta realizar la inclusión al 100% con la resina de la muestra a analizar. Normalmente se usan resinas epoxi, ya que cumplen

muchas de las características del medio de inclusión perfecto, esto es, fácilmente adquirible, soluble en agentes deshidratantes, baja viscosidad como monómero en su penetración, polimerización uniforme, volumen constante durante la polimerización, alta preservación de la ultraestructura de la muestra, homogeneidad a la sección, resistencia al calor generado durante el corte, estabilidad a la irradiación durante la observación de la muestra, y facilidad al paso de los electrones.

Una de las desventajas de las resinas epoxi es su toxicidad dérmica, por lo que todo el procedimiento ha de realizarse bajo campana de gases y guantes, ya que todavía hay residuos del tetraóxido de osmio.

En la preparación de las muestras de este estudio, se usó una resina SPURR concentrada al 25%, 50% y 75% en acetona pura. La muestra se encuentra en un tubo Eppendorf de 1 ml en acetona pura en el momento de la inclusión; inicialmente se elimina el sobrenadante y se añade al pellet diferentes disoluciones de resina cada quince minutos evitando resuspender la muestra, finalmente se desplaza la acetona residual de la muestra mediante una inmersión del pellet en resina pura por quince minutos más. Por último, se elimina el sobrenadante y se deposita el pellet con una espátula en el fondo de un molde con forma de pirámide truncada. Se completa el volumen con resina, para acelerar el proceso de polimerización se introdujeron las muestras en una estufa a temperatura constante de 50°C durante 48 horas, así como los residuos resultantes para facilitar su eliminación.

3.7.2. Microscopios Electrónicos Utilizados para el Análisis



Para la observación de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM) se usó un JEOL 6400 JSM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), con un voltaje de aceleración de 80 kV, microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de la muestra. Con este mismo microscopio se practicó el análisis elemental cualitativo de cromo, con una resolución de 133 eV.



Para la observación de las muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se usaron un JEOL 1010 JEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), con un voltaje de aceleración de 100 kV, microscopio electrónico que permite el estudio de la ultraestructura celular en secciones ultrafinas (50-70 nm), obtenidas con ultramicrotomo.



Adicionalmente, se usó un JEOL JEM 2100 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), con un voltaje de aceleración de 200 kV, microscopio electrónico de transmisión que ofrece una combinación perfecta de características que le convierten en fundamental para el estudio de casi cualquier tipo de material: (i) alto giro para el estudio detallado de la red recíproca, (ii) alta resolución en modo imagen, (iii) análisis de composición por XEDS (X-ray Energy Dispersive Spectroscopy), y (iv) mapeado químico en el modo STEM (Scanning-Transmission Electrón Microscopy). Se utilizó para el análisis XEDS de cromo en las organelas celulares.

3.8. Análisis Proteómico

3.8.1. Preparación de las Muestras para el Análisis de Proteínas

Las células de *D. chlorelloides* sensibles y tolerantes a Cr(III) fueron cultivadas en frascos de cultivo Grainer de 200 ml, con el fin de obtener amplias poblaciones de cada uno de los grupos, dada la alta densidad celular que fue necesaria obtener. Bajo estas condiciones, fue posible obtener densidades de población del orden de 75×10^6 cel/ml en ambos grupos. A partir de estos cultivos, se practicó una concentración hasta llegar a 600×10^6 cel/ml, aplicando a sucesivos alícuotas un proceso de centrifugación a 7 g durante 6 minutos. Las células de cada grupo, obtenidas de cada uno de los alícuotas, se fueron incluyendo en una solución PBS, y posteriormente se ajustaba hasta la concentración celular reseñada anteriormente. Todo el proceso se repitió un

total de ocho veces (n=8), cada una de ellas a partir de cultivos independientes de cada una de las cepas estudiadas. Todas las muestras obtenidas fueron congeladas a -40 °C, para su posterior utilización.



Para conseguir la ruptura de las paredes celulares de las microalgas, todas las muestras fueron sometidas a un triple proceso de rápida congelación-descongelación, antes de proceder a la ruptura mediante prensa *French Press* Thermo Spectronic French Pressure FA-078 Cell (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), sometiendo a cada una de ellas cuatro ciclos con un incremento paulatino de presión, que al final de cada ciclo llegaba hasta 20000 PSI. Con la elección de esta metodología de ruptura quedaba asegurado un proceso de ruptura de las paredes prácticamente total en toda la muestra, hecho que en ensayos previos con otras metodologías convencionales quedaba mermado.

Las muestras obtenidas mediante presión eran sonicadas y posteriormente centrifugadas a 100 g durante 30 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendían en PBS con SDS, se concentraban con acetona fría, y quedaban listas para su posterior utilización en electroforesis.

3.8.2. Electroforesis SDS-PAGE

Las electroforesis se realizaron en geles de 7x10 cm con espesores de 0.75 mm. El gel separador se preparó a una proporción de acrilamida del 7.5%, y el gel concentrador del 4%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente, dejando reposar los geles al menos 8 horas antes de su utilización.

En el proceso de preparación, los cristales usados para el empaquetamiento de los geles eran lavados con jabón, repetidamente aclarados con agua destilada, y posteriormente limpiados con metanol con objeto de deslipidizarlos. Seguidamente se colocaban los respectivos separadores, según el grosor indicado, entre ambos cristales

y éstos se fijaban procurando que quedaran a la misma altura para que el gel no se saliera, aprovechando el propio soporte de placas donde se polimeriza el gel. El gel se añadió entre las placas hasta una altura de 1 cm del final del cristal pequeño, y seguidamente se añadió agua destilada sobre la superficie. Para controlar el tiempo de polimerización, aproximadamente 20 minutos, se mantuvo externa una pipeta Pasteur llena del gel como indicador, y una vez polimerizado, se retiraba el agua y se añadía el gel concentrador hasta llenar completamente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluyó el peine, teniendo cuidado de no formar burbujas, produciéndose la polimerización en un tiempo aproximado de 10 minutos. Ya polimerizado, se retiraba el peine y se añadía el tampón de electroforesis en las calles del gel concentrador.

Las muestras fueron desnaturalizadas diluyéndolas 1:1 (v:v) con *buffer sample reductor* compuesto de Tris 120 mM pH 6.3, SDS al 6%, β -mercaptoetanol puro y bromofenol (marcador del frente de migración) al 0.05%. El *buffer sample no reductor* estaba constituido por Tris 120 mM pH 6.3, glicerol al 20%, SDS al 4% y azul de bromofenol al 0.1 %. Las muestras así preparadas se mantenían a temperatura de 95 °C durante 10 minutos, y a continuación se aplicaron alícuotas en cada pocillo del gel. En cada gel se incluyeron patrones proteicos de 14-200 KDa.

Para el montaje del gel en la cámara de electroforesis, se acoplaba el electrodo y se cargaban los patrones y muestras, con ayuda de un jeringa Hamilton, a razón de 10 μ l de muestra por cada calle y atendiendo a los siguientes parámetros:

- Patrón: 5 μ l de marcador (25 μ g prot/pocillo) + 20 μ l tampón + 5 μ l glicerina/bromofenol + 2,5 μ l mercaptoetanol.
- Muestra: 10 μ l de muestra + 20 μ l tampón + 5 μ l glicerina/bromofenol + 2,5 μ l mercaptoetanol.

Después se colocaba la solución tampón de electroforesis en la cámara interna del electrodo hasta que se cubría por completo el gel, y el resto se depositaba en la cubeta de electroforesis. Una vez realizadas estas maniobras, se conectaban los electrodos a la fuente de alimentación y se hacía correr el gel hasta que el frente de azul de bromofenol llegara hasta el final del gel.

El buffer de electroforesis empleado estaba constituido por Tris 25 mM pH 8.3, glicina 190 mM y SDS al 0.1%. Las electroforesis se inician con 80 V, 150 mA y 300/150 W manteniéndolas así hasta que las muestras penetran en el gel separador (30 minutos), y es entonces cuando se incrementa el voltaje hasta 1500 V, igualmente a 150 mA y 300/150 W durante 1 hora.

Al final, los geles eran desmontados, separados de los cristales con ayuda de agua destilada, y procediendo posteriormente al proceso de tinción y destinción. La tinción de los geles se practicó, durante un periodo de 1 hora, mediante una solución que contenía 0.25 g de colorante Coomassie Brilliant Blue (R-250), disueltos en 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético glacial y 325 ml de H₂O. Para el proceso de destinción, los geles fueron lavados repetidas veces en una solución de ácido acético al 7.5%, en agitación, hasta que se visualizaron bien las bandas.

3.8.3. Identificación de Proteínas por Espectrometría de Masas

La Espectrometría de Masas es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

3.8.3.1. Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación de péptidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

Para proceder a la identificación proteica se procedió a una digestión enzimática con tripsina de las manchas proteicas a partir de los geles SDS-PAGE. Para ello, se cortaron ambas bandas con una hoja de bisturí y se depositaron en sendos tubos Eppendorf.

Después de realizar dos lavados con agua milli-Q durante 10 minutos, se procedió a su deshidratación cubriendo la porción de gel con acetonitrilo (AcN) durante 5 minutos,

en espera de que el gel se deshidrate y se libere el colorante. Esta operación se repitió dos veces para que el gel quedara más o menos blanco.

Después de secar a vacío mediante centrífuga “Speed-Vac”, se procedió a su reducción y alquilación cubriendo las bandas con una solución 10 mM Di-tio-treitol (DTT) en bicarbonato amónico 25 mM (NH_4HCO_3), durante 30 minutos a 56 °C. Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente, se elimina el DTT y añade AcN, el fue es retirado rápidamente para incubar con iodoacetamida 55 mM (10 mg /ml) en 25 mM de NH_4HCO_3 durante 15 minutos en oscuridad.

De nuevo las muestras fueron incluidas en AcN durante 5 minutos y se retiró posteriormente, se añadió entonces NH_4HCO_3 25 mM y se incubó otros 5 minutos, tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añadió igual volumen de AcN y se incubó otros 15 minutos. Estando así, las muestras se secaron a vacío en centrífuga “speed-vac”, y seguidamente se procedió a su digestión.

Para proceder a la digestión, se añadió tripsina en una concentración de 12,5 ng/ μl en 25 mM de NH_4HCO_3 y en un volumen que cubra bastante por encima las bandas que ahora están deshidratadas. Se incubó en hielo durante 45 minutos para que se absorbiera pero sin que llegase a actuar, se retiró el sobrenadante y se añadió NH_4HCO_3 25 mM hasta cubrir las bandas.

Tras incubar las muestras toda la noche a 37 °C, los tubos fueron agitados con vórtex y se centrifugaron para pasar el sobrenadante a nuevos tubos.

Para proceder a la extracción de los péptidos, las bandas fueron cubiertas con AcN /0.5% ácido trifluoroacético (TFA) al 50% y se sonicaron 10 minutos. El sobrenadante fue pasado a otros tubos, repitiendo esta operación tres veces. Esta extracción se repitió tres veces con AcN, a un tiempo de 10 minutos cada una, depositando los sobrenadantes junto con los de las tres extracciones anteriores.

Todos los sobrenadantes juntos fueron secados mediante centrífuga “speed-vac” y resuspendidos en 5 μl de AcN en 0.1% TFA al 50%.

El análisis de los péptidos se realizó mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF, mediante un Espectrómetro de Masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer



(AB Sciex, Foster City, CA, USA), con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tandem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones de Applied Biosystems. La identificación de proteínas no siempre es concluyente y no es posible en el caso de especies cuyas proteínas están poco representadas en las bases de datos. En estos casos es necesaria la fragmentación de los péptidos para obtener la secuencia de aminoácidos y por tanto la identificación de la proteína por diferentes medios (Búsquedas en bases de datos de secuencias EST, análisis mediante BLAST, secuenciación de novo). De esta manera se procedió para la obtención del mapa o huella peptídica.

A partir de una fragmentación automática de péptidos (de 1 a 3 péptidos por MS/MS), se procedió a la búsqueda e identificación de proteica mediante huella peptídica (datos MS) mediante las secuencias de péptidos (datos MS/MS).

La secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

La búsqueda automática e identificación se practicó mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF.

3.9. Análisis Estadístico de los Resultados

La respuesta del rendimiento cuántico fotosintético fue obtenida mediante el paquete informático ToxyWin v1.14 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), mientras que las gráficas correspondientes al balance de oxígeno fueron monitorizadas con el paquete informático Oxygraph Plus V v1.01 (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). Todos los experimentos fueron realizados al menos 8 veces, y cada muestra fue analizada por triplicado. La media aritmética y desviación estándar fue calculada para cada tratamiento, y la concentración inhibitoria media a las 72 horas ($IC_{50(72)}$) se calculó de acuerdo con los datos obtenidos en los experimentos. Igualmente fueron calculados los parámetros de concentración inhibitoria total ($IC_{100(72)}$), y la máxima

concentración con la que no se observan efectos adversos en las muestras ensayadas (NOEC (72 h)).

Las diferencias estadísticamente significativas entre muestras fueron determinadas usando el análisis de Varianza ANOVA, aplicando posteriormente un análisis Bonferroni como sistema comparativo entre los diferentes grupos. El valor de significación $p < 0.05$ era considerado como significativo. La obtención de las curvas respuesta, así como todo el tratamientos de datos y el análisis de correlación, fue realizado usando el paquete informático GrapPad Prism v4.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA).

Para el estudio de la capacidad de duplicación exhibida por la especie *Dictyosphaerium chlorelloides*, tanto en la cepa salvaje como en la tolerante a Cr(III) 30 mg/l, se empleó el ajuste malthusiano propuesto por Crow y Kimura (1970), mediante la fórmula

$$m = \log_e \frac{\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t}$$

donde m es el índice de crecimiento, es decir, el número de duplicaciones que se producen cada día, N_t y N_0 la densidad celular final e inicial respectivamente, y t el tiempo de observación transcurrido entre N_0 y N_t .

Para el estudio matemático de esfericidad celular, en los estudios de células de *D. chlorelloides* tolerantes a Cr(III) 30 mg/l, se empleó un coeficiente de forma (CF), modificado del propuesto por Renau-Piqueras *et al.* (1985). Este valor CF se obtiene a través de la expresión

$$CF = \frac{P_m}{P_r}$$

donde P_m es el perímetro de la circunferencia más grande que puede ser incluido dentro de los límites de cada imagen digitalizada, y P_r es el perímetro real de esa imagen. El valor de $CF=1$ correspondería a la esfericidad total. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el Test de Mann Withney, usando igualmente el paquete informático GrapPad Prism v4.0.

Y para determinar el volumen celular, se han utilizado las fórmulas:

$$\frac{4}{3}\pi r^3 \qquad \frac{4}{3}\pi r_1 r_2 r_3$$

según se aplique a la obtención del volumen de las células representantes de la cepa salvaje de *D. chlorelloides* (volumen de una esfera), o al de las células de la cepa tolerante DcCr(III)R30 (volumen de un ovoide).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de Toxicidad Aguda

Los valores obtenidos acerca de NOEC (72 h), además de IC₅₀₍₇₂₎ e IC₁₀₀₍₇₂₎ con sus correspondientes límites de confianza al 95%, en la cepa de *Dictyosphaerium chlorelloides* salvaje y tolerante a Cr(III), DcCr(III)R30, son presentados en las tablas 4.1-1 y 4.1-2.

<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>				
Parámetro	n	NOEC (72 h)	IC ₅₀₍₇₂₎ (LC 95%)	IC ₁₀₀₍₇₂₎ (LC 95%)
Crecimiento celular	8	10	14.26 (11.17-26.42)	20.42 (16.07-24.76)
Φ _{PSII}	8	5	7.89 (7.15-8.64)	12.62 (11.19-15.17)
Balance de O ₂	8	5	7.67 (6.99-8.33)	12.36 (11.09-14.49)

NOEC (72 h): Máxima concentración sin efectos tóxicos observables; IC₅₀₍₇₂₎: concentración inhibitoria media; IC₁₀₀₍₇₂₎: concentración inhibitoria total.

Tabla 4.1-1. Valores correspondientes a los parámetros toxicológicos seleccionados, para los ensayos realizados con la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*. Los valores son el resultado de un total de 8 experimentos (n=8) y se expresan en ppm.

		<i>DcCr(III)R30</i>		
Parámetro	n	NOEC	IC ₅₀₍₇₂₎	IC ₁₀₀₍₇₂₎
		(72 h)	(LC 95%)	(LC 95%)
Crecimiento celular	8	90	502.34 (452.90-562.34)	2792.54 (2037.04-4446.31)
Φ _{PSII}	8	30	167.11 (158.12-175.39)	889.20 (855.07-928.97)
Balance de O ₂	8	20	135.83 ^a (118.30-152.40)	849.18 (788.86-928.97)

NOEC (72 h): Máxima concentración sin efectos tóxicos observables; IC₅₀₍₇₂₎: concentración inhibitoria media; IC₁₀₀₍₇₂₎: concentración inhibitoria total. ^a: diferencias estadísticamente significativas a p<0.05 con respecto al valor de crecimiento celular.

Tabla 4.1-2. Valores correspondientes a los parámetros toxicológicos seleccionados, para los ensayos realizados con la cepa tolerante DcCr(III)R30. Los valores son el resultado de un total de 8 experimentos (n=8) y se expresan en ppm.

Atendiendo a la clasificación presentada por la *Environmental Protection Agency* (USEPA, 2000), acerca de la toxicidad aguda de contaminantes sobre organismos acuáticos, los valores de IC₅₀₍₇₂₎ correspondientes a la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* varían según se tengan en cuenta las variaciones sobre el crecimiento poblacional o la alteración de la actividad fotosintética, encuadrándose dentro del parámetro de “poco tóxico” para el primero, y “moderadamente tóxico” para los segundos. Sin embargo, en el caso de la cepa DcCr(III)R30, los valores pertenecientes al crecimiento celular, rendimiento cuántico fotosintético y balance de oxígeno se incluirían dentro del parámetro de “prácticamente no tóxicos”.

En ambos casos, en el estudio comparativo entre los tres parámetros seleccionados se observa un desplazamiento a la izquierda de las rectas de regresión lineal (Figura 4.1-1), correspondientes a los parámetros fotosintéticos, tanto de rendimiento cuántico fotosintético como de balance de oxígeno, con respecto al crecimiento celular. Sin embargo, dicho desplazamiento no es lo suficiente como para que las rectas de regresión lineal obtenidas sean estadísticamente significativas p<0.05 en el caso de la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*, mientras que dicho grado de

significación aparece en la cepa DcCr(III)R30 cuando se comparan las rectas correspondientes a crecimiento celular y balance de oxígeno.

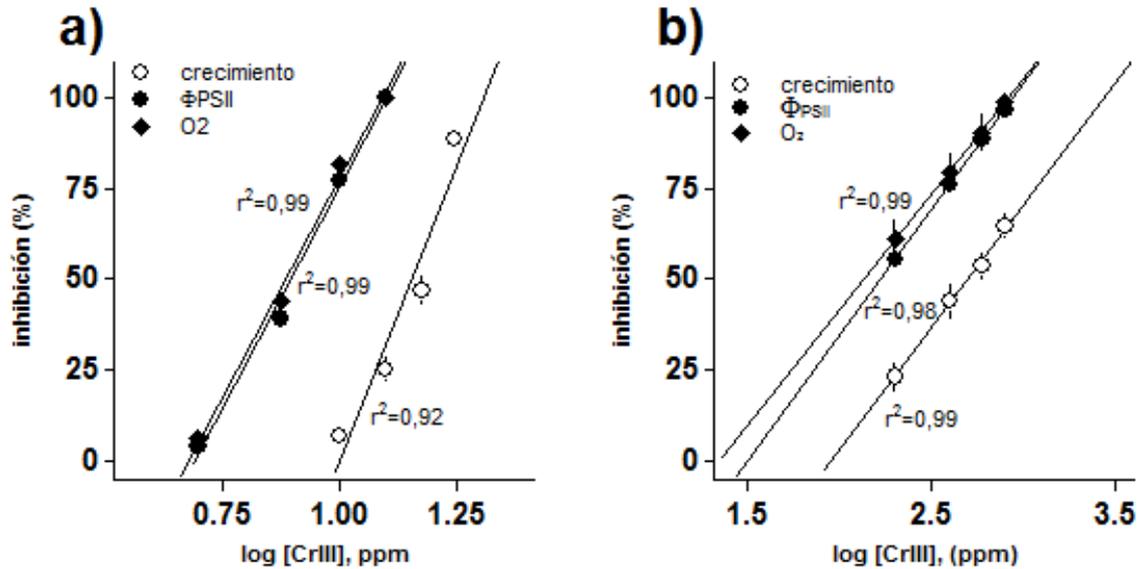


Figura 4.1-1. Respuesta inhibitoria del crecimiento celular (○), rendimiento cuántico fotosintético (●) y balance de oxígeno (◆), correspondiente a los ensayos sobre la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (a) y la cepa tolerante DcCr(III)R30. Los puntos representan las medias, y las líneas verticales sus correspondientes desviaciones estándar, de ocho observaciones (n=8).

