

Interacciones microbianas con metales pesados

C Cervantes, * AE Espino-Saldaña, ** F Acevedo-Aguilar, *** IL León-Rodríguez, ** ME Rivera-Cano, ** M Avila-Rodríguez, *** K Wróbel-Kaczmarczyk, *** K Wróbel-Zasada, *** JF Gutiérrez-Corona, ** JS Rodríguez-Zavala, **** R Moreno-Sánchez****

RESUMEN. Los organismos vivos se encuentran expuestos en la naturaleza a los metales pesados, comúnmente presentes en sus formas ionizadas. Estos iones ejercen diversos efectos tóxicos sobre los microorganismos. A la vez, la exposición a los metales selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de tolerar sus efectos nocivos. Se han identificado variados y eficientes mecanismos de resistencia en diversas especies de bacterias, protistas y hongos. El estudio de las interacciones de los microorganismos y los metales puede ser útil para el entendimiento de las relaciones de los metales tóxicos con organismos superiores como mamíferos y plantas. Algunos sistemas microbianos de tolerancia a metales tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos, o la recuperación de metales valiosos. En este trabajo se presentan algunos ejemplos de las interacciones de los metales con distintos tipos de microorganismos, que se relacionan tanto con aspectos de investigación básica como con posibles aplicaciones prácticas.

Palabras clave: Bacterias, hongos, protistas, metales pesados, resistencia, biorremediación.

ABSTRACT. Living organisms are exposed in nature to heavy metals, commonly present in their ionized species. These ions exert diverse toxic effects on microorganisms. Metal exposure both selects and maintains microbial variants able to tolerate their harmful effects. Varied and efficient metal resistance mechanisms have been identified in diverse species of bacteria, fungi and protists. The study of the interactions between microorganisms and metals may be helpful to understand the relations of toxic metals with higher organisms such as mammals and plants. Some microbial systems of metal tolerance have the potential to be used in biotechnological processes, such as the bioremediation of environmental metal pollution or the recovery of valuable metals. In this work we analyze several examples of the interactions of different types of microbes with heavy metals; these cases are related either with basic research or with possible practical applications.

Key words: Bacteria, fungi, protists, heavy metals, resistance, bioremediation.

Expulsión de metales pesados en bacterias

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005). Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. En este trabajo sólo se considerarán los mecanismos de expulsión. Con la disponibilidad de las secuencias de genomas completos, se cuenta actualmente con una gran cantidad de información sobre los genes que codifican transportadores de metales pesados, muchos de ellos caracterizados a los niveles bioquí-

mico y estructural. La Tabla 1 resume los sistemas bacterianos de expulsión de iones inorgánicos tóxicos cuyos mecanismos se conocen y cuyos detalles se analizarán a continuación.

Sistemas de expulsión de cationes

Entre ellos se encuentran los sistemas que expulsan iones derivados de cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y zinc. Se han identificado tres tipos principales de sistemas de expulsión (Nies, 2003) y se presentan en orden de su complejidad:

- i) Los facilitadores de difusión de cationes (CDF) son proteínas que se encuentran distribuidas en los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya). Generalmente transportan zinc pero también pueden expulsar otros cationes como cadmio, cobalto, níquel e incluso hierro (Haney et al., 2005; Tabla 1). Las proteínas CDF son polipéptidos de tamaño mediano (menos de 400 residuos) que poseen seis segmentos transmembranales (STM), funcionan como homodímeros en la membrana interna, y expulsan los sustratos al espa-

* IIQB, Universidad Michoacana, Morelia, Mich.

** IIBE, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto.

*** IIC, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto.

**** Dpto. de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F.

Tabla 1. Sistemas bacterianos que expulsan iones inorgánicos tóxicos.