El análisis del rendimiento de oxígeno indica que en ambos parámetros estudiados, producción y consumo de oxígeno, se produce una inhibición concentración dependiente tanto en los ensayos con la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Figura 4.1.-2a) como en los practicados sobre la cepa tolerante DcCr(III)R30 (Figura 4.1-2b). Los análisis comparativos que involucran por un lado a la producción y por otro lado al consumo, con independencia de la concentración en una u otra cepa, marcan similar efecto para cada uno de los puntos que conforman la recta de regresión. Únicamente se observa una diferencia muy significativa en el aumento y disminución de oxígeno en el medio, ya que la cepa tolerante a Cr(III) consume y produce mucho menos oxígeno que la cepa salvaje, aproximadamente 5 veces menos.

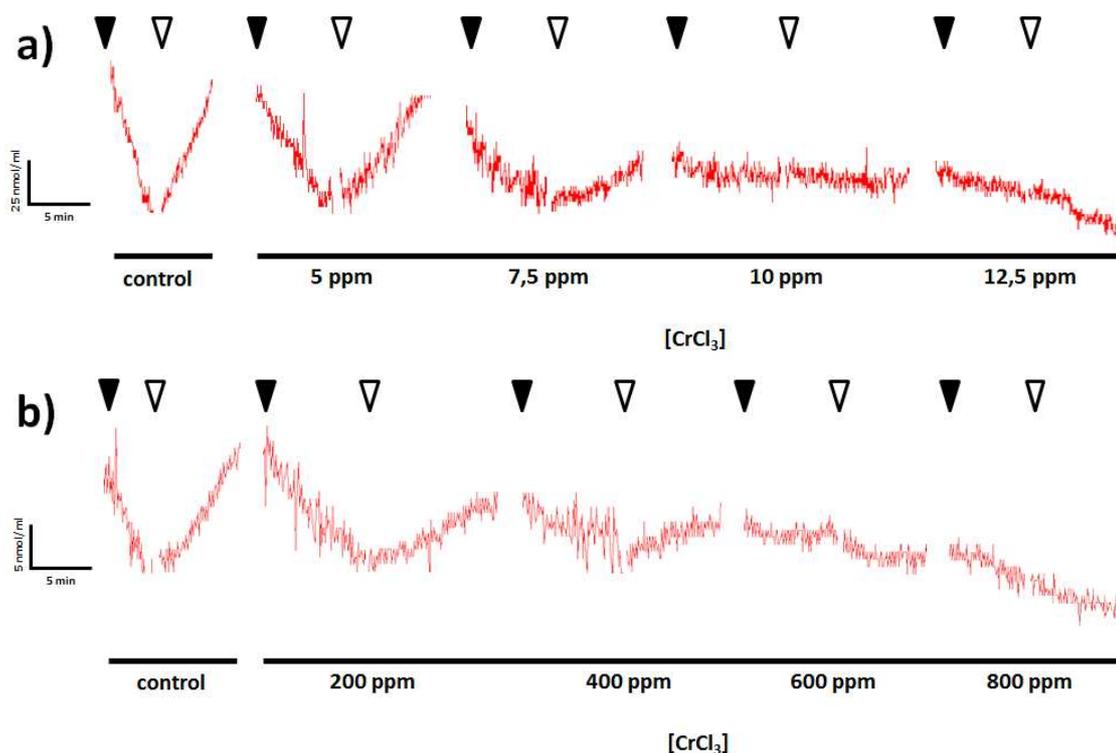


Figura 4.1-2. Gráficas obtenidas en los ensayos para determinar la disminución en la producción de oxígeno durante la fase lumínica (▽) y la reducción del consumo de oxígeno durante la fase oscura (▼) de una población celular correspondiente a la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (a) y otra representativa de la cepa tolerante DcCr(III)R30 (b), expuestas a concentraciones crecientes de CrCl_3 .

4.2. *Dictyosphaerium chlorelloides* Tolerante a Cr(III)

Después del cultivo durante 60 días de la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*, en medio BG11 que contenía una concentración de 30 mg/l de CrCl_3 y bajo las condiciones descritas en el capítulo de Material y Métodos, una cepa de esta alga verde tolerante a dicha concentración [DcCr(III)R30] pudo ser mantenida en el laboratorio para ser utilizada en los ensayos toxicológicos propuestos.

En este proceso de mantenimiento en laboratorio, se pudo determinar el índice de crecimiento celular exhibido por la cepa tolerante a 2,4-DNP 2 mM, el cual fue cuantificado en un valor $m = 0.104 \pm 0.031$, y compararlo con el obtenido con la cepa salvaje de *D. chlorelloides*, con la que se obtuvo un valor $m = 0.660 \pm 0.020$.

4.2.1. Estudio Morfológico

4.2.1.1. Resultados Obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La observación de las células correspondientes a los dos modelos, salvaje y tolerante a Cr(III), mediante la técnica SEM, pone en evidencia que el clon tolerante sufre una serie de modificaciones morfológicas muy significativas, respecto a las características propias de la cepa salvaje (Figura 4.2.1.1-1), y que se encuadran dentro de los parámetros de variación de superficie, y cambios de forma y tamaño a nivel general.

La comparación entre ambas paredes celulares pone de manifiesto que la cepa tolerante DcCr(III)R30 desarrolla una superficie más rugosa que la cepa salvaje, estructurando dicha superficie de contacto con el medio de forma distinta.

La forma geométrica también sufre una drástica variación. Las mediciones correspondientes a un total de 400 células, 200 de ellas correspondientes a la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*, y las otras 200 a la cepa tolerante DcCr(III)R30, han dado como resultado valores CF de 0.91 ± 0.05 y 0.49 ± 0.10 , respectivamente.

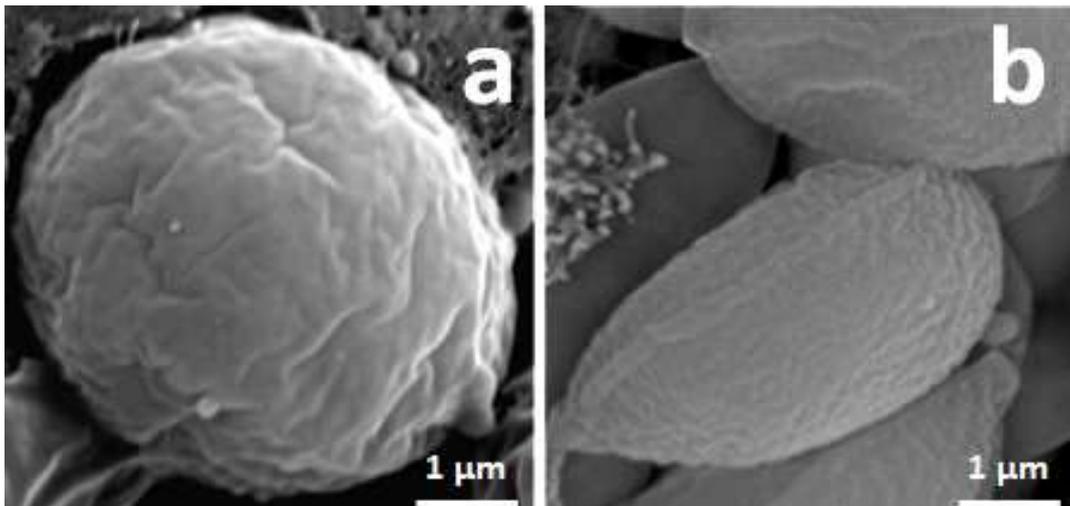


Figura 4.2.1.1-1. Imágenes ultraestructurales de células representativas de la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (a) y de la cepa tolerante DcCr(III)R30 (b), obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (x15.000).

En los mismos grupos celulares (cepa salvaje y células del clon tolerante) se ha estudiado el tamaño mediante el análisis del volumen celular. El valor medio obtenido para la cepa salvaje fue de $297.75 \pm 13.77 \mu\text{m}^3$ (n=200), mientras que era sólo de $145.82 \pm 27.85 \mu\text{m}^3$ (n=200) para las células tolerantes a Cr(III), lo que supone un significativo porcentaje de reducción del 51.03 ± 9.35 respecto a las anteriores (Figura 4.2.1.1-2).

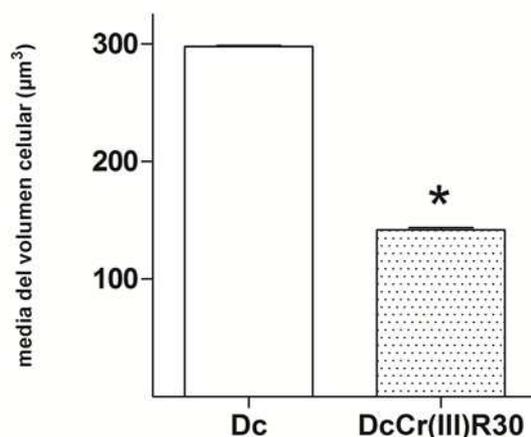


Figura 4.2.1.1-2. Comparación del volumen correspondiente a las cepas salvaje (Dc) y tolerante a Cr(III) [DcCr(III)R30] de *D. chlorelloides*. Cada barra representa un total de 200 mediciones celulares (*) indica un grado de significación superior a $p < 0.05$.

4.2.1.2. Resultados Obtenidos por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

De la observación de las diferentes estructuras celulares de DcCr(III)R30, por microscopía electrónica de transmisión, se desprende que las células integrantes de este clon sufren una gran variedad de cambios morfológicos. Lo primero que llama la atención es el significativo incremento de grosor de la pared celular, respecto a la cepa salvaje, en unas dimensiones que están alrededor de 8 veces más espesor (Figura 4.2.1.2-1).

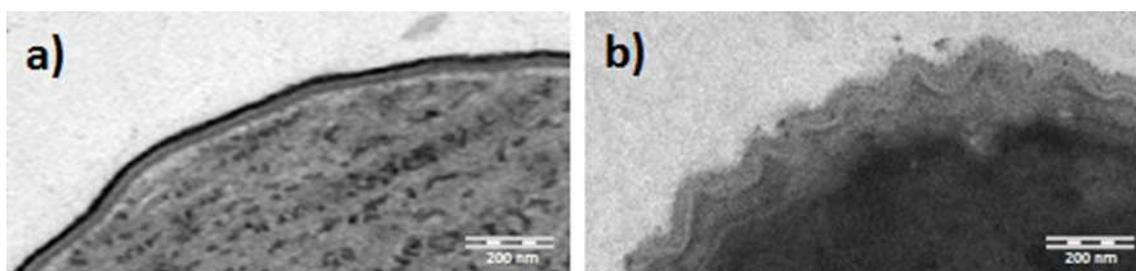


Figura 4.2.1.2-1. Imagen ultraestructural comparativa entre las paredes celulares de la cepa salvaje de *D. chlorelloides* (a) y DcCr(III)R30 (b) (x80.000).

En segundo lugar, en la cepa tolerante aparece un significativo incremento en el número de vacuolas intracitoplasmáticas, respecto al número de éstas que aparecen en la cepa salvaje de *D. chlorelloides* (Figura 4.2.1.2-2).

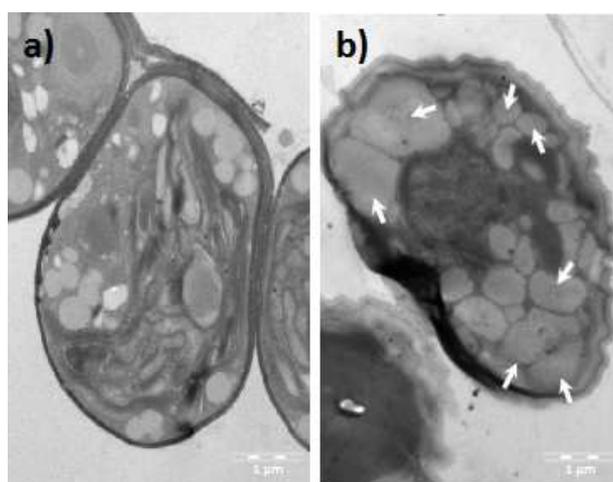


Figura 4.2.1.2-2. Imagen ultraestructural comparativa entre dos células pertenecientes a la cepa salvaje de *D. chlorelloides* (a) y a DcCr(III)R30 (b) (x20.000). Las flechas marcan la densidad vacuolar en la cepa tolerante.

Finalmente, otro aspecto diferencial entre ambas cepas es la aparición en las células tolerantes a Cr(III) de unos acúmulos de material electrodensos, ausente en las células de la cepa salvaje, similares a como aparecería un elemento como el cromo en el interior celular. Estos acúmulos se distribuyen por todo el interior de las células,

apareciendo tanto en la pared celular como en el citoplasma o vacuolas (Figura 4.2.1.2-3).

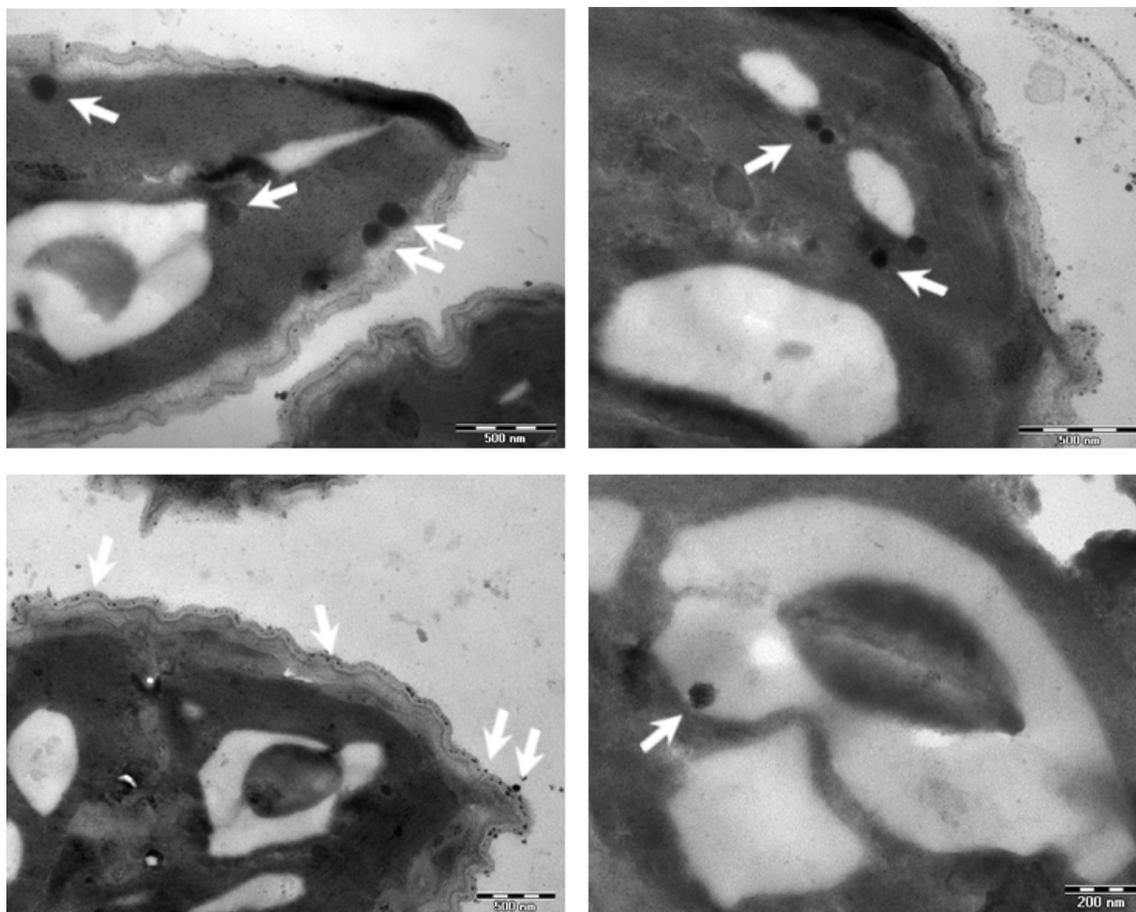


Figura 4.2.1.2-2. Imágenes ultraestructurales correspondientes a pared celular, citoplasma y vacuola de la cepa tolerante DcCr(III)R30 (b) (x80.000). Las flechas marcan la presencia de acúmulos electrodensos repartidos en los diferentes elementos.

4.2.1.3. Acúmulo de Cromo Celular por Energía Dispersiva de Rayos X (EDX)

Los resultados obtenidos en la búsqueda de cromo en la superficie celular, por dispersión de Rayos X combinada con microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX) se incluyen en la Figura 4.2.1.3-1. El análisis comparativo de ambos espectros muestra

la aparición de cromo en la superficie de la pared celular de las células representantes de la cepa tolerante a cromo trivalente (Figura 4.2.1.3-1b), hecho que no aparece en las células control de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Figura 4.2.1.3-1a).

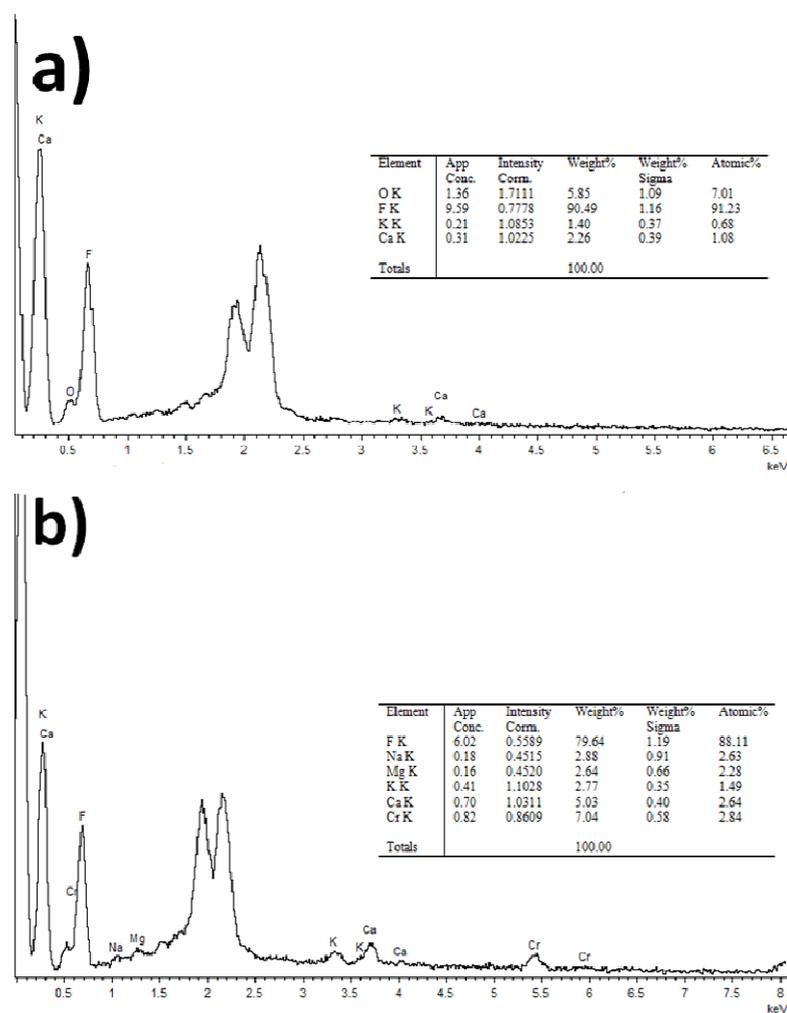


Figura 4.2.1.3-1. Espectros de energía dispersiva de rayos X obtenidos por SEM (SEM-EDX) representativos de las paredes celulares pertenecientes a la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (a) y al clon tolerante CdCr(III)R30 (b).

Cuando esta búsqueda se practicó en las diferentes estructuras celulares en ambas cepas, mediante la combinación de EDX con microscopía electrónica de transmisión (TEM-EDX), los espectros presentaron picos correspondientes al cromo en el interior de pared celular, citoplasma y asociado al pirenoide, pero no de forma libre en el interior vacuolar (Figura 4.2.1.3-2).