Gen/operón	Iones transportados	Mecanismo de expulsión
<i>arsAB</i>	AsO ₂ ⁻	ATPasa
<i>arsB</i>	AsO ₂ ⁻	Quimiosmótico
<i>cadA</i>	Cd ²⁺	ATPasa tipo P
<i>chrA</i>	CrO ₄ ²⁻	Quimiosmótico
<i>copA</i>	Cu ⁺	ATPasa tipo P
<i>cusCFBA</i>	Cu ⁺	Quimiosmótico, RND
<i>CzcCBA</i>	Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	Quimiosmótico, RND
<i>czcD</i>	Cd ²⁺	Quimiosmótico, CDF
<i>nccCBA</i>	Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	Quimiosmótico, RND
<i>pbrA</i>	Pb ²⁺	ATPasa tipo P
<i>silCBA</i>	Ag ⁺	Quimiosmótico, RND
<i>silP</i>	Ag ⁺	ATPasa tipo P
<i>zitA</i>	Zn ²⁺	ATPasa tipo P
<i>zitB</i>	Zn ²⁺	Quimiosmótico, CDF

cio periplásmico. El transporte de los iones se asocia con un proceso quimiosmótico que involucra el intercambio con protones en el cual participan residuos de histidina, aspartato y glutamato. El prototipo de este grupo de transportadores es la proteína CzcD, identificada en un plásmido de la β -proteobacteria hipertolerante a metales *Cupriavidus metallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus*).

- ii) Las ATPasas tipo P constituyen una superfamilia de transportadores de metales que son energizadas por la hidrólisis del ATP (Solioz et al., 1994). Como las proteínas CDF, las ATPasas tipo P (llamadas así porque el γ -fosfato liberado en la hidrólisis del ATP se une en forma covalente a la enzima) están ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida y sus sustratos son iones como H⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu⁺, Ag⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺. Este tipo de ATPasas se localizan en la membrana interna y pueden transportar iones hacia el interior celular, comúnmente iones fisiológicos como Mg²⁺, o bien funcionar como sistemas de expulsión, removiendo metales tóxicos al espacio periplásmico. Al igual que los transportadores CDF, estas ATPasas deben asociar su función con proteínas de la membrana externa (por ejemplo, las porinas) para lograr expulsar el sustrato tóxico hasta el exterior celular. Los miembros del enorme grupo de ATPasas tipo P involucradas en el transporte de metales pesados poseen una prolina precedida o seguida de una cisteína; este motivo (CPx) es esencial para su función. Estas ATPasas son proteínas con más de 700 residuos formadas por seis STM, una gran región citoplásmica que une el ATP, y varias parejas de cisteínas que atrapan a los metales que han de ser expulsados. ATPasas CPx que transportan cobre, por ejemplo, se relacionan con

las severas enfermedades humanas de Menkes y de Wilson. En bacterias, la ATPasa tipo P más estudiada es la proteína CadA codificada en un plásmido de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, *C. metallidurans* es notable al poseer en su genoma los genes para 10 ATPasas tipo P que, en conjunto, participan en la homeostasis, o en la resistencia, a cadmio, cobre, plomo y zinc. Otros grupos bacterianos como cianobacterias, micobacterias o *Rhizobium* albergan también un gran número de ATPasas de metales en sus genomas.