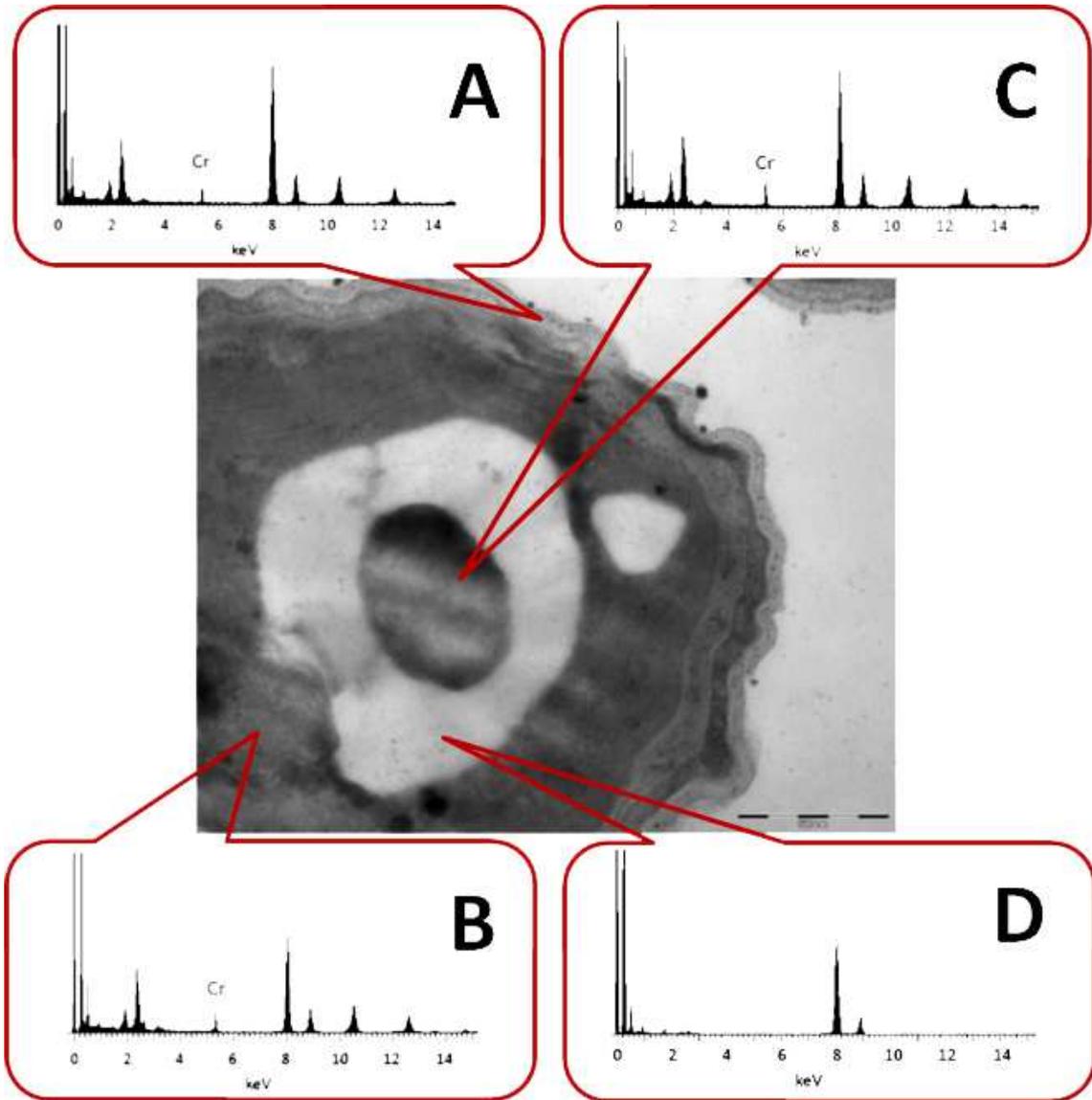


Figura 4.2.1.3-1. Espectros de energía dispersiva de rayos X obtenidos por TEM (TEM-EDX) representativos del interior de la pared celular (a), citoplasma (b), pirenoide (c) e interior vacuolar (d), perteneciente a la cepa tolerante a Cr(III) de *Dictyosphaerium chlorelloides*.

4.2.2. Estudio Proteico

4.2.2.1. Diferenciación proteica por Electroforesis SDS-PAGE

El resultado de comparar las expresiones proteicas obtenidas tras el tratamiento de células representantes de la cepa salvaje de *D. chlorelloides* y la tolerante a concentraciones de 30 mg/l de Cr(III), se sumarizan en la Figura 4.2.2.1-1.

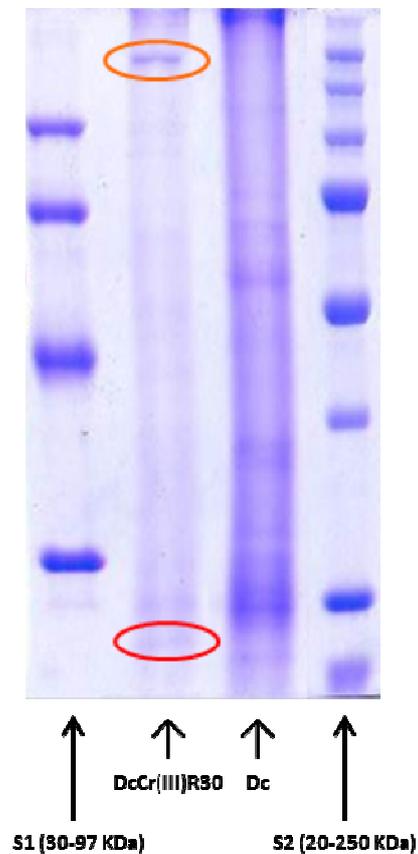


Figura 4.2.2.1-1. Electroforesis SDS-PAGE perteneciente a ambas cepas de *D. chlorelloides*, salvaje y tolerante a 30 mg/l de Cr(III), en comparación con los estándares proteicos comerciales (S1 y S2). Los óvalos rojos resaltan dos bandas proteicas aparecidas en la cepa tolerante, que no aparecen en la cepa salvaje.

El estudio comparativo ha puesto en evidencia la presencia de al menos dos bandas proteicas que aparecen claramente en la cepa DcCr(III)R30, y que sin embargo no aparecen en la muestra perteneciente a la cepa salvaje. A partir de la curva de

La búsqueda e identificación de la proteína mediante huella peptídica, con la consiguiente fragmentación peptídica de cada uno de ellos, mediante MS/MS y su secuenciación *de novo*, se representan en las Figuras 4.2.2.2.1-2, -3, -4, -5 y -6, respectivamente.

En la Tabla 4.2.2.2.1-1 se incluyen las secuencias aminoacídicas de cada uno de los péptidos estudiados.

PEPTIDO (m/z)	SECUENCIA (aa)			
1538,70	ALWSSLESFLETR			
1570,80	ALW(diox)SSLESFLETR			
1982,00	EWKALWSSLESFLETR			
2055,89	YFLGAESLTDPEVDKSER			
2183,90	KYFLGAESLTDPEVDKSER			

A: alanina	Q: glutamina	L: leucina	S: serina
R: arginina	E: ac. glutámico	K: lisina	T: treonina
N: asparagina	G: glicina	M: metionina	W: triptófano
D: ac. aspártico	H: histidina	F: fenilalanina	Y: tirosina
C: cisteína	I: isoleucina	P: prolina	V: valina

Tabla 4.2.2.2.1-1. Secuenciaciones *de novo* correspondientes a cada uno de los péptidos obtenidos a partir de la banda proteica de 23,052 KDa.

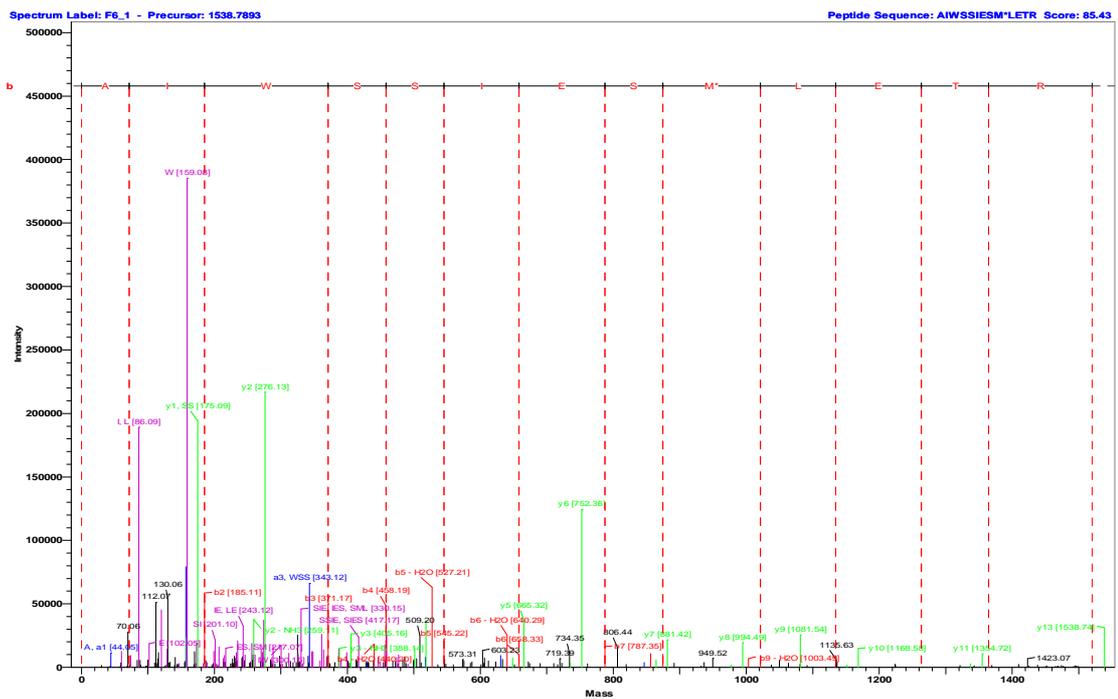
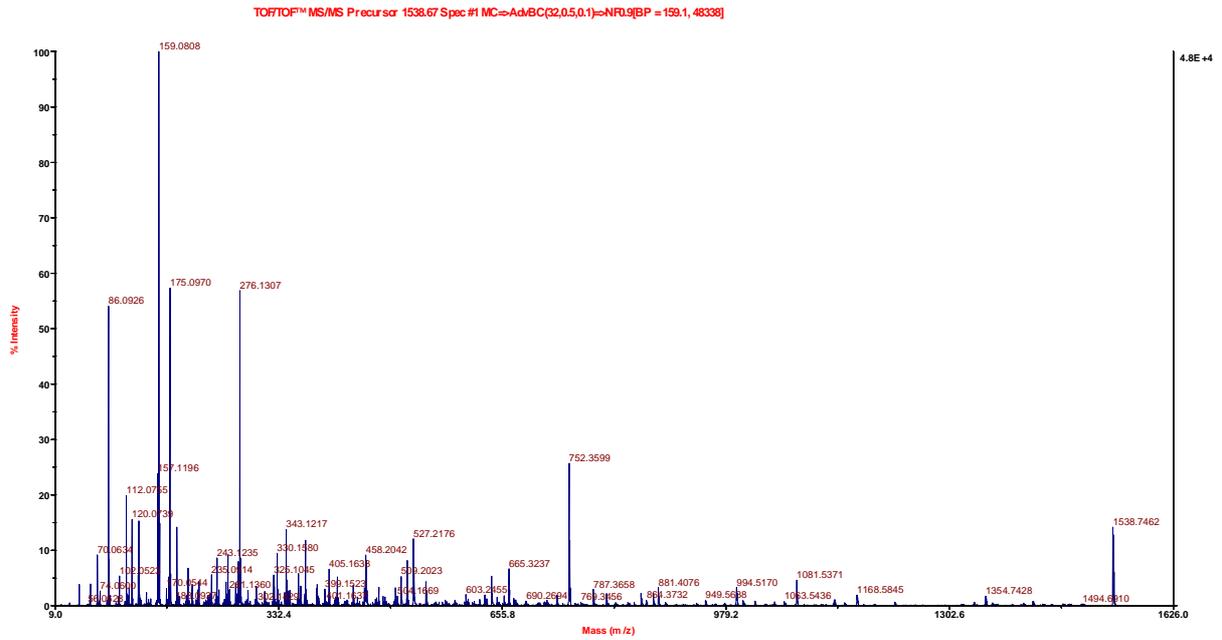


Figura 4.2.2.1-2. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1538,70.

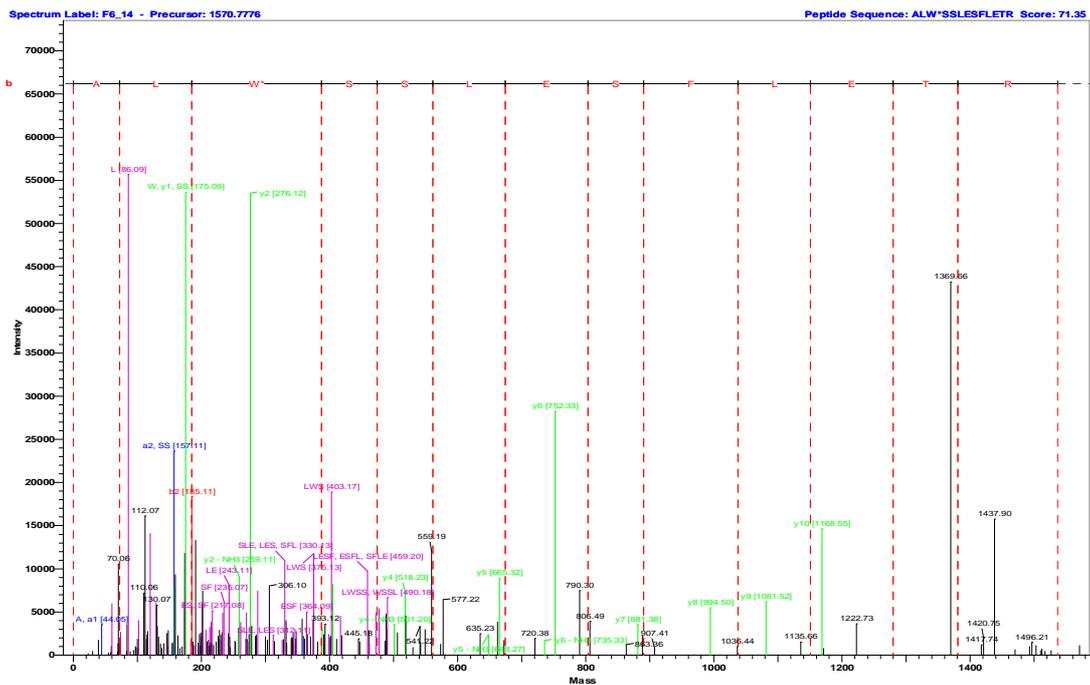
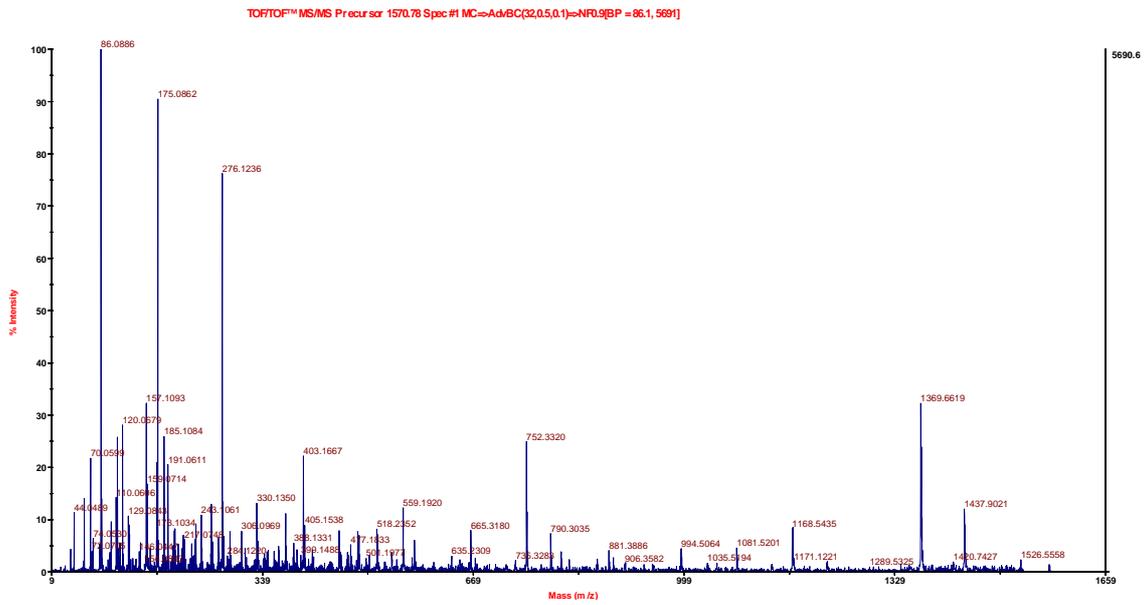


Figura 4.2.2.1-3. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1570,80.

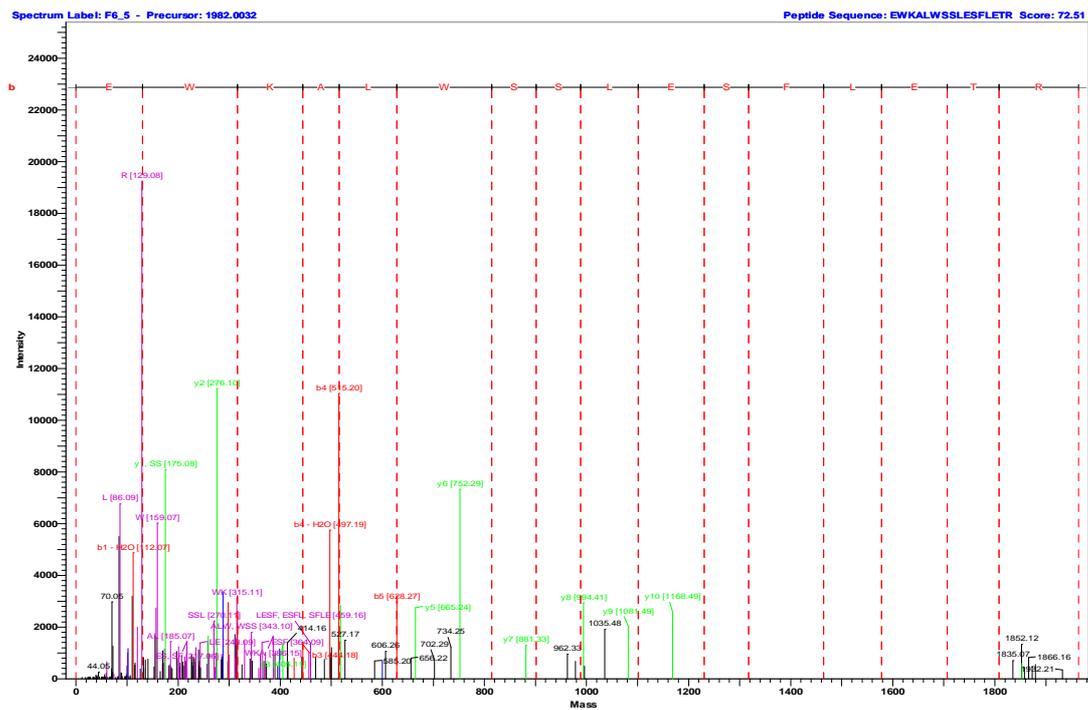
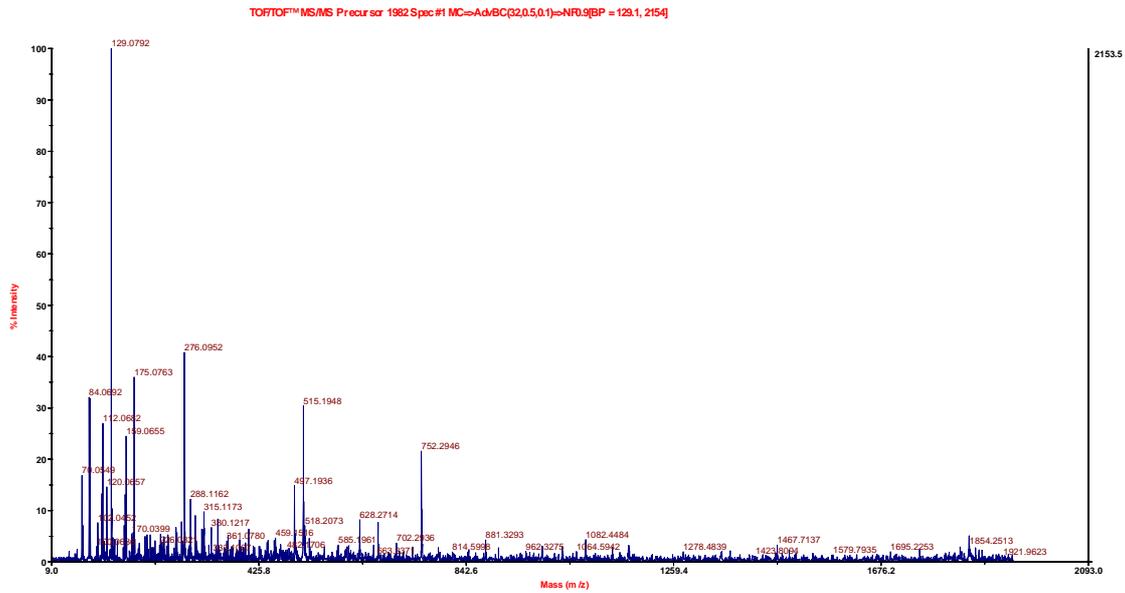


Figura 4.2.2.1-4. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1982,00.