- iii) El tercer grupo de proteínas involucradas en la expulsión de metales está formado por los transportadores de la familia RND, denominada así porque sus miembros participan en procesos de resistencia, nodulación y división celular en diferentes especies bacterianas (Saier, 2003). A diferencia de los dos tipos de transportadores anteriores, estas proteínas sólo se han identificado en bacterias, donde constituyen una gran superfamilia. Se trata de proteínas de alrededor de 1,000 residuos presentes en la membrana interna, que expulsan compuestos de índole diversa. Las proteínas RND que participan en la expulsión de metales comúnmente se asocian con una pareja de polipéptidos auxiliares: una proteína pequeña de la membrana externa y una proteína periplásmica que une (o fusiona) a las membranas interna y externa (Paulsen et al., 1996). El complejo se encuentra en la membrana como un multímero formado probablemente por tres copias de cada proteína. En *C. metallidurans* la asociación se presenta desde el nivel genético: los genes que codifican las proteínas CzcC, B y A forman un operón (por ello, la familia se conoce también como de transportadores CBA, para distinguirla de las ATPasas ABC). El enorme complejo proteico funciona como una eficiente bomba de expulsión que transporta los iones tóxicos desde el citoplasma hasta el exterior de la célula bacteriana (a diferencia de los otros sistemas de expulsión que sólo translocan su sustrato al espacio periplásmico). Como ocurre con las proteínas CDF, los transportadores CBA funcionan como antiportadores quimiosmóticos de cationes y protones. El sistema CzcCBA de *Cupriavidus* es capaz de expulsar cadmio, zinc y cobalto, pero se conocen ejemplos de complejos RND de otras especies bacterianas que transportan níquel, cobalto, plata o cobre (Tabla 1).

Sistemas de expulsión de aniones

En este grupo se encuentran los transportadores que expulsan a los oxianiones derivados de arsénico y de cromo e incluyen tanto sistemas quimiosmóticos como relacionados con ATPasas.

- i) El metaloide arsénico puede formar dos tipos de oxianiones: arsenito (AsO_2^- , la forma más tóxica) y arsenato (AsO_4^{3-}). El primer ejemplo de un sistema de expulsión de arsenito es el operón *arsABC* codificado en un plásmido de *Escherichia coli*. El arsenito es expulsado por un complejo formado por ArsB, una proteína de la membrana interna de alrededor de 400 residuos y 12 STM, y ArsA, una proteína hidrofílica asociada con la membrana y con actividad de ATPasa. ArsA proporciona la energía para el transporte de arsenito y no posee similitud de secuencia con las ATPasas tipo P ni con las ATPasas tipo ABC (Mukhopadhyay et al., 2002). El mecanismo de tolerancia se completa con una pequeña proteína adicional, ArsC, que es una arsenato reductasa que transforma el arsenato en arsenito, el cual puede ahora ser expulsado por el complejo ArsAB. De esta forma, el sistema *ars* confiere resistencia a ambos oxianiones. Se conocen numerosos homólogos del operón *ars* en diversas especies bacterianas, presentes tanto en plásmidos como en cromosomas (Mukhopadhyay et al., 2002). Muchos de estos operones carecen del gen para la ATPasa ArsA y, en estos casos, el transportador ArsB es capaz de expulsar el arsenito impulsado por el potencial eléctrico transmembranal generado por la cadena respiratoria (Mukhopadhyay et al., 2002). Este es el único sistema de expulsión de iones inorgánicos tóxicos que puede funcionar de manera dual: impulsado por la hidrólisis del ATP o por un proceso quimiosmótico (Tabla 1).
- ii) El sistema de expulsión del oxianión tóxico cromato (CrO_4^{2-}) se identificó inicialmente en plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* y de *C. metallidurans* que codifican la proteína ChrA (Cervantes et al., 2001). Esta proteína expulsa el cromato del citoplasma en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Pimentel et al., 2002). ChrA es parecida a ArsB en tamaño, topología y mecanismo de acción (cuando ésta no se asocia con la ATPasa), aunque no comparten similitud en sus secuencias de aminoácidos. Actualmente se reconocen docenas de homólogos de ChrA, plasmídicos y cromosómicos, que constituyen a la familia de transportadores CHR (Nies et al., 1998), aunque su participación en la expulsión de cromato sólo se ha demostrado en las proteínas de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans*. Las proteínas ChrA, como ocurre con miembros de otras familias de transportadores, surgieron de la duplicación de un gen ancestral que codificaba sólo seis STM (Nies et al., 1998). Mediante mutagénesis se encontró que la mayoría de los aminoácidos esenciales para la función de ChrA de *P. aeruginosa* se localizan en la mitad amino terminal (Aguilera et al., 2004), sugiriendo que los dominios amino y carboxilo terminales tienen funciones distintas en la expulsión del cromato. El análisis filogenético de la familia CHR apoya esta hipótesis al mostrar que la secuencia de aminoácidos de la mitad amino se encuentra más conservada que la de la mitad carboxilo (Díaz-Pérez et al., en preparación).