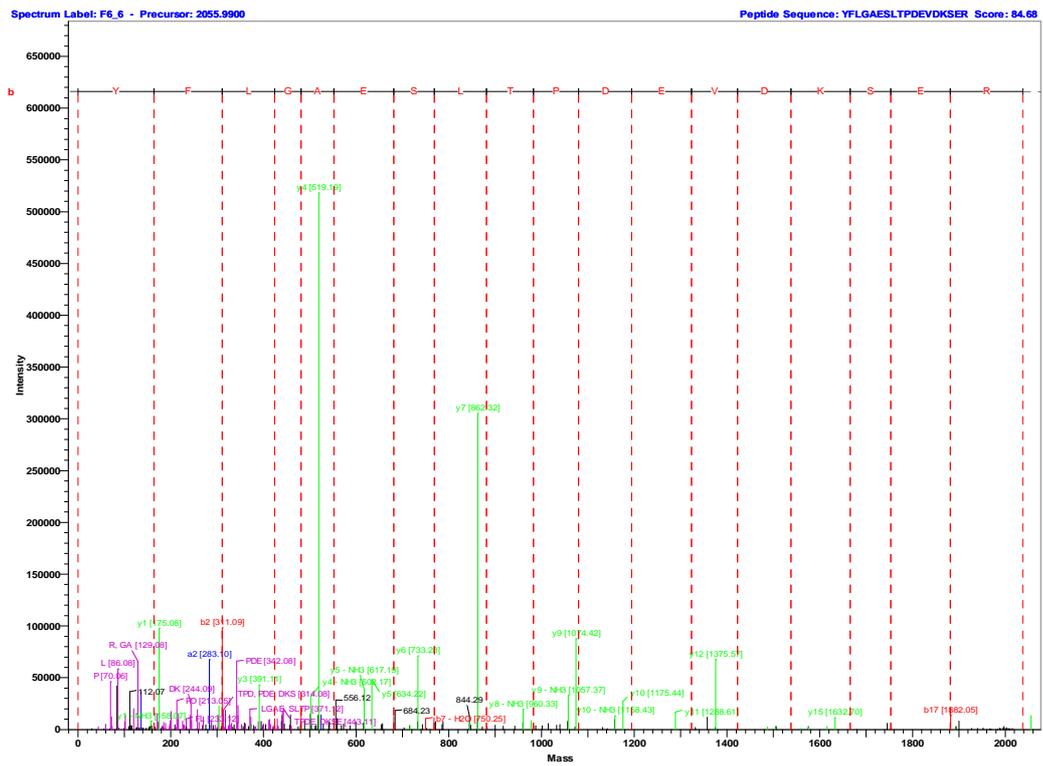
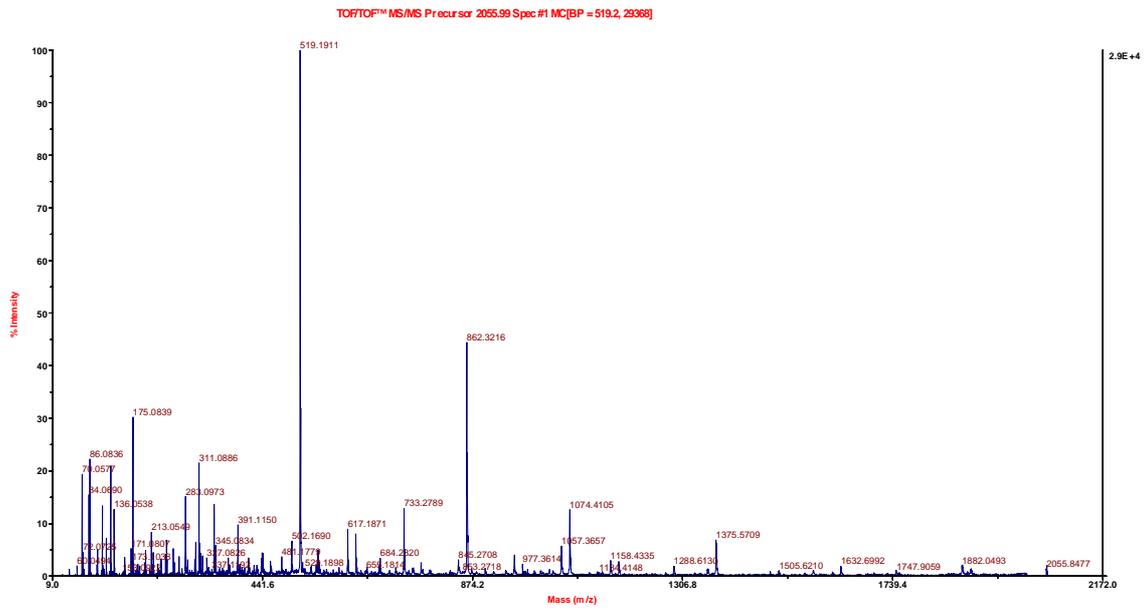


Figura 4.2.2.2.1-5. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 2055,89.

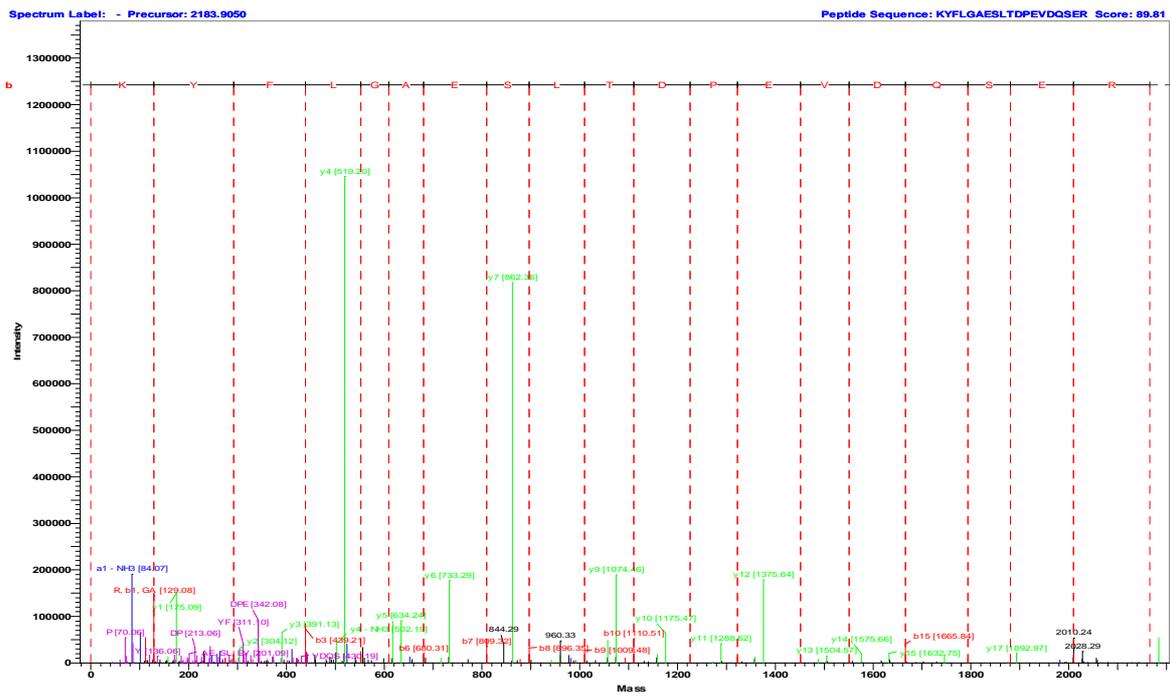
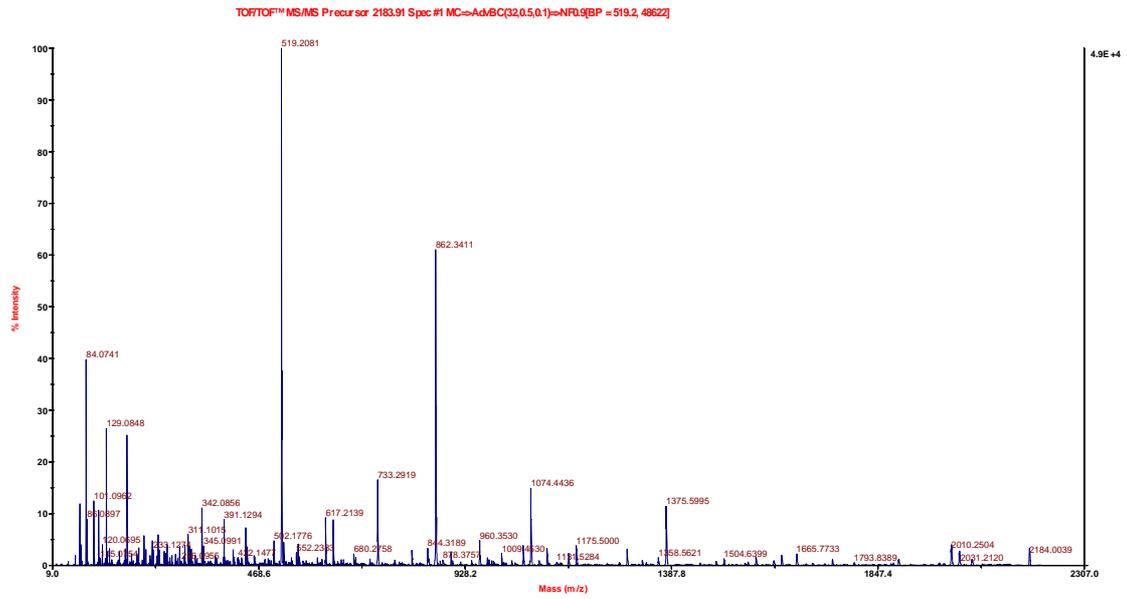


Figura 4.2.2.1-6. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 2183,90.

4.2.2.2. Banda proteica de 153,793 KDa

El análisis de péptidos, mediante espectrofotometría de masas, queda representado en la Figura 4.2.2.2-1. En ella se aprecian los cinco péptidos seleccionados, que poseen una relación carga/masa (m/z) de 1304,67; 1527,70; 1990,85; 2321,08 y 2895,13, respectivamente.

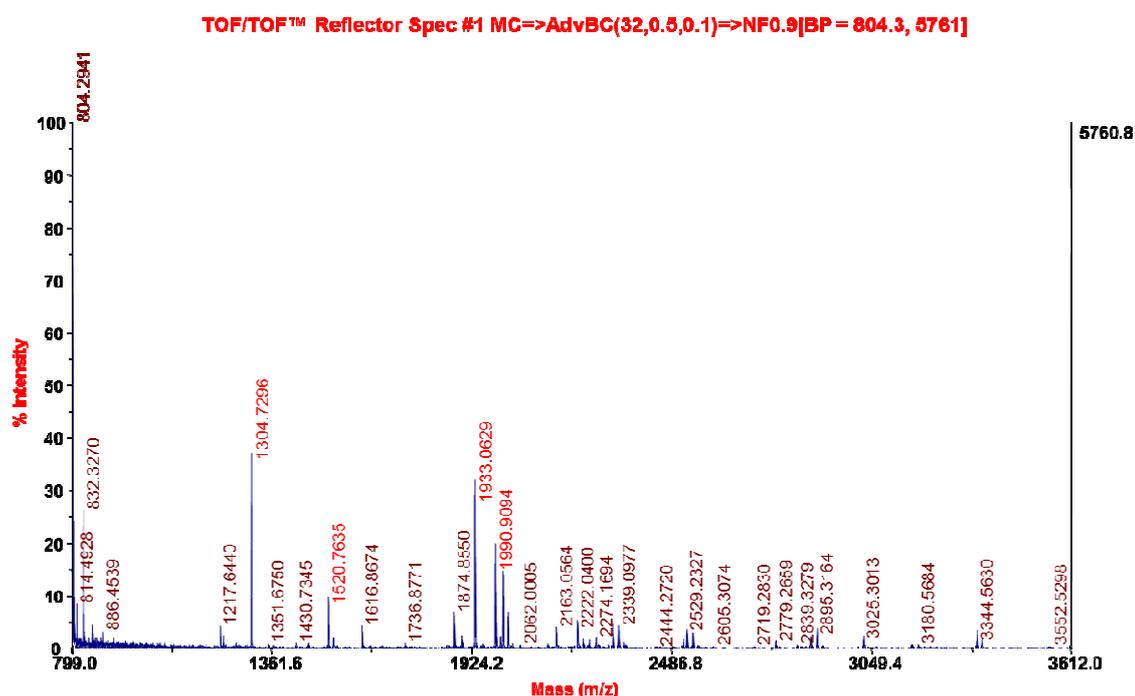


Figura 4.2.2.2-1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF), correspondiente a la banda proteica de 153,461 KDa procedente de la cepa DcCr(III)R30.

La búsqueda e identificación de la proteína mediante huella peptídica, con la consiguiente fragmentación peptídica de cada uno de ellos, mediante MS/MS y su secuenciación *de novo*, se representan en las Figuras 4.2.2.2.2-2, -3, -4, -5 y -6, respectivamente.

En la Tabla 4.2.2.2-1 se incluyen las secuencias aminoacídicas de cada uno de los péptidos estudiados.

PEPTIDO (m/z)	SECUENCIA (aa)
1304,67	VILDFKAEITR (VLLDFQLEITR) ???
1527,70	SALPMISGTGITGCR
1990,85	PTACYASGTDCSPTYALR
2321,08	LPESVAGTCASVSNNAPLEVR
2895,13	SSGYTLDDCCGVDAGGMPAAAVDVYTAR

A: alanina	Q: glutamina	L: leucina	S: serina
R: arginina	E: ac. glutámico	K: lisina	T: treonina
N: asparagina	G: glicina	M: metionina	W: triptófano
D: ac. aspártico	H: histidina	F: fenilalanina	Y: tirosina
C: cisteína	I: isoleucina	P: prolina	V: valina

Tabla 4.2.2.2-1. Secuenciaciones *de novo* correspondientes a cada uno de los péptidos obtenidos a partir de la banda proteica de 153,461 KDa.

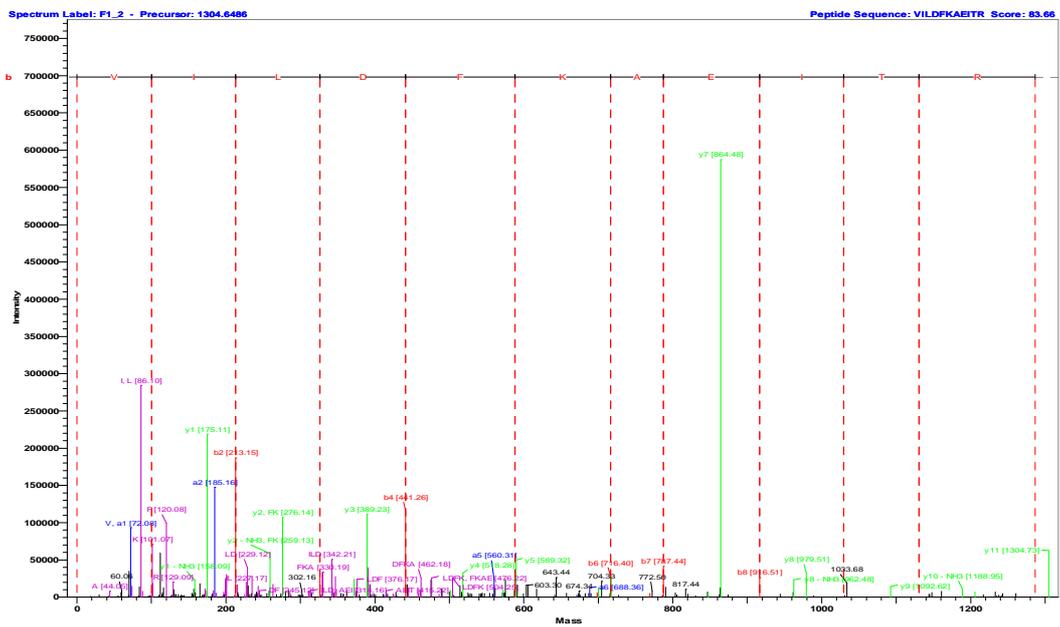
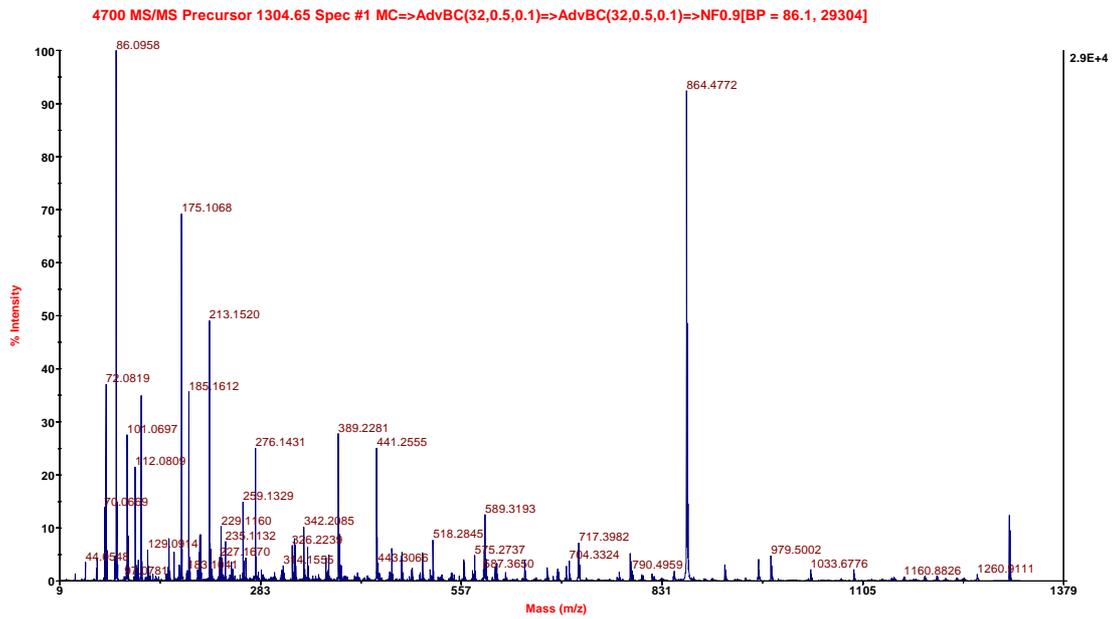


Figura 4.2.2.2-2. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1304,67.

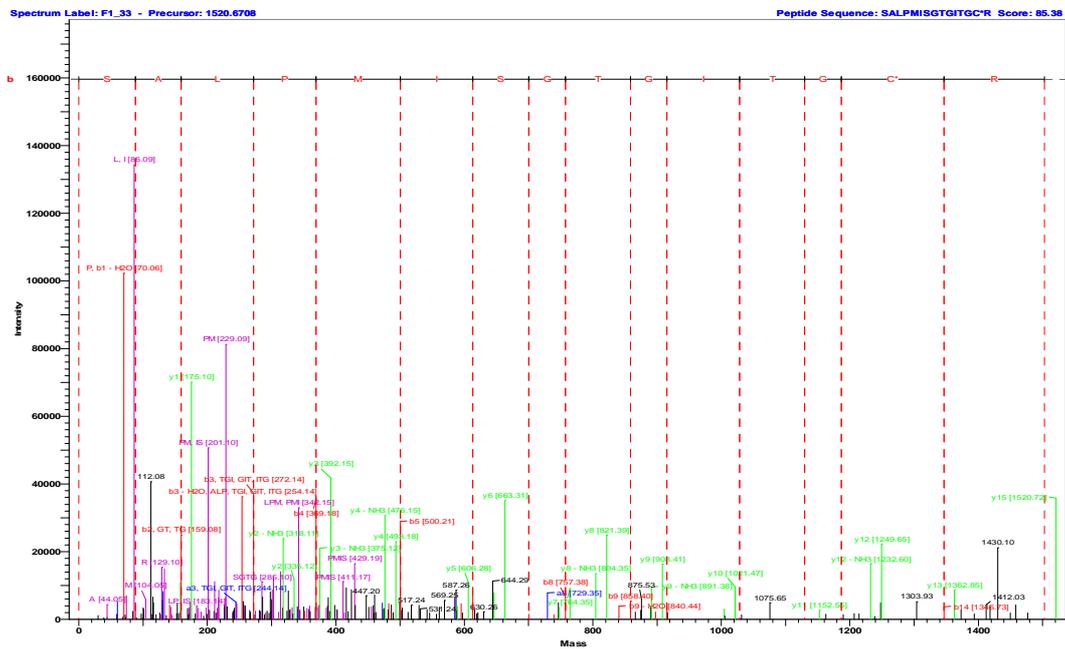
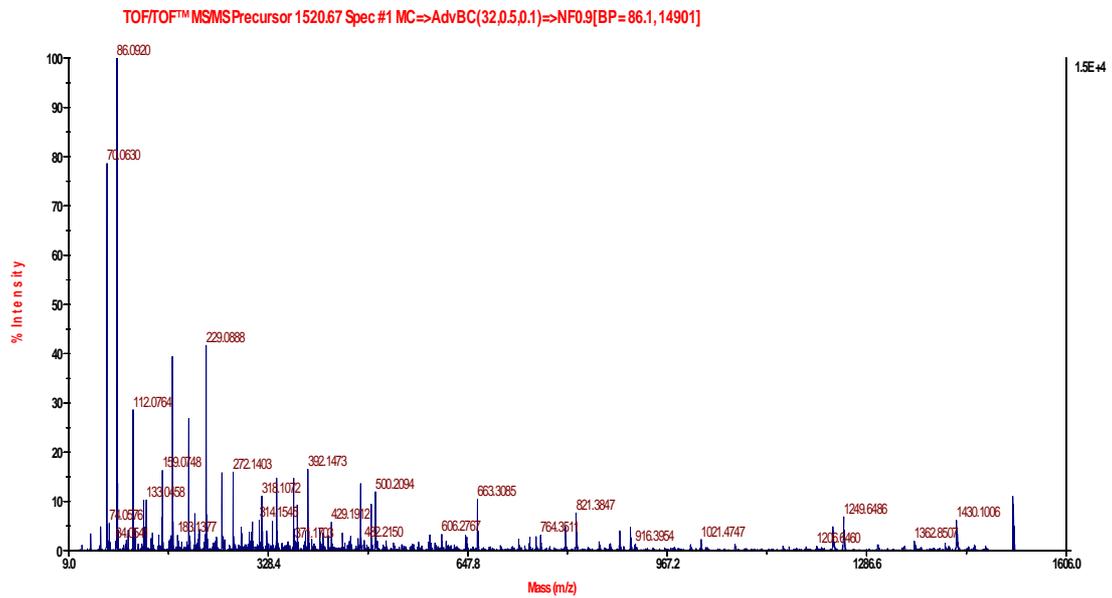


Figura 4.2.2.2-3. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1527,70.