Mecanismos de interacción con cromato y potencial biotecnológico de cepas fúngicas nativas de desechos industriales

Diversos compuestos de cromo son contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras. En la naturaleza los estados más estables del cromo son el Cr(III) y el Cr(VI); este último es altamente tóxico para diferentes organismos, en los que puede inducir alteraciones genéticas (Katz y Salem, 1993). El Cr(VI) usualmente se encuentra en forma de los iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), los cuales atraviesan fácilmente las membranas biológicas. El Cr(III) se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, los cuales son insolubles a pH cercano a 5.5; el Cr(III) frecuentemente se encuentra unido a materia orgánica en suelos y ambientes acuáticos. El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr(III); esta transformación es más rápida en ambientes ácidos (McGrath and Smith, 1990).

Mecanismos de interacción con cromato en hongos

La influencia negativa de la acumulación de metales sobre las poblaciones de microorganismos del suelo ha sido ampliamente descrita, así como la consecuente aparición de poblaciones de organismos adaptados (resistentes) al ambiente hostil.

Los mecanismos microbianos de interacción con cromato son de interés básico y de importancia biotecnológica, en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías para la biorremediación de sitios contaminados con dicho ión. En el caso de los hongos, dichos mecanismos incluyen: a) los sistemas de transporte e incorporación (bioacumulación); b) la interacción y unión con componentes de la superficie celular (biosorción); y c) la transformación química (reducción). De estos procesos la biosorción es en el que más se han centrado los estudios, de modo que se

han descrito cepas de hongos filamentosos con excelentes capacidades para la remoción de cromo (Park et al., 2005; Ahmad et al., 2006; Srivastava y Thakur, 2006). Los reportes sobre hongos con capacidad de reducir el Cr(VI) son escasos; dichos organismos incluyen levaduras como *Candida utilis* (Muter et al., 2001), *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez et al., 2004) y hongos filamentosos como *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* (Espino - Saldaña, 2002).

Eliminación de Cr(VI) empleando cepas de hongos reductoras de cromato

En esta comunicación se presentan estudios de caracterización de las cepas de hongos filamentosos resistentes a cromato Ed8 de *Aspergillus sp* y H13 de *Penicillium sp*, las cuales fueron descritas en un estudio previo (Espino-Saldaña, 2002). Estas cepas son nativas de desechos industriales y poseen la capacidad de dis-

minuir de manera eficiente los niveles de Cr(VI) del medio de crecimiento.

La cuantificación del Cr(VI) en los cultivos de ambas cepas indicó que a las 72 h de incubación los niveles del mismo en el medio disminuyeron en más del 90%; en ese mismo periodo, los niveles de cromo total permanecieron sin cambios respecto del nivel presente al principio del experimento. Esta observación sugirió que estaba ocurriendo la conversión del Cr(VI) en una especie reducida; como se muestra en la Figura 1, en función del tiempo ocurrió una disminución en los niveles de Cr(VI) y un concomitante incremento en los niveles de Cr(III).

Dado que se ha descrito que algunos aislados de *Aspergillus* poseen la capacidad de atrapar cromo en su biomasa de manera eficiente ((Park et al., 2005; Ahmad et al., 2006; Srivastava y Thakur, 2006), fue de interés realizar la determinación del cromo presente en la biomasa de las cepas Ed8 y H13. Los resultados mostraron que menos del 1% del cromo total presente en el medio fue atrapado por la biomasa de ambas cepas. En su conjunto, estas observaciones indican que las cepas Ed8 y H13 poseen la capacidad de transformar químicamente el Cr(VI) en Cr(III) y que, al parecer, dicha transformación ocurre en el exterior de las células.