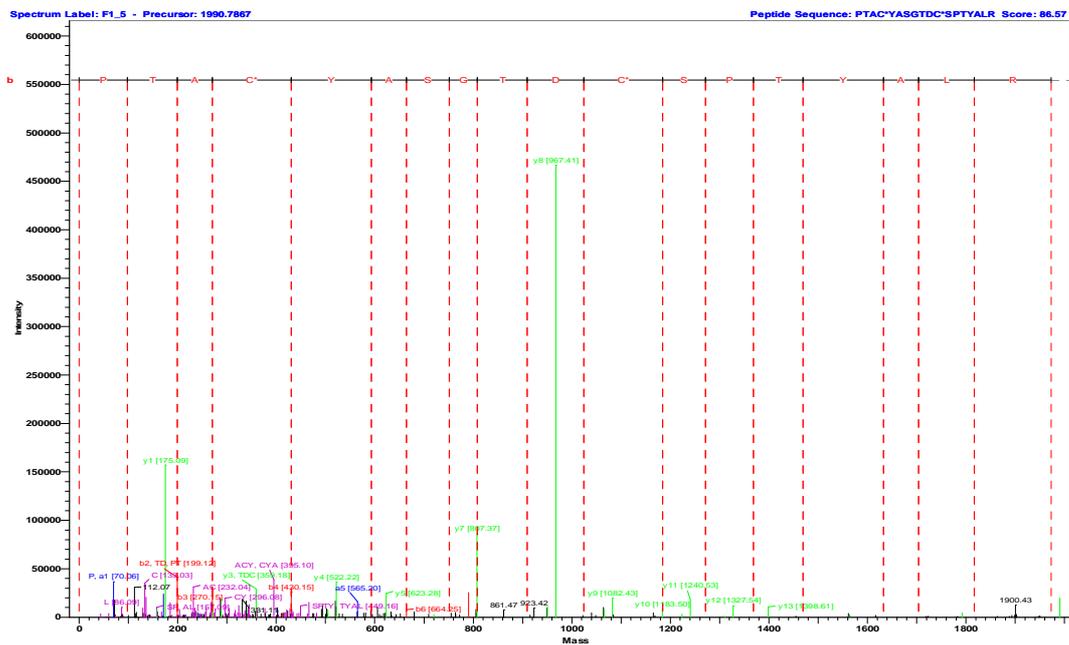
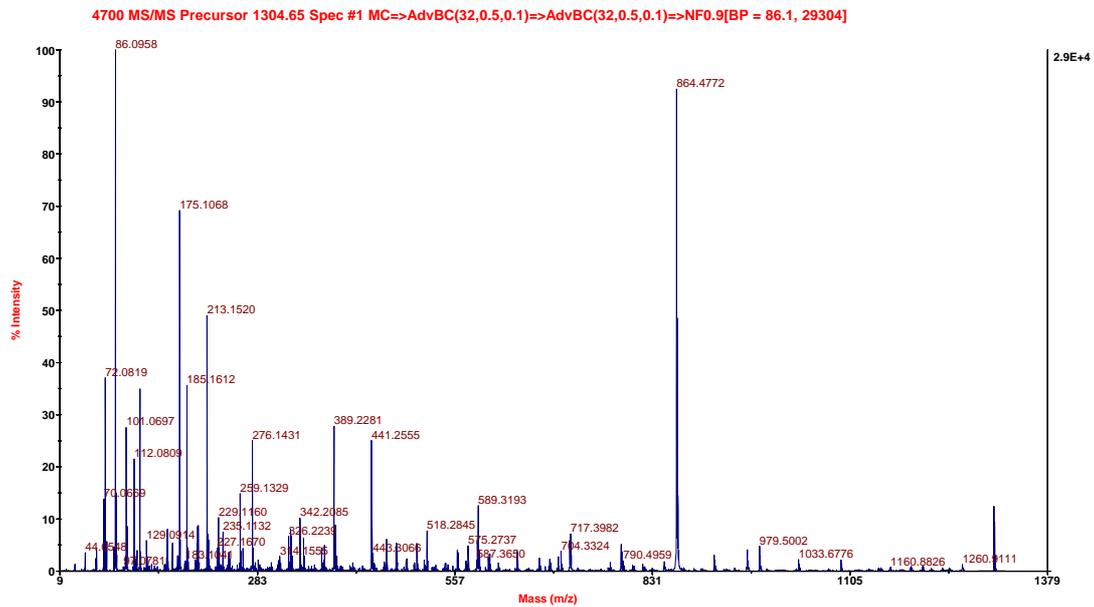


Figura 4.2.2.2-4. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 1990,85.

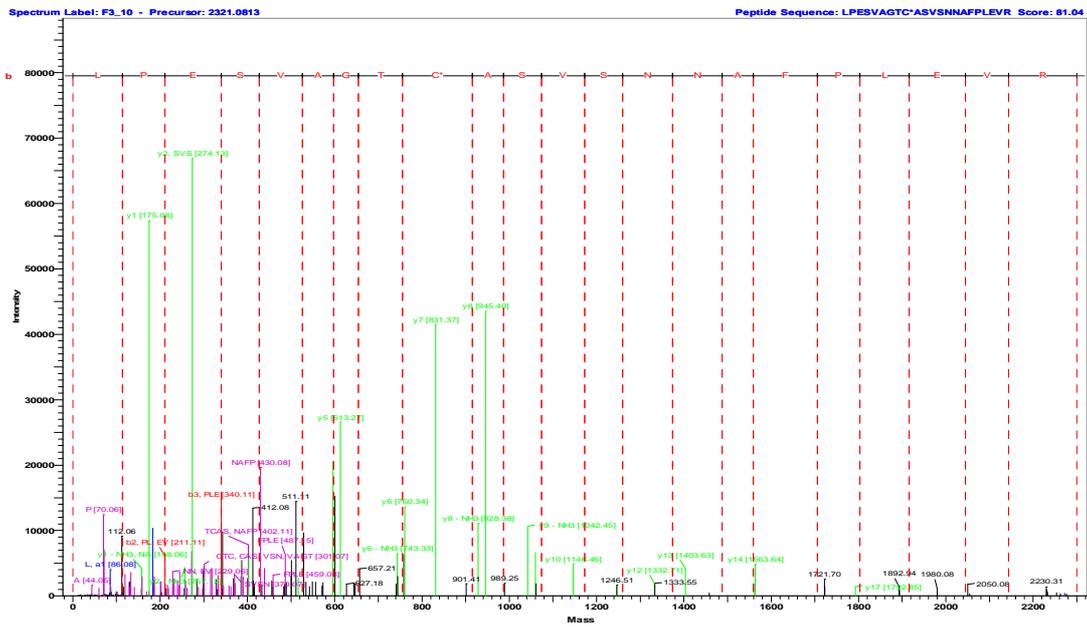
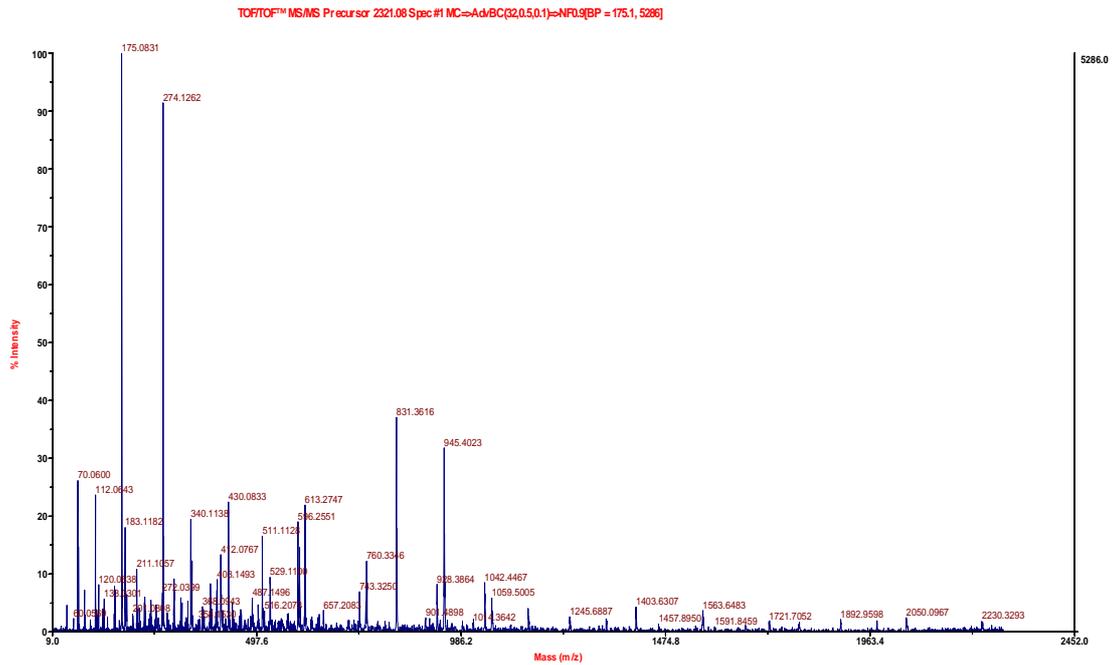


Figura 4.2.2.-5. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 2321,08.

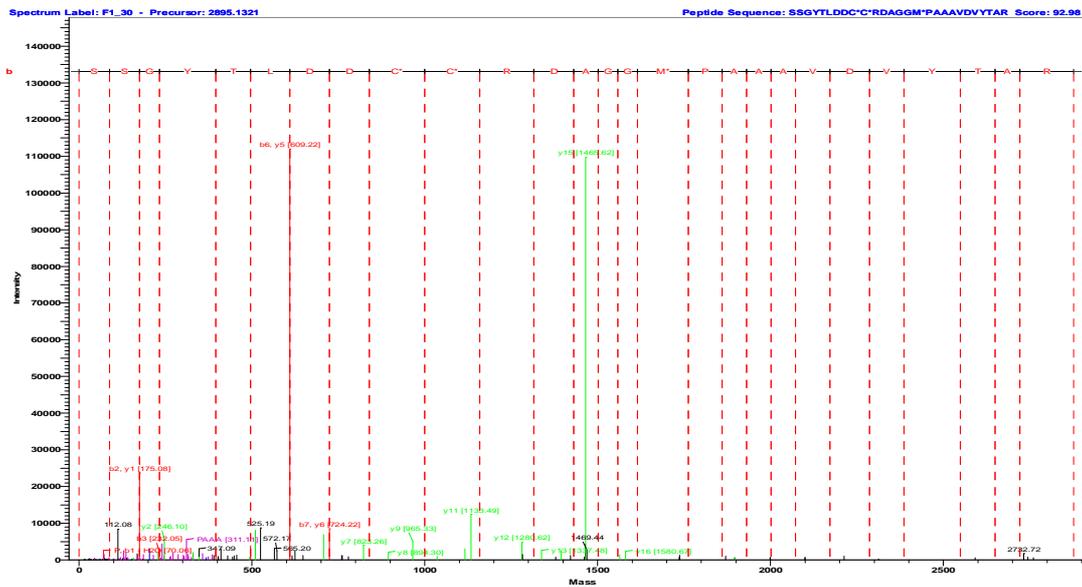
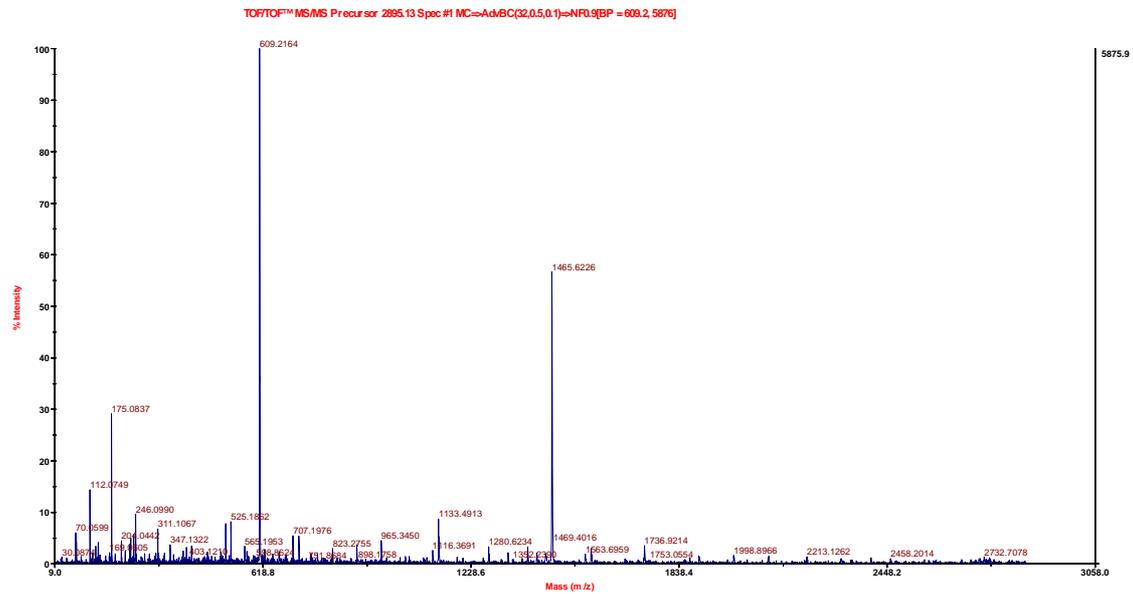


Figura 4.2.2.-6. Fragmentación peptídica y secuenciación *de novo* correspondiente al péptido con relación carga/masa (m/z) de 2895,13.

4.2.2.2.3. Identificación Proteica a partir de Bases de Datos

La búsqueda de coincidencias para la proteína problema con peso molecular de 153,461 KDa, en las diferentes bases de datos pertenecientes a los bancos de datos de proteínas, no ha aportado ningún resultado coincidente que resultara lo suficientemente significativo como para relacionarlo con alguna proteína incluida en dichas bases de datos.

Sin embargo, los resultados obtenidos con la proteína con peso molecular de 23,052 KDa, cruzando éstos con las diferentes bases de datos, han aportado una coincidencia significativa a través del banco de datos de proteínas del *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB, La Jolla, CA, USA). Cruzando los datos conjuntamente con las fracciones peptídicas de esta proteína, en todas ellas aparece una muy baja concordancia de secuenciación con el valor “2YC2 c” de dicho banco de datos, que corresponde a una pequeña GTPasa relacionada con la familia RAB, la cadena C del complejo proteico *Intraflagellar Transport Complex 25-27* (IFT25 Δ C/27) (Figura 4.2.2.2.3-1), con un peso molecular aproximado de 22,76 KDa y compuesta por un total de 208 aminoácidos. Fue puesta en evidencia por primera vez por Bhogaraju y col. (2011) a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*.

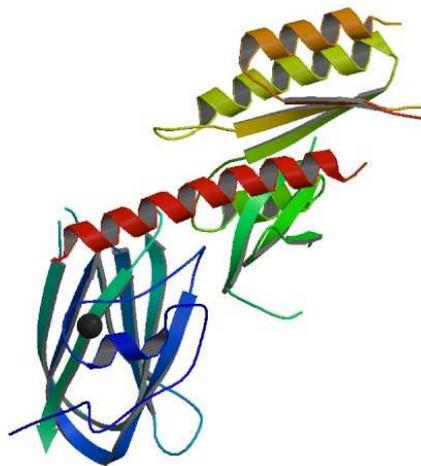


Figura 4.2.2.2.3-1. Estructura del complejo proteico IFT25 Δ C/27.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis Toxicológico

El presente trabajo pone en evidencia el riesgo toxicológico que supone la presencia de cromo trivalente en el medio acuático, el cual se presenta similar al riesgo inducido por el cromo hexavalente sobre la misma alga verde, si lo comparamos con resultados presentados en trabajos anteriores (D'ors *et al.*, 2010). La mayoría de la literatura referente a este aspecto concluye que el Cr(VI) es más tóxico que el Cr(III) (Stoecker, 2004; Munn *et al.*, 2005; Shanker *et al.*, 2005), si bien cada vez más aparecen estudios que no están de acuerdo con esta afirmación (Ksheminska *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005; Vignati *et al.*, 2008). Nuestros resultados se adecuan a esta nueva percepción sobre la toxicidad del cromo presentada por los autores antes mencionados, la cual podría estar relacionada con procesos de solubilidad en agua y con la rápida admisión del Cr(III) en el interior de las células, de acuerdo con los resultados de Brady *et al.* (1994).

Sin embargo, no aparece uniformidad en los resultados obtenidos según se estudiara la disminución del crecimiento poblacional, o de la actividad fotosintética. Nuestros resultados ponen en evidencia que dicha actividad fotosintética se ve afectada mucho antes de que la reducción del número de células en el cultivo se haga evidente. Aunque estas diferencias han sido puestas en evidencia en diferentes estudios de toxicidad sobre fitoplancton (Sánchez-Fortún *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009a; Bartolomé *et al.*, 2010), estudios anteriores con cromo hexavalente no presentaban diferencias significativas entre los valores medios de inhibición ($IC_{50(72)}$) correspondientes a inhibición de población y rendimiento cuántico fotosintético (Φ_{PSII}) (Sánchez-Fortún *et al.*, 2009b), lo que permite deducir mecanismos distintos de actuación tóxica dependientes del estado de oxidación del cromo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran diferencias significativas entre la sensibilidad exhibida por la cepa salvaje y por la tolerante a ambientes acuáticos con alta concentración de cromo trivalente. Estos resultados son acordes con aquellos obtenidos por otros autores que practicaron ensayos de toxicidad aguda, tanto con

fitoplancton marino (Kusk y Nyholm, 1992) como de agua dulce (Rojíckova y Marsálek, 1999; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009b; D'ors *et al.*, 2010), si bien existen datos en la literatura científica que ponen en evidencia la existencia de algún tipo de variabilidad entre especies algales respecto a la sensibilidad al cromo (Stauber, 1995; Peterson y Stauber, 1996).

Lo que sí parece establecido en la literatura científica es que, después de la destrucción de gran parte de una población de fitoplancton fruto de una exposición a cromo, algunas células llegan a ser capaces de crecer en un ambiente con niveles de cromo aproximadamente 25 veces superiores a aquellos capaces de destruir a la cepa salvaje (Corradi *et al.*, 1995). Estos datos son acordes a los resultados obtenidos en este trabajo, donde se han obtenido niveles de resistencia que van desde el valor de 18 veces más para el *end point* de balance de oxígeno, hasta 35 veces más si se compara con los ensayos de inhibición del crecimiento celular.

5.2. Análisis Ultraestructural

El hecho de que únicamente aquellas poblaciones algales previamente expuestas a cromo obtienen cierta resistencia a posteriores exposiciones a este metal, ha llevado a los autores a proponer que la reducción del efecto tóxico del cromo se produce por una interacción del metal sobre la superficie celular (Campbell *et al.*, 1997).

En el presente trabajo, diferencias morfológicas muy significativas, entre la cepa salvaje de *D. chlorelloides* y el clon DcCr(III)R30, pueden ser observadas mediante las técnicas de microscopía electrónica aplicadas. Estas diferencias morfológicas pueden ser explicadas por los resultados obtenidos por otros autores, los cuales han indicado que el tamaño celular evoluciona rápidamente debido a las sucesivas mutaciones beneficiosas que se extienden rápidamente en la población por selección natural (Lenski y Travisano, 1994; Elena *et al.*, 1996).

Resulta muy interesante observar que, mientras el tolerante a Cr(III) ha presentado una significativa variación respecto a la cepa salvaje, en cuanto a su forma geométrica, estudios anteriores con un clon de *D. chlorelloides* tolerante a Cr(VI) evidenciaron que

dicha variabilidad no se producía cuando se comparaba con la cepa salvaje (D'ors *et al.*, 2010). Un repaso a las tesis presentadas por diferentes autores muestra una gran variabilidad en cuanto a resultados, y así mientras algunos describen variaciones de CF en poblaciones de fitoplancton expuestas a polutantes (López-Rodas *et al.*, 2006), otros concluyen con que dichas variaciones no aparecen (Baos *et al.*, 2002; García-Villada *et al.*, 2004). Esta variabilidad de resultados hace pensar en la existencia de diferentes estrategias de estas microalgas para tolerar ambientes extremos, y en el caso concreto del cromo, la diferencia respecto a ambos estados de oxidación del metal pone en evidencia mecanismos de tolerancia diferentes en ambos casos.

Esta diferencia entre ambos queda igualmente marcada en el estudio de sus respectivas paredes celulares. Así, mientras que el clon tolerante a Cr(VI) optaba por continuos y sucesivos cambios de la pared celular, como sistema de detoxicación, el clon tolerante a Cr(III) presenta un engrosamiento de dicha pared celular. Esta diferente estrategia ya ha sido anteriormente descrita en observaciones de fitoplancton en algunos ambientes extremos (Mann *et al.*, 1988; Visviki y Santikul, 1999; Wang *et al.*, 2004), y demuestra su efectividad como barrera pasiva para limitar el transvase pasivo al interior celular.

Sin embargo, en ambos clones tolerantes, tanto a Cr(III) como a Cr(VI) se evidencia una significativa acumulación de vacuolas en el interior celular, circunstancia sobradamente conocida y relacionada con los procesos de tolerancia a metales. Las vacuolas son consideradas como el principal lugar de almacenamiento de metales, tanto en levaduras como en células vegetales (Salt *et al.*, 1995). Nuestros resultados con el clon DcCr(III)R30 están acordes con esta afirmación y con las propuestas realizadas por otros autores, las cuales llevan a la conclusión de que la compartimentación de metales en las células vegetales forma parte de los mecanismos de tolerancia para soportar ambientes extremos con altas concentraciones de metales (Tong *et al.*, 2004).

El estudio acerca de la presencia de cromo, tanto en la superficie celular como en su interior, ha puesto en evidencia la presencia del metal en ambos lugares. Este es otro punto diferencial con los resultados obtenidos en anteriores trabajos con el clon tolerante a cromo hexavalente (D'ors *et al.*, 2010), ya que en éste sólo podía ser puesto en evidencia en la superficie celular. Esta circunstancia se une a las anteriores ya

descritas para sospechar las diferencias en cuanto al mecanismo de detoxificación dependiente del estado de oxidación del metal, además de corroborar la opinión de diferentes autores de que la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X aplicada sobre muestras biológicas puede ser una buena técnica para investigar las interacciones estructurales intracelulares y los procesos fisiológicos, tales como la movilidad y almacenamiento de los metales (Heumann, 2002), procesos de detoxificación (Nassiri *et al.*, 1997), o más a nivel general los efectos derivados de procesos de contaminación ambiental (Liu y Kottke 2003 y 2004).

La presencia de precipitados en el interior del clon DcCr(III)R30 es compatible con la teoría expuesta por Gadd (1988), la cual sugiere que, una vez que los metales se encuentran en el interior celular, podrían unirse a componentes intracelulares, o bien simplemente precipitar. A partir de ello, macromoléculas biológicas y enzimas con grupos funcionales apropiados o con cofactores metálicos podrían quedar afectados por la actividad del metal. Zhang y Majidi (1994) señalaron que los metales pesados podrían ser detoxicados por acumulación en cuerpos con base de polifosfato y por unión a proteínas, tanto en organismos procariontas como en eucariotas, y otros autores han llegado a demostrar su vacuolización en éstos últimos (Gadd, 1988; Garnham *et al.*, 1992). Estos estudios podrían explicar la presencia de los precipitados que aparecen en este trabajo.

5.3. Análisis Proteómico

En toxicología ambiental, la proteómica se aplica cada vez más para la detección de cambios de expresión proteica causados por contaminantes (Bradley *et al.*, 2002; Hogstrand *et al.*, 2002; Bjørnstad *et al.*, 2006; Gomiero *et al.*, 2006). En general, los perfiles proteómicos se modifican con los procesos de estrés, y por lo tanto también deberían poner en evidencia ciertos tipos de exposición a sustancias tóxicas (Hogstrand *et al.*, 2002).

Sin embargo, la comparación entre las fracciones proteicas correspondientes a la banda proteica con peso molecular de 153,462 KDa y las correspondientes bases de datos de proteínas no ha revelado ningún tipo de coincidencia significativa, por lo que, por el

momento, no resulta posible asociar dicha banda a ninguna secuencia publicada. Futuros trabajos serán necesarios para elucidar su secuencia aminoacídica y poder así correlacionarla con alguna función en este clon tolerante a Cr(III).

Por el contrario, tras el cruce de datos entre aquellos obtenidos con la banda proteica de 23,052 KDa y los incluidos en los respectivos bancos de proteínas, se ha podido establecer una baja concordancia (Figura 5.3-1) entre ésta y la secuencia aminoacídica de una pequeña GTPasa relacionada con la familia RAB, la cadena C incluida dentro del complejo proteico *Intraflagellar Transport Complex 25-27*, identificada a partir del genoma del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, y cuyo peso molecular de 27,76 KDa (Bhogaraju *et al.*, 2011) es coincidente con el obtenido en este estudio para la banda proteica relacionada.



Figura 5.3-1. Puntos de coincidencia sobre la secuencia de la proteína GTPasa RAB, a partir de los fragmentos secuenciales obtenidos de la banda proteica de 23,052 KDa.

De las dos secuencias aminoacídicas comparadas, la correspondiente a la relación carga/masa de 2183,90 se encuentra en la zona inicial no específica, mientras que la correspondiente a 1982,00 se halla inmersa dentro del dominio conservado de la superfamilia P-Loop NTPase (Figura 5.3-2).

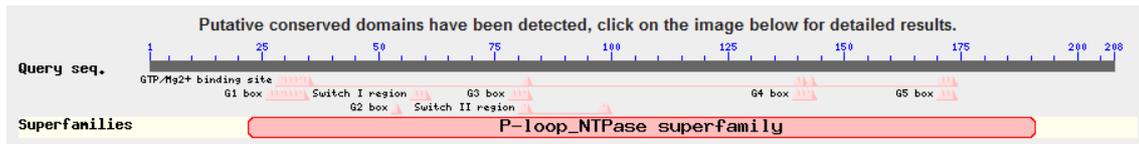


Figura 5.3-2. Dominio conservado donde se encuentra la cadena C de la GTPasa identificada, y la superfamilia proteica a la que pertenece.

La familia RAB está incluida dentro de la superfamilia P-Loop NTPase, que incluye las tres principales familias de proteínas motoras: miosinas, kinesinas y dineínas. De ellas, las kinesinas intervienen en el transporte anterógrado de vesículas, es decir, que implican un movimiento hacia la parte más distal de la célula, mientras que las dineínas emplean los mismos raíles pero dirigen las vesículas a la parte más proximal de la célula, por lo que su transporte es retrógrado (Berg *et al.*, 2002). Miembros de la familia de kinesinas han sido identificadas en la mayoría de los organismos, incluidas plantas superiores (Reddy, 2001; Reddy y Day, 2001) y algas unicelulares (Abdel-Gany *et al.*, 2005). De igual forma, proteínas pertenecientes a los grupos de kinesinas y dineínas han sido localizadas en algas unicelulares (Holzinger y Lütz-Meindl, 2003; Freshour *et al.*, 2007).

La familia RAB de GTPasas monoméricas incluye componentes centrales de la maquinaria de transporte de vesículas. La familia es sumamente compleja, con un gran número de parálogos (genes pertenecientes a una misma especie biológica que derivan de otro por duplicación) diferentes que van desde más 60 en humanos (Pereira-Leal y Seabra, 2001) o hasta 300 en *Trichomonas vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007). Las proteínas RAB regulan los distintos pasos en la red de tráfico incluyendo la formación de las vesículas desde las membranas donantes, el transporte de vesículas, y su fusión con la membrana de destino (Zerial y McBride, 2001; Grosshans *et al.*, 2006). Las relaciones evolutivas entre la familia de RAB y la especialización funcional de parálogos individuales no se conocen, pero varias subclases RAB antiguas, cada una con una función especializada, probablemente se han conservado a través de una amplia gama de organismos eucariotas (Pereira-Leal y Seabra, 2001).

Por ello, la expresión proteica obtenida puede estar íntimamente relacionada con la presencia de cromo en las paredes celulares y su transporte al interior celular, tal y

como quedó demostrado con los resultados mediante el estudio ultraestructural de las células de DcCr(III)R30. Su aparición implicaría que el flujo del metal a través de la membrana es un proceso muy dinámico en el que los compartimentos intracelulares estarían comunicados mediante estructuras túbulo-vesiculares, transportando moléculas de carga a su destino (Deneka *et al.*, 2003). Así, según lo descrito por estos autores, el transporte quedaría conformado en un compartimiento donante y navegaría a través del citoplasma hasta la organela de destino, sobre la cual se anclaría y fusionaría. Muchos de estos eventos estarían regulados por la acción conjunta entre GTPasas RAB relacionadas y sus proteínas efectoras. Las vesículas de transporte desempeñan un papel central en el tráfico de moléculas entre los diferentes compartimentos estancos de la vía secretora. Las vesículas están igualmente involucradas en el transporte del material recogido en la superficie celular, por lo que este tipo de transporte vesicular supone una importante actividad celular, responsable del tráfico molecular entre una variedad de compartimentos estancos. La selectividad de transporte, por lo tanto, es clave para mantener una organización celular funcional (Cooper, 2000).

Adicionalmente, algunos autores han establecido una relación entre estos tipos de proteínas con el fenómeno de transducción de señales, desde la membrana al interior celular, controlando una amplia gama de actividades incluyendo la defensa contra patógenos y la tolerancia a estrés, siendo cruciales para la detección y respuesta a señales ambientales (Ellis y Milles, 2001; Assmann, 2002; Agrawal *et al.*, 2003). Por tanto, esta expresión proteica, aparecida en el clon de *D. chlorelloides* tolerante a Cr(III) y que sin embargo no aparece en la cepa salvaje, podría ser una de las claves para comprender la capacidad de este clon para sobrevivir en un medio rico en este metal. Estos resultados serían compatibles con la idea establecida de que estas proteínas son la clave para comprender la regulación del transporte vesicular intracelular (Goody *et al.*, 2005).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La presencia de cromo trivalente en ambientes acuáticos de agua dulce resulta tóxico para el alga verde *Dictyosphaerium chlorelloides*, siendo así además en una magnitud similar al efecto adverso inducido por la forma hexavalente bajo las mismas circunstancias,
2. El análisis toxicológico de exposiciones a Cr(III) sobre la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* revela diferencias en el riesgo toxicológico, apareciendo mayor sensibilidad cuando se evalúa a través de la actividad fotosintética que cuando se hace por la inhibición del crecimiento celular, con un nivel de riesgo catalogado como entre “*moderadamente tóxico*” y “*poco tóxico*”, dependiendo del parámetro de valoración.
3. En los cultivos del alga verde *Dictyosphaerium chlorelloides* con una concentración de cromo trivalente incompatible con la supervivencia de estos organismos, a pesar de disminuir casi en su totalidad la población celular, algunas de ellas obtienen un grado de tolerancia que las permite sobrevivir en este ambiente extremo y generar una población estable de células de *Dictyosphaerium chlorelloides* resistentes a Cr(III), que puede ser mantenida en condiciones de laboratorio.
4. La población celular de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III) obtenida en laboratorio, es capaz de crecer en un medio con niveles de CR(III) entre 18 y 35 veces superiores al necesario para destruir completamente una población de la cepa salvaje dependiendo, al igual que el anterior, del parámetro de valoración.
5. El análisis ultraestructural de las células tolerantes a Cr(III) revela que éstas, para poder sobrevivir en este ambiente rico en cromo trivalente, ha modificado significativamente su morfología, optando por un drástico cambio geométrico de pérdida de esfericidad, engrosamiento de la pared celular y una gran vacuolización intracelular.
6. Los cambios morfológicos observados en estas células tolerantes a Cr(III) son completamente diferentes a los aparecidos en poblaciones celulares de

Dictyosphaerium chlorelloides tolerante a Cr(VI), lo que denota diferencias de estrategia de supervivencia dependientes del estado de oxidación de este metal pesado.

7. El seguimiento de la presencia de cromo por las estructuras celulares, mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, ha puesto en evidencia su distribución por todas aquellas organelas estudiadas, en forma de precipitados electrodensos acumulados en ellas, lo que supone una de las variantes de detoxicación empleada por estas células.

8. El análisis electroforético de muestras procedentes del clon de *Dictyosphaerium chlorelloides* tolerante a Cr(III), ha revelado la presencia de al menos dos bandas proteicas isoelectricamente ausentes en las muestras procedentes de la cepa salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*, con pesos moleculares de 23,052 y 153,462 KDa.

9. El análisis proteómico de la banda proteica correspondiente a la de mayor tamaño, 153,462 KDa., mediante el cruce de datos entre las secuencias de novo obtenidas en los respectivos blast y las secuencias almacenadas en los distintos bancos de datos proteicos, no ha permitido obtener ninguna concordancia, de lo que se desprende que esta proteína no ha sido aún secuenciada y por tanto se desconoce su naturaleza.

10. Por el contrario, en el análisis proteómico de la banda proteica correspondiente a la de menor tamaño, 23,052 KDa., el cruce de datos con los bancos de datos ha establecido una baja concordancia entre ésta y la secuencia de la cadena C de una pequeña GTPasa incluida en el complejo proteico *Intraflagellar Transport Complex* 25-27, identificada a partir del genoma del aga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Dicha concordancia se sustenta tanto en la similitud de peso molecular, 23,052 frente a 27,76 KDa., como en las coincidencias obtenidas comparando las secuencias a partir de los 2 polipéptidos principales obtenidos.

11. Ambas secuencias polipeptídicas se asocian con la familia proteica RAB, incluida dentro de la superfamilia P-Loop NTPasa, la cual incluye a las principales familias de proteínas motoras, apareciendo un en la zona inicial no específica, y la otra inmersa en el dominio conservado de la superfamilia. Esta expresión proteica podría estar relacionada con el paso del metal pesado desde la pared al interior celular mediante un transporte activo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-el-Monem HM, Corradi MG, Gorbi G (1998) Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environment and Experimental Botany* 40:59-66.
- Abdel-Gany I, Day IS, Simmons PK, Reddy ASN (2005) Origin and evolution of Kinesin-like calmodulin-binding protein. *Plant Physiology* 138:1711-1722.
- Adey WH, Luckett C, Smith M (1996) Purification of industrially contaminated groundwaters using controlled ecosystems. *Ecological engineering* 7:191-212.
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198-207.
- Agrawal GK, Iwahashid H, Rakwal R (2003) Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. *FEBS Letters* 546:173-180.
- Ahner BA, Price NM, Morel FMM (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proceedings of Natural Academy of Sciences* 91:8433-8436.
- Ahner BA, Kong S, Morel FMM (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* 40:649-657.
- Ahner BA, Morel FFM (1995) Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnology and Oceanography* 40:658-665.
- Aksu Z, Egretli G, Kutsal T (1998) A comparative study of copper (II) biosorption on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a packed-bed column. *Proceedings in Biochemistry* 33:393-400.
- Alberts B (1998) The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92:291-294.
- Ali-Awan M, Baig MA, Iqbal J, Aslam MR, Ijaz N (2003) Recovery of chromium (III) from tannery wastewater. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 7:5-8.

- Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A (2004) The human plasma proteome: A non-redundant list developed by combination of four separate sources. *Molecular Cell in Proteomics* 3:311-326.
- Anderson NL (2005) The roles of multiple proteomic platforms in a pipeline for new diagnostics. *Molecular Cell in Proteomics* 4:1441-1444.
- Assmann SM (2002) Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 14:S355-S373.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1988) Toxicological Profile for Chromium. Syracuse Research Corporation for U.S. Public Health Service, 135 p. (ATSDR/TP-88/10).
- Avilés C, Loza-Tavera H, Terry N, Moreno-Sánchez R (2003) Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology* 180:1-10.
- Avudainayagam S, Megharaj M, Owens G, Kookana RS, Chittleborough D, Naidu R (2003) Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 178:53-91.
- Backor M, Fahselt D, Wu CT (2004). Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Science* 167:151-157.
- Ballan-Dufrançais C, Marcaillou C, Amiard-Triquet C (1991) Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biology of the Cell* 72:103-112.
- Bamwoya LA, Rutherford LA, Henninger PA, Horne WH (1991) Toxic Contaminants in Soils and Sediments at Four Wood Preservation Facilities in Atlantic Canada. Environmental Protection, Conservation and Protection, Environment Canada, Atlantic Region, Dartmouth, N.S., 52 p. (EPS-5-AR-91-2).
- Baos RL, García-Villada L, Agrelo M, López-Rodas V, Hiraldo F, Costas E (2002) Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental

model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcóllar mine spill. *European Journal of Phycology* 37:593-600.

- Bartlett RJ, James BR (1988) Mobility and Bioavailability of Chromium in Soils. In: *Chromium in the Natural and Human Environments*, J.O. Nriagu and E. Nieboer (eds.), John Wiley & Sons, New York, NY, USA. pp. 267-304.

- Bartolomé MC, D'ors A, Pereira M, Ramírez JM, Sánchez-Fortún S (2010) Selective chromium resistance obtained by selected *Dictyosphaerium chlorelloides* strains according to its oxidation state. *Toxicology Letters*.196S:115.

- Beaubien S (1993) *Chromium in Lake Ontario: Speciation and Geochemical Cycling* Department of Earth Sciences, University of Waterloo, Waterloo, Ont., Canadá.

- Bencheikh-Latmani R, Obratsova A, Mackey MR, Ellisman MH, Tebo BM (2007) Toxicity of Cr(III) to *Shewanella* sp. Strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environmental Science and Technology* 41:214-220.

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. 5th edition. W H Freeman Co., New York,USA.

- Bhushan D, Pandey A, Choudhary MK, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2007) Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular Cell in Proteomics* 6:1868-1884.

- Bjørnstad A, Larsen BK, Skadsheim A, Jones MB, Andersen OK (2006) The potential of ecotoxicoproteomics in environmental monitoring: biomarker profiling in mussel plasma using proteinchip array technology. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 69A:77-96.

- Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology* 17:121-127.

- Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M (2004) Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nature Biotechnology* 22:1139-1145.

- Bhogaraju S, Taschner M, Morawetz M, Claire Basquin C, Lorentzen E (2011) Crystal structure of the intraflagellar transport complex 25/27. *EMBO Journal* 30:1907-1918.
- Bossio RE, Marshall AG (2002) Baseline resolution of isobaric phosphorylated and sulfated peptides and nucleotides by electrospray ionization FTICR ms: another step toward mass spectrometry-based proteomics. *Analytical Chemistry* 74:1674-1679.
- Bradley BP, Shrader EA, Kimmel DG, Meiller JC (2002) Protein expression signatures: an application of proteomics. *Marine Environmental Research* 54:373-377.
- Bradshaw RA, Burlingame AL, Carr S, Aebersold R (2006) Reporting protein identification data: The next generation of guidelines. *Molecular Cell in Proteomics* 5:787-788.
- Brady D, Letebele B, Duncan JR, Rose PD (1994) Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae. *Water SA* 20:213-218.
- Brechi LA, Tabb DL, Yates JR, Wysocki VH (2003) Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Analytical Chemistry* 75:1963–1971.
- Cagney G, Emili A (2002) De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nature Biotechnology* 20:163-170.
- California Air Resources Board (1985) Public Hearing to Consider Adoption of a Regulatory Amendment Identifying Hexavalent Chromium as a Toxic Air Contaminant, Staff Report: Initial Statement of Reasons for Proposed Rulemaking, December 1985, Sacramento, CA, USA.
- Campbell PGC, Twiss MR, Wilkinson KJ (1997) Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: Implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:2543-2554.
- Campbell JA, Yeats PA (1984) Dissolved Chromium in the St. Lawrence Estuary Estuarine, *Coastal and Shelf Science* 19:513-522.