Cuando se investigó el efecto de la fuente de carbono sobre la capacidad de reducción del Cr(VI) por las cepas Ed8 y H13, los resultados indicaron que la reducción de

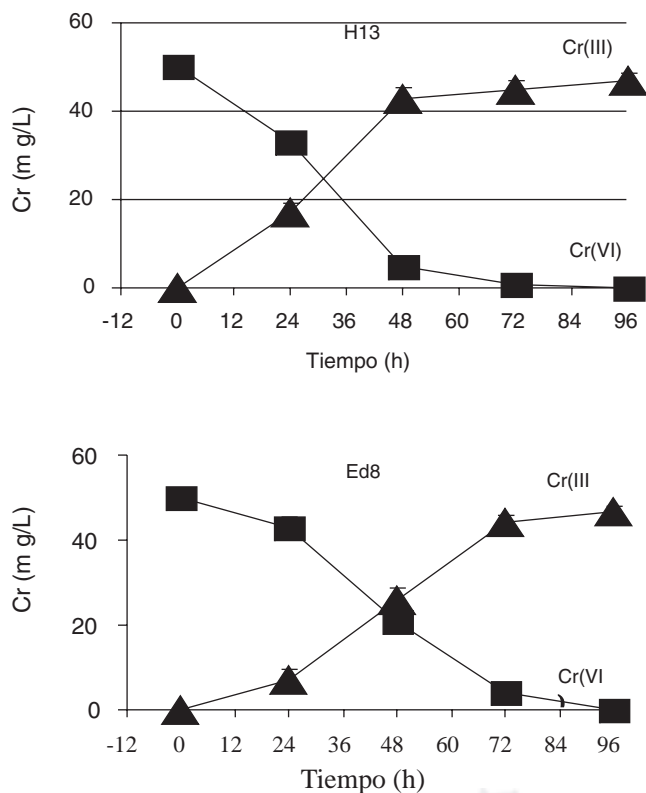


Figura 1. Disminución de Cr(VI) y producción de Cr(III) en el medio de cultivo de las cepas de hongos filamentosos H13 y Ed8. La biomasa micelial se obtuvo por cultivo en medio mínimo durante 48 h y se transfirió al mismo medio suplementado con 50 µg/ml de Cr(VI). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas del medio y se determinó la concentración de Cr(VI) con difenilcarbazida, el Cr total por absorción atómica (Greenberg et al., 1981) y el Cr(III) por un procedimiento de especiación analítica (Wrobel et al., 1997).

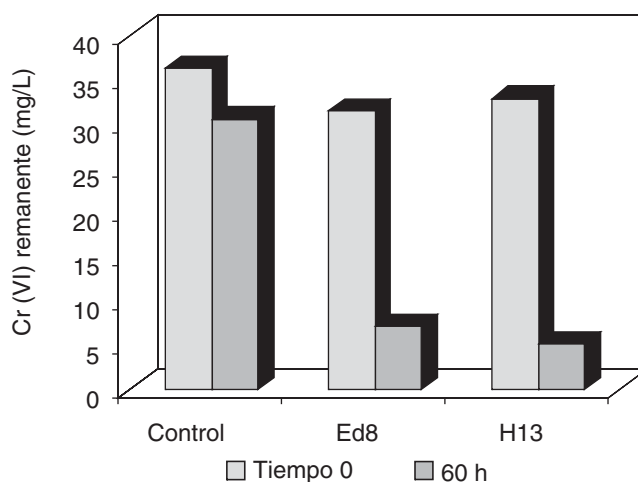


Figura 2. Disminución de la concentración de Cr(VI) en muestras de suelo contaminado empleando