- Cañizares-Villanueva RO, González-Moreno S, Domínguez-Bocanegra AR (2001) Growth, nutrient assimilation and cadmium removal by suspended and immobilized *Scenedesmus acutus* cultures: influence of immobilization matrix. In: Chen, F., Jiang, Y. (Eds.), *Algae and their Biotechnological Potential*. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 147-161.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteu M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315:207-212.
- Carr S, Aebersold R, Baldwin M, Burlingame AL, Clauser K, Nesvizhskii A (2004) The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Molecular Cell in Proteomics* 3:531-533.
- Cary EE (1982) Chromium in Air, Soil and Natural Waters. In: *Topics in Environmental Health 5: Biological and Environmental Aspects of Chromium*, S. Langard (ed.), Elsevier Science Publishers, New York, NY, USA pp. 49-64.
- Cassano A, Pietra LD, Drioli E (2007) Integrated membrane process for the recovery of chromium salts from tannery effluents. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 26:6825-6830.
- Cazalé AC, Clemens S (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Letters* 507:215-219.
- CCREM (1987) *Canadian Water Quality Guidelines*. The Task Force on Water Quality Guidelines of the Canadian Council of Resource and Environment Ministers, Ottawa, Ont., Canadá.

- Chakraborty AB, Berger SJ, Gebler JC (2007) Use of an integrated MS multiplexed MS/MS data acquisition strategy for high-coverage peptide mapping studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21:730-744.
- Chait BT (2006) Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science* 314:65-66.
- Chèvre N, Loepfe C, Singer H, Stamm C, Fenner K, Escher BI (2006) Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science and Technology* 40:426-435.
- Clauser KR, Baker P, Burlingame AL (1999) Role of accurate mass measurement (+/-10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical Chemistry* 71:2871-2882.
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* 18:3325-3333.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53:159-182.
- Cooper GM (2000) *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition. ASM Press, USA. 625 pp.
- Corradi MG, Gorbi G, Bassi M (1995) Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater algae *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30:106-110.
- Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, García-Villada L, Juste J, Lopez-Rodas V (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: The ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40:391-398.
- Craggs RJ, Adey WH, Jenson KR, St. John MS, Green GF, Oswald WJ (1996) Phosphorus removal from wastewater using an algal turf scrubber. *Water Science and Technology* 33:191-198.

- Cramer R, Corless S (2001). The nature of collision-induced dissociation processes of doubly protonated peptides: comparative study for the future use of matrix-assisted laser desorption/ionization on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer in proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:2058-2066.
- Cranston RE, Murray JW (1978) The Determination of Chromium Species in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta* 99:275-282.
- Crow JF, Kimura M (1970). *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York. 608 pp.
- Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, Kortan AR, Carroll PJ, Steigerwald ML, Brus LE, Winge DR (1989) Biosynthesis of cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338:596-597.
- Davidson CI, Wu YL (1989) Dry Deposition of Trace Elements", in: *Control and Fate of Atmospheric Trace Metals*, J.M. Pacyna and B. Ottar (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, UK. pp. 147-202.
- Dazy M, Béraud E, Cotelle S, Meux E, Masfaraud JF, Féraud JF (2008) Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 73:281-290.
- de Godoy LM, Olsen JV, de Souza GA, Li G, Mortensen P, Mann M (2006) Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biology* 7:R50.
- de Miranda JR, Thomas MA, Thurman DA, Tomsett AB (1990) Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Letters* 260:277-280.
- Den Dooren de Jong LE (1965) Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. *Antonie van Leeuwenhoek* 31:301-313.
- Deneka M, Neeft M, van der Sluijs P (2003) Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Critical Reviews in Biochemical and Molecular Biology* 38:121-142.
- Depledge MH, Galloway TS (2005) Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3:251-258.

- Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Romero LC, Gotor C (2001) The cytosolic *O*-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *Journal of Biology and Chemistry* 276:9297-9302.
- Domínguez MJ, Gutiérrez F, León R, Vílchez C, Vega JM, Vígara J (2003) Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:828-832.
- Dominik J, Vignati DAL, Koukal B, Pereira de Abreu MH, Kottelat R, Szalinska E, Bas B, Bobrowski A (2007) Speciation and environmental fate of chromium in rivers contaminated with tannery effluents. *Engineering in Life Sciences* 7:155-169.
- Domon B, Aebersold R (2006a). Challenges and opportunities in proteomics data analysis. *Molecular Cell and Proteomics* 5:1921–1926.
- Domon B, Aebersold R (2006b) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312:212-217.
- D'ors A, Pereira M, Bartolomé MC, López-Rodas V, Costas E, Sánchez-Fortún S (2010) Toxic effects and specific chromium acquired resistance in selected strains of *Dictyosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81:282-287.
- Dowling VA, Sheehan D (2006) Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6:5597-5604.
- Durr E, Yu J, Krasinska KM, Carver LA, Yates JR, Testa JE, Oh P, Schnitzer JE (2004) Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nature Biotechnology* 22:985-992.
- Eccles H (1999) Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *TIBTECH* 17:462-465.
- Eggen RIL, Segner H (2003) The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377:386-396.
- Eggen RIL, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, Schweigert N (2004) Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science and Technology* 38:58A-64A.

- Eggen RIL, Suter MJ-F (2007) Analytical chemistry and ecotoxicology— Tasks, needs and trends. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 70:724-726.
- el-Enany AE, Issa AA (2001) Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia Microbiology* 46:227-230.
- Elena SF, Cooper VS, Lenski RE (1996) Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. *Science* 272:1802-1804.
- Ellis BE, Miles GP (2001) One for all? *Science* 292:2022-2023.
- Ettl H, Gärtner G (1995) Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany, 721 pp.
- Fan AM (1996) Assessment of metals in drinking water with specific references to lead, copper, arsenic and selenium. In: Chang, L.W. (Ed.), *Toxicology of Metals*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 39-53.
- Fanés-Treviño I, Sánchez-Castillo P, Comas-González A (2009) Contribution to the taxonomic study of the family *Botryococcaceae* (Trebouxiophyceae, chlorophyta) in southern Spain. *Cryptogamie, Algologie* 30:17-30.
- Freshour J, Yokoyama R, Mitchell DR (2007) *Chlamydomonas* Flagellar Outer Row Dynein Assembly Protein Oda7 Interacts with Both Outer Row and II Inner Row Dyneins. *Journal of Biological Chemistry* 282:5404-5412.
- Gadd GM (1988) Accumulation of metal by microorganisms and algae. In: Rehm HJ (ed.), *Biotechnology: A complete treatise*, vol. 6B. *Special Microbial Processes*, vol. 4. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. pp. 401-433.
- Gaillard JF, Jeandel C, Michard G, Nicolas E, Renard D (1986) Interstitial Water Chemistry of the Villefranche Bay Sediments: Trace Metal Diagenesis. *Marine Chemistry* 18:233-247.
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as an algacide. *Water Research* 38:2207-2213.

- Garnham GW, Codd GA, Gadd GM (1992) Kinetic of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:270-276.
- Gaur JP, Rai LC (2001) Heavy metal tolerance in algae. In: Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer- Verlag, Berlin, pp. 363-388.
- Ge Y, El-Naggar M, Sze SK, Oh HB, Begley TP, McLafferty FW, H. Boshoff H, Barry CE (2003) Top down characterization of secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 14:253-261.
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology* 150:197-202.
- Gomiero A, Pampanin DM, Bjørnstad A, Larsen BK, Provan F, Lyng E, Andersen OK (2006) An ecotoxicoproteomic approach (SELDI-TOF mass spectrometry) to biomarker discovery in crab exposed to pollutants under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 78S:S34-S41.
- Goody RS, Rak A, Alexandrov K (2005) The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:1657-1670.
- Görg A (1993) Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: Current state. *Biochemical Society Transactions* 21:130-132.
- Greene JC, Miller WE, Debacon M, Long MA, Bartels CL (1988) Use of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and groundwater contamination caused by chromium waste. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7:35-39.
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985) Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230:674-676.

- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 84:439-443.
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 86:6838-6842.
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:11821-11827.
- Grossmann J, Roos FF, Cieliebak M, Liptak Z, Mathis LK, Muller M, Gruissem W, Baginsky S (2005). AUDENS: A tool for automated peptide de novo sequencing. *Journal of Proteome Research* 4:1768-1774.
- Gu S, Pan S, Bradbury EM, Chen X (2002) Use of deuterium-labeled lysine for efficient protein identification and peptide de novo sequencing. *Analytical Chemistry* 74:5774–5785.
- Gu S, Pan S, Bradbury EM, Chen X (2003) Precise peptide sequencing and protein quantification in the human proteome through in vivo lysine-specific mass tagging. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 14:1-7.
- Gu C, Tsapralis G, Brechi L, Wysocki VH (2000) Selective gas-phase cleavage at the peptide bond C-terminal to aspartic acid in fixed-charge derivatives of Asp-containing peptides. *Analytical Chemistry* 72:5804-5813.
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11:1153-1163.
- Han FX, Maruthi-Sridhar BB, Monts DL, Su Y (2004) Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist* 162:489-499.

- Havas HE, Hutchinson TC (1987) Aquatic Macrophytes as Biomonitors of Metals and Macronutrients in Acidic and Alkaline Ponds at the Smoking Hills, Canada. In: International Conference on Heavy Metals in the Environments. Volume II, S.E. Lindberg and T.C. Huthinson (eds.), CEP Consultants Ltd., Edinburgh, Scotland, UK. pp. 430-432.
- Hayat MA (1981) Aldehydes. In: Hayat MA (ed.) Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New York, USA. pp. 64-129
- Haydar S, Aziz JA (2007) Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT),” A Case Study of Saddiq Leather Works. Journal of Hazardous Materials 163:1076-1083.
- Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Bader G, Wojcik J, Salwinski L, Ceol A, Moore S, Orchard S, Sarkans U, von Mering C, Roechert B, Poux S, Jung E, Mersch H, Kersey P, Lappe M, Li Y, Zeng R, Rana D, Nikolski M, Husi H, Brun C, Shanker K, Grant SG, Sander C, Bork P, Zhu W, Pandey A, Brazma A, Jacq B, Vidal M, Sherman D, Legrain P, Cesareni G, Xenarios I, Eisenberg D, Steipe B, Hogue C, Apweiler R (2004) The HUPO PSI’s molecular interaction format—A community standard for the representation of protein interaction data. Nature Biotechnology 22:177-183.
- Heuillet E, Moreau A, Halpren S, Jeanne N, Puisieux-Dao S (1986) Cadmium binding to a thiol molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. Biology of the Cell 58:79-86.
- Heumann HG (2002) Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant *Armeria maritima* ssp. *halleri* by autometallography. Journal of Plant Physiology 159:191-203.
- Hirata K, Tsujimoto Y, Namba T, Ohta T, Hirayanagi N, Miyasaka H, Zenk MH, Miyamoto K (2001) Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green algae, *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Bioscience and Bioengineering 92:24-29.
- Hoffmann JP (1998) Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. Journal of Phycology 34:757-763.
- Hogstrand C, Balesaria S, Glover CN (2002) Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish

- species, the rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 133:523-535.- Holtorf H, Guitton MC, Reski R (2002) Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 89:235-249.
- Holzinger A, Lütz-Meindl U (2003) Evidence for kinesin- and dynein-like protein function in circular nuclear migration in the green alga *Pleuroterium tumidum*: digital time lapse analysis of inhibitor effects. *Journal of Phycology* 39:106-114.
 - Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1995a) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107:1067-1073.
 - Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995b) Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* 107:1059-1066.
 - Howe G, Merchant S (1992) Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 98:127-136.
 - INERIS (2005) Chrome et ses dérivés Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS, Paris.
 - ISO (2006) Water quality. Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water; Reference number: ISO 14442:2006(E), International Organization for Standardization.
 - IUCLID (1999) Chromium. International Uniform Chemical Information Database, European Commission, ISPRA.
 - Jackson MB (1988) The Dominant Attached Filamentous Algae of Lake Huron: Field Ecology and Biomonitoring Potential during 1980. *Hydrobiology* 163:149-171.
 - Janssen CR, Heijerick DG (2003) Algal toxicity tests for environmental risk assessment of metal. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 178:23-52.
 - Jayabalakrishnan RM, Aselvaseelan D (2007) Efficiency of mono and mixed columns of vermiculites for treating raw tannery effluent. *Journal of Applied Science* 7:1048- 1052.

- Jervis L, Rees-Naesborg R, Brown M (1997) Biochemical responses of the marine macroalgae *Ulva lactuca* and *Fucus vesiculosus* to cadmium and copper from sequestration to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 25:63s.
- John DM, Tsarenko PM (2002) Order Chlorococcales. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae.* (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds). Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 327-409.
- Johnson CA, Sigg L, Lindauer U (1992) The Chromium Cycle in a Seasonally Anoxic Lake. *Limnology and Oceanography* 37:315-321.
- Johnson RS, Taylor JA (2002) Searching sequence databases via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Molecular Biotechnology* 22:301-315.
- Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Müller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, Otto A (1996) Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis* 17:839-847.
- Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, Babyak L, Wójcik D, Koloczek H (2004) Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiology Research* 159:11-17.
- Kennedy S (2002) The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers* 7:269-290.
- Keough T, Youngquist RS, Lacey MP (2003) Sulfonic acid derivatives for peptide sequencing by MALDI MS. *Analytical Chemistry* 75:156-165.
- Kinter M, Sherman NE (2000) *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry.* Wiley-Interscience, New York, USA.
- Kisku GC, Barmanland SC, Bhargava SK (1999) Contamination of soil and plants with potentially toxic elements irrigated with mixed industrial effluent and its impact on the environment. *Journal of Water, Air, and Soil Pollution* 120:121-137.
- Knauer K, Behra R, Sigg L (1997) Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 33:596-601.

- Knauer K, Ahner B, Xue HB, Sigg L (1998) Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:2444-2452.
- Kneer R, Zenk MH (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* 44:69-74.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36:1202-1211.
- Kremer A, Schneider R, Terstappen GC (2005) A bioinformatics perspective on proteomics: Data storage, analysis, and integration. *Bioscience Reports* 25:95-106.
- Ksheminska H, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycky P, Koloczek H (2005) Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process in Biochemistry* 40:1565–1572.
- Kusk KO, Nyholm N (1992) Toxic effects of chlorinated organic compounds and potassium dichromate on growth rate and photosynthesis of marine phytoplankton. *Chemosphere* 25:875-886.
- Lalonde JD, Amyot M, Krapiel AML, Morel FMM (2001) Photooxidation of Hg(0) in artificial and natural waters. *Environmental Science and Technology* 35:1367-1372.
- Lantz RC, Lynch BJ, Boitano S, Poplin GS, Littau S, Tsaprailis G, Burgess JL (2007) Pulmonary biomarkers based on alterations in protein expression after exposure to arsenic. *Environmental Health Perspectives* 115:586-591.
- Laskin J, Futrell JH (2003) Collisional activation of peptide ions in FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 22:158-181.
- Lee JG, Ahner BA, Morel FMM (1996) Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology* 30:1814-1821.

- Leitner A, Lindner W (2006) Chemistry meets proteomics: The use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics. *Proteomics* 6:5418–5434.
- Lenski RE, Travisano M (1994) Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:6808-6814.
- Lindh I, Hjelmqvist L, Bergman T, Sjövall J, Griffiths WJ (2000) De novo sequencing of proteolytic peptides by a combination of C-terminal derivatization and nano-electrospray/collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 11:673-686.
- Lipton MS, Pasa-Tolic L, Anderson GA, Anderson DJ, Auberry DL, Battista JR, Daly MJ, Fredrickson J, Hixson KK, Kostandarithes H, Masselon C, Markillie LM, Moore RJ, Romine MF, Shen Y, Stritmatter E, Tolic N, Udseth HR, Venkateswaran A, Wong K-K, Zhao R, Smith RD (2002) Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. *Proceeding of the National Academy of the Sciences USA* 99:11049-11054.
- Lisacek F, Cohen-Boulakia S, Appel RD (2006) Proteome informatics II: Bioinformatics for comparative proteomics. *Proteomics* 6:5445-5466.
- Liska AJ, Shevchenko A (2003) Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics. *Trends in Analytical Chemistry* 22:291-298.
- Liu D, Kottke I (2003) Subcellular localization of chromium nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESL. *Cell Biology and Toxicology* 19:299-311.
- Liu D, Kottke I (2004) Subcellular localization of copper in root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Bioresources Technology* 94:153-158.
- Loeffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters* 258:42-46.
- López-Luna J, González-Chávez MC, Esparza-García FJ, Rodríguez-Vásquez R (2009) Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium

and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials* 163:829-834.

- López-Rodas V, Costas E, García-Villada L, Flores-Moya A (2006) Phenotypic evolution in microalgae: A dramatic morphological shift in *Dictyosphaerium chlorelloides* (chlorophyta) after exposure to TNT. *Acta Botanica Malacitana* 31:141-147.

- Ludvík J (2000) Chrome balance in leather processing, regional program for pollution control in the tanning industry in south-east Asia. United Nations Industrial Development Organization Report, US/RAS/92/120/11-51.

- MacLachy J (1992) CEPA; PSL; Metal Data from Base Metal Smelters and Refineries. Industrial Programs Branch, Environment Canada.

- Mance G (1987) *Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment*, Elsevier Applied Sciences, Publishers Ltd., London, United Kingdom 372 p.

- Mann M, Wilms M (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Analytical Chemistry* 66:4390-4399.

- Mann M, Hendrickson RC, Pandey (2001) A Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Reviews in Biochemistry* 70:437-473.

- Mann S, Mann H, Fyfe WS (1988) Intracellular aragonite crystals in the fresh-water alga, *Spirogyra* sp. *Mineralogical Magazine* 52:241-245.

- Marchese M, Gagneten AM, Parma MJ, and P. J. Pavé PJ (2008) Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55:603-609.

- Marsalek B, Rojícková R (1996) Stress factors enhancing production of algal exudates: a potential self-protective mechanism? *Zeitschrift für Naturforschung* 51:646-650.

- Marshall AG, Hendrickson CL, Stone D, Shi H (2002) Scaling MS plateaus with high resolution FT-ICRMS. *Analytical Chemistry* 74:253-259.

- Masscheleyn PH, Pardue JH, DeLaune RD, Patrick WH Jr (1992) Chromium Redox Chemistry in a Lower Mississippi Valley Bottomland Hardwood Wetland. *Environmental Science and Technology* 26:1217-1226.
- Matsunaga T, Takeyama H, Nakao T, Yamazawa A (1999) Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium polluted seawater. *Journal of Biotechnology* 70:33-38.
- McLafferty FW, Horn DM, Breuker K, Ge Y, Lewis MA, Cerda B, Zubarev RA, Carpenter BK (2001) Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 12:245-249.
- Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoréu MC, Laires A, Rueff J, Zhitkovich A (2003) Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis* 18:19–24.
- Medzihradszky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AM (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 72:552-558.
- Mehra RK, Kodati VR, Abdullah R (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215:730-736.
- Meisch HU, Schmitt-Beckmann I (1979) Influence of tri and hexavalent chromium on two *Chlorella* strains. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie Bd* 94:231-239.
- Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R, (2005) Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1706:88-97.
- Mendoza-Cózatl DG, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R, (2004) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protist and plants. *FEMS Microbiology Review* 29:653-671.

- Menezes M (2010) *Chlorophyceae*. In: Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 1. (Forzza, R.C. Eds), Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. pp. 335-352.
- Minouflet N (2008) Etude du modèle vegetal aquatique, *Elodea nuttallii* pour l'évaluation du risqué de métaux: bioaccumulation et effets biologiques. *Terre & Environnement* 76:300.
- Mitsch WJ, Wise KM (1998) Water quality, fate of metals, and predictive model validation of a constructed wetland treating acid mine drainage. *Water Research* 32:1888-1900.
- MOE (1988) Thirty Seven Municipal Water Pollution Plants Monitoring Study, Volume I: Interim Report, Volume II: Appendix 'A' - Individual Plant Reports. Prepared by Canviro Consultants for Water Resources Branch, Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Ont., Canadá.
- MOE (1991) Status Report on the Effluent Monitoring Data for the Iron and Steel Sector for the Period from November 1, 1989 to October 31, 1990. Water Resources Branch, Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Ont., Canadá. 219 p.
- Morelli E, Scarano G (2001) Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Environmental Research* 52:383-395.
- Morelli E, Scarano G, (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science* 167:289-296.
- Morris CA, Nicolaus B, Sampson V, Harwood JL, Kille P (1999) Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journal*. 338:553-560.
- Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J, Bateman RH (1996) High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10:889-896.

- Morris HR, Paxton T, Panico M, McDowell R, Dell A (1997) A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing. *Journal of Protein Chemistry* 16:469-479.
- Muenchbach M, Quadroni M, Miotto G, James P (2000) Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Analytical Chemistry* 72:4047-4057.
- Munn SJ, Allanou R, Aschberger K, Berthault F, Cosgrove O, Luotamo M, Pakalin S, Paya-Pérez A, Pellegrini G, Schwarz-Schulz B, Vegro S (2005) Chromium trioxide; sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, EUR 21508EN. European Union Risk Assessment Report, Volume 53. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities.
- Murray JW, Spell B, Paul B (1983) The Contrasting Geochemistry of Manganese and Chromium in the Eastern Tropical Pacific Ocean. In: *Trace Metal in Seawater*, NATO Conference Series 4, Marine Science, Volume 13, Plenum, pp. 643-669.
- Nagel K, Adelmeier U, Voigt J (1996) Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology* 149:86-90.
- NAS (National Academy of Sciences) (1974) Chromium. National Academy Press, Washington, DC, USA. 155 p.
- Nassiri Y, Mansot JL, Wéry J, Ginsburger-Vogel T, Amiard JC (1997) Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33:147-155.
- Nieboer E, Jusys AA (1988) Biologic Chemistry of Chromium. In: *Chromium in the Natural and Human Environments*, J.O. Nriagu and E. Nieboer (eds.), John Wiley & Sons, New York, NY, USA. pp. 21-79.
- Nielsen ML, Bennett KL, Larsen B, Moniatte M, Mann M (2002) Peptide end sequencing by orthogonal MALDI tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 1:63-71.

- Nielsen JS, Hrudey SE (1983) Metal Loadings and Removal at a Municipal Activated Sludge Plant. *Water Research* 17:1041-1052.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:730-750.
- Nomanbhay SM, Palanisamy K (2005) Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. *Electronic Journal of Biotechnology* 8:43-53.
- Nriagu JO (1988) Production and Uses of Chromium. In: *Chromium in the Natural and Human Environments*, JO Nriagu and E Nieboer (eds.), John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 125-172.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-139.
- Nriagu JO (1990) Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere. *Environment* 32:7-33.
- Nriagu JO, Beaubien S, Blowes D (1993) Chemistry of Chromium in Lakes. *Environmental Reviews* 1:104-120.
- OECD (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures; OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, n°. 23.
- Omenn GS (2004) Advancement of biomarker discovery and validation through the hupo plasma proteome project. *Disease Markers* 20:131-134.
- Ontario Hydro (1992) A Review of Ontario Hydro's MISA Monitoring Results. Prepared by W.W. Maruska, Environment Support Department, 35 p., NOCS-IR-077292-001 OUO, TISD-07291-001.
- Ortega R, Fayard B, Salomé M, Devès G, Susini J (2005) Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds. *Chemical Research in Toxicology* 18:1512-1519.

- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal* 11:3491-3499.
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-Type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 270:4721-4728.
- Oswald WJ (1988) Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, pp. 305-328.
- Outridge PM, Scheuhammer AM (1993) Bioaccumulation and Toxicology of Chromium: Implications for Wildlife. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 130:31-77.
- Paiva L, Gonçalves de Oliveira J, Azevedo RA, Ribeiro DR, Da Silva MG, Vitória AP (2009) Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr³⁺ and Cr⁶⁺. *Environment and Experimental Botany* 65:403-409.
- Papayannopoulos IA (1995) The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 14:49-73.
- Patton WF (2002) Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 771:3-31.
- Pawlik-Skowronska B (2003) When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium tenue* produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides. *Aquatic Toxicology* 62:155-163.
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skowronski T (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatin in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology* 70:201-212.
- Pawlisz AV, Kent RA, Schneider UA, Jefferson C (1997) Canadian water quality guidelines for chromium. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12:123-183.

- Peakall DB (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology* 3:157-160.
- Peña-Castro JM, Martínez-Jerónimo F, Esparza-García F, Cañizares-Villanueva RO (2004) Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metal stress. *Chemosphere* 57:1629-1636.
- Pereira M, D'ors A, Sánchez-Fortún S (2009) Influencia del pH sobre el efecto tóxico inducido en clones de *Dyctiosphaerium chlorelloides* sensibles y resistentes a cromo (VI). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*.3:22-30.
- Pereira MJ, Resende P, Azeiteiro UM, Oliveira J, Figueiredo DR (2005) Differences in the effects of metals on growth of two freshwater green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectorale* Müller. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:515–522.
- Pereira de Abreu MH (2006) Spéciation et mobilité du chrome dans les environnements aquatiques pollués par les effluents de tannerie. *Terre et Environnement* 62:1-273.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* 313:889-901.
- Pérez-Rama M, Herrero C, Abalde J, Torres E (2001) Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2061-2066.
- Perrein-Ettajani H, Amiard JC, Haure J, Renaud C (1999) Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56:1757-1765.
- Peterson SM, Stauber JL (1996) New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56:750-757.
- Pettine M, Millero FJ (1990) Chromium Speciation in Seawater: The Probable Role of Hydrogen Peroxide. *Limnology and Oceanography* 35:730-736.

- Pettine M, Millero FJ, La Noce T (1991) Chromium (III) Interactions in Seawater through its Oxidation Kinetics. *Marine Chemistry* 34:29-46.
- Pettine M, Camusso M, Martinotti W (1992) Dissolved and Particulate Transport of Arsenic and Chromium on the Po River (Italy). *Science of The Total Environment* 119:253-280.
- Phillips DR (1988) Chromium. In: *Canadian Mineral Yearbook, Mineral Resources Branch, Department of Energy, Mines and Resources, Ottawa*, pp. 20.1-20.10.
- Phillips P, Bender J, Simms R, Rodriguez-Eaton S, Britt C (1995) Manganese removal from acid coal-mine drainage by a pond containing green algae and microbial mat. *Water Sciences and Technology* 31, 161-170.
- Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, Su Q, McGrath AM, Estock MA, Parmar PP, Zhao M, Huang ST, Zhou J, Wang F, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Taylor J, Steiner S (2003) The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on twodimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 3:1345-1364.
- Pistocchi R, Mormile MA, Guerrini F, Isani G, Boni L (2000) Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* 12:469-477.
- Rai D, Eary LE, Zachara JM (1989) Environmental Chemistry of Chromium. *Science of The Total Environment* 86:15-23.
- Rai UN, Dwivedi S, Tripathi RD, Shukla OP, Singh NK (2005) Algal biomass: An economical method for removal of chromium from tannery effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:297-303.
- Rai V, Vajpayee P, Singh SN, Mehrotra S (2004) Effect of chromium accumulation on photosynthesis pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science* 67:1159-1169.
- Rao GAK, Viraraghavan T (1992) Removal of Heavy Metals at a Canadian Wastewater Treatment Plant. *Journal of Environmental Science and Health A27*:13-23.

- Rauser WE (1990) Phytochelatins. Annual Reviews of Biochemistry 59:61-86.
- Reddy ASN (2001) Molecular motors and their functions in plants. International Review of Cytology 204:97-178.
- Reddy ASN, Day IS (2001) Kinesins in the Arabidopsis genome: a comparative analysis among eukaryotes. BMC Genomics 2: 2.1–2.13.
- Renau-Piqueras J, Gómez-Pereda C, Guerri C, Sanchís R (1985) Qualitative and quantitative ultrastructural alterations in hepatocytes of rats prenatally exposed to ethanol with special reference to mitochondria, Golgi apparatus and peroxisomes. Virchows Archives A, Pathological Anatomy and Histopathology 45:237-257.
- Rijstenbil JW, Sandee A, Van Drie J, Wijnholds JA (1994) Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. FEMS Microbiology Reviews 14:387-396.
- Rijstenbil JW, Wijnholds JA (1996) HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. Marine Biology 127:45-54.
- Rijstenbil JW, Gerringa LJA (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. Aquatic Toxicology 56:115-131.
- Robinson NJ (1989a) Metal-binding polypeptides in plants. In: Shaw, A.J. (Ed.), Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 195-214.
- Robinson NJ (1989b) Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. Journal of Applied Phycology 1:5-18.
- Rojíckova R, Marsálek B (1999) Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. Chemosphere 38:3329-3338.
- Rose PD, Boshoff GA, van Hille RP, Wallace LCM, Dunn KM, Duncan JR (1998) An integrated algal sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters. Biodegradation 9:247-257.

- Rose K, Bougueleret L, Baussant T, Bohm G, Botti P, Colinge J, Cusin I, Gaertner H, Gleizes A, Heller M, Jimenez S, Johnson A, Kussmann M, Menin L, Menzel C, Ranno F, Rodriguez-Tome P, Rogers J, Saudrais C, Villain M, Wetmore D, Bairoch A, Hochstrasser D (2004) Industrialscale proteomics: From liters of plasma to chemically synthesized proteins. *Proteomics* 4:2125-2150.
- Roth KD, Huang ZH, Sadagopan N, Watson JT (1998) Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 17: 255-274.
- Rousseaux P, Navarro A, Vermande P (1989) Distribution of Seven Heavy Metals in European Household Components. In: International Conference on Heavy Metals in the Environment, J.-P. Vernet (ed.), Volume Two, Geneva CEP Consultants Ltd., Edinburgh, England. pp. 87-90.
- Rubinelli P, Siripornadulsil S, Gao-Rubinelli F, Sayre RT (2002) Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for h43 protein function in iron assimilation. *Planta* 215:1-13.
- Saleh FY, Parkerton TF, Lewis RV, Huang JH, Dickson KL (1989) Kinetics of Chromium Transformations in the Environment. *Science of The Total Environment* 86:25-41.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar-Nanda PBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chat I, Raskin I (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio-Technology* 13:468-474.
- Salt DE, Rauser W (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107:1293-1301.
- Sánchez-Fortún S, Marvá F, D'ors A, Costas E (2008) Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology* 17:229-234.
- Sánchez-Fortún S, Marvá F, Rouco M, Costas E, López-Rodas V (2009a) Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicology*.18:481-487

- Sánchez-Fortún S, López-Rodas V, Navarro M, Marvá F, D'ors A, Rouco M, Haigh-Florez D, Costas E (2009b) Toxicity and adaptation of *Dyctiosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:1901-1905.
- Santos PM, Benndorf D, Sa'Correia I. 2004. Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* 4:2640-2652.
- Sass BM, Rai D (1987) Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid solutions. *Inorganic Chemistry* 26:2228–2282.
- Satoh M, Karaki E, Kakehashi M, Okazaki E, Gotoh T, Oyama Y (1999) Heavy-metal induced changes in nonproteinaceous thiol levels and heavy-metal binding peptide in *Tetraselmis tetrathele* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 35:989-994.
- Scarano G, Morelli E (2003) Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricornutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Science* 165:803-810.
- Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1988) cDNA cloning and expression analysis of gene encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial c-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* 37:87-97.
- Schäfer HJ, Greiner S, Rausch T, Haag-Kerwer A (1997) In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amount for gamma-glutamylcysteine synthetase (γ ECS) and metallothionein (MT2). *FEES Letters* 404:216-220.
- Schilling B, Wang W, McMurray JS, Medzihradszky KF (1999) Fragmentation and sequencing of cyclic peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13:2174-2179.
- Schulz-Knappe P, Zucht HD, Heine G, Jurgens M, Hess R, Schrader M (2001) Peptidomics: The comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4:207-217.

- Schlosser A, Lehmann WD (2002) Patchwork peptide sequencing: extraction of sequence information from accurate mass data of peptide tandem mass spectra recorded at high resolution. *Proteomics* 2:524–533.
- Semple KT, Cain RB, Schmidt S (1999) Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters* 170:291-300.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31:739-753.
- She YM, Haber S, Seifers DL, Loboda A, Chernushevich I, Perreault H, Ens W, Standing KG (2001) Determination of the complete amino acid sequence for the coat protein of brome mosaic virus by time-of-flight mass spectrometry: evidence for mutations associated with change of propagation host. *Journal of Biological Chemistry* 276:20039-20047.
- Shen TT (1999) *Industrial pollution prevention*. 2nd Edition, Springer, pp. 40.
- Shen TL, Huang ZH, Laivenieks M, Zeikus JG, Gage DA, Allison J (1999) Evaluation of charge derivatization of a proteolytic protein digest for improved mass spectrometric analysis: de novo sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34:1154-1165.
- Shepard JL, Olsson B, Tedengren M, Bradley BP. 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Environmental Research* 50:337-340.
- Shevchenko A, Chernushevich I, Wilm M and Mann M (2000) De novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods in Molecular Biology* 146:1-16.
- Shevchenko A, Chernushevich I, Wilm M, Mann M (2002) De novo sequencing of peptides recovered from in-gel digested proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Molecular Biotechnology* 20:107-118.

- Shrager J, Hauser C, Chang CW, Harris EH, Davies J, McDermott J, Tamse R, Zhang ZD, Grossman AR (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiology* 131:401-408.
- Simpson RJ (2003) *Proteins and Proteomics: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Siripornadulsil S, Traina S, Verma DPS, Sayre RT (2002) Molecular Mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant and Cell* 14:2837-2847.
- Soldo D, Hari R, Sigg L, Behra R (2005) Tolerance of *Oocystis nephrocytioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquatic Toxicology* 71:307-317.
- Standeven AM, Wetterhahn KE (1991) Is there a reactive oxygen species in the mechanism of chromium(VI) carcinogenesis? *Chemical Research in Toxicology* 4:616-625.
- Stauber JL (1995) Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australian Journal of Toxicology* 1:15-24.
- Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:553-575.
- - Stoecker B (2004) Chromium. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M (Eds.), *Elements and their Compounds in the Environment*, 2nd ed, Vol2– Metals and their compounds. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 709–729.
- Stokes PM, Maler T, Riordan JR (1977) A low molecular weight copper-binding protein in a copper tolerant strain *Scenedesmus acutiformis*. In: Hemphill, D.D. (Ed.), *Trace Substances in Environmental Health*. University of Missouri Press, Columbia, pp. 146-154.
- Strasdeit H, Duhme AK, Kneer R, Zenk MH, Hermes C, Nolting HF (1991) Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 16:1129-1130.

- Sunda WG, Huntsman SA (1998) Interactions among Cu²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnology and Oceanography* 43:1055-1064.
- Tadesse IS, Isoaho SA, Green FB, Puhakka JA (2006) Lime enhanced chromium removal in advanced integrated wastewater pond system. *Bioresource Technology* 97:529-534.
- Taylor JA, Johnson RS (2001) Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73:2594-2604.
- Terry PA, Stone W (2002) Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. *Chemosphere* 47:249-255.
- Thiele DJ (1992) Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 20:1183-1191.
- Thompson SL, F.C.R. Manning FCR, McColl SM (2002) Comparison of the toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to cyanobacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69:286-293.
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004) Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science* 9:7-9.
- Torres NL, Cho K, Shibato J, Hirano M, Kubo A, Masuo Y, Iwahashi H, Jwa NS, Agrawal GK, Rakwal R (2007) Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama. *Electrophoresis* 28:4369-4381.
- Torres E, Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Abalde J (1997) Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology* 39:231-246.
- Torres E, Cid A, Herrero C, Abalde J (1998) Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology* 63:213-220.

- Torricelli E, Gorbi G, Pawlik-Skowronska B, di Toppi LS, Corradi MG (2004) Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology* 68:315-323.
- Toumi A, Nejmeddine A, El Hamouri B (2000) Heavy metal removal in waste stabilization ponds and high rate ponds. *Water Science and Technology* 42:17-21.
- Travieso L, Cañizares RO, Borja R, Benitez F, Domínguez AR, Dupeyrón R, Valiente V (1999) Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62:144-151.
- Tripathi BN, Mehta S, Amar A, Gaur JP (2006) Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere* 62:538-544.
- Tsuji N, Hirayanagi N, Okada M, Miyasaka H, Hirata K, Zenk MH, Miyamoto K (2002) Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293:653-659.
- Turbak SC, Olson SB, McFeters GA (1986) Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Research* 20:91-96.
- Unwin RD, Evans CA, Whetton AD. (2006). Relative quantification in proteomics: New approaches for biochemistry. *Trends in Biochemical Science* 31:473-484.
- USEPA (2000) Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136). Washington DC, EPA 821-B-00-004.
- USEPA (2006) Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories, Office of Water, Washington DC, EPA 822-R-06-013.
- Van Der Wel H, Morris HR, Panico M, Paxton T, North SJ, Dell A, Thomson, West CM (2001) A non-Golgi alpha 1,2-fucosyltransferase that modifies Skp1 in the cytoplasm of *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry* 276:33952-33963.
- Van Lipzig MM, Commandeur JN, de Kanter FJ, Damsten MC, Vermeulen NP, Maat E, Groot EJ, Brouwer A, Kester MH, Visser TJ, Meerman JH (2005) Bioactivation of dibrominated biphenyls by cytochrome P450 activity to metabolites with estrogenic

activity and estrogen sulfotransferase inhibition capacity. *Chemical Research in Toxicology* 18:1691-1700.

- Vande WJG, Ow DW (1999) A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *Journal of Biology and Chemistry* 274:13250-13257.

- Vande WJG, Ow DW (2001) Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt²⁺. *Molecular Microbiology* 42:29-36.

- Vandenberghe I, Kim JK, Devreese B, Hacisalihoglu A, Iwabuki H, Okajima T, Kuroda S, Adachi O, Jongejan JA, Duine JA (2001) The covalent structure of the small subunit from *Pseudomonas putida* amine dehydrogenase reveals the presence of three novel types of internal cross-linkages, all involving cysteine in a thioether bond. *Journal of Biological Chemistry* 276:42923-42931.

- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (1999) AtPCSI, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:7110-7115.

- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *Journal of Biology and Chemistry* 275:31451-31459.

- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis *Journal of Biology and Chemistry* 279:22449-22460.

- VerBerkmoes NC, Bundy JL, Hauser L, Asano KG, Razumovskaya J, Larimer F, Hettich RL, Stephenson JL (2002) Integrating 'top-down' and 'bottom-up' mass spectrometric approaches for proteomic analysis of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Proteome Research* 1:239-252.

- Vernay P, Gauthier-Moussard C, Jean L, Bordas F, Faure O, Ledoigt G, Hitmi A (2008) Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere* 72:763-771.

- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biology and Chemistry* 276:8469-8474.
- Vignati DAL, Beye ML, Dominik J, Klingemann AO, Filella M, A. Bobrowski A, Ferrari BJD (2008) Temporal decrease of trivalent chromium concentration in a standardized algal culture medium: experimental results and implications for toxicity evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80:305-310.
- Vignati DA, Dominik J, Beye ML, Pettine M, Ferrari BJ (2010) Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: a paradigm to revise? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:743-749.
- Visviki I, Santikul D (1999) The pH Tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38:147-151.
- Walsh AR, O'Halloran J (1996) Chromium speciation in tannery effluent - II. Speciation in the effluent and receiving estuary. *Water Research* 30:2401-2412.
- Wang SB, Hu Q, Sommerfeld M, Chen F (2004) Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Proteomica* 4:692-708.
- Warner JE, Solomon KR (1990) Acidity as a factor in leaching of copper, chromium and arsenic from CCA treated dimension lumber. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:1331-1337.
- Warren G, Schultz P, Bancroft D, Bennet K, Abbott EH, Rogers S (1981) Mutagenicity of a series of hexacoordinate chromium(III) compounds. *Mutation Research* 90:111-118.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16:1090-1094.
- Wattenberg A, Organ AJ, Schneider K, Tyldesley R, Bordoli R, Bateman RH (2002) Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-

of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 13:772-783.

- Webber MD, Shames A (1987) Heavy Metals Concentration in Halton Region Soils: An Assessment for Future Municipal Sludge Utilization. *Canadian Journal of Soil Sciences* 67:893-903.

- White C, Sayer JA, Gadd GM (1997) Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiology Reviews* 20:503-516.

- Wilkins MR, Sanchez J-C, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 17:830-838.

- Wilms M, Shevchenko A, Houthaev T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379:466-469.

- Witzmann FA, Fultz C, Lipscomb J (1995) Comparative 2D-electrophoretic mapping of human and rodent hepatic stress proteins as potential biomarkers. *Applied and Theoretical Electrophoresis* 5:113-117.

- Wu L, Han DK (2006) Overcoming the dynamic range problem in mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Expert Reviews in Proteomics* 3:611-619.

- Wu JT, Hsieh MT, Kow LC (1998) Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *Journal of Phycology* 34:113-117.

- Wysocki VH, Tsaprailis G, Smith, LL and L.A. Breci LA (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* 35:1399-1406.

- Xiang CB, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ (2001) The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* 126:564-574.

- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:107-117.

- Zhang W, Majidi V (1994) Monitoring the cellular response of *Stichococcus bacillaris* to exposure of several different metals using in vivo ³¹P NMR and other spectroscopic techniques. *Environmental Science and Technology* 28:1577-1581.
- Zhang W, Krutchinsky AN, Chait BT (2003) De novo peptide sequencing by MALDI-quadrupole-ion trap mass spectrometry: a preliminary study. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 14:1012-1021.
- Zhang X, Luo S, Yang Q, Zhang H, Li J (1997) Accumulation of uranium at low concentration by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Applied Phycology* 9:65-71.
- Zhao B, Poh CL (2008) Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics* 8:874-881.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N (1999a) Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiology A* 119:73-79.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing c-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology B* 121:1169-1177.
- Zubarev R, Mann M (2007) On the proper use of means accuracy in proteomics. *Molecular Cell Proteomics* 6:377-381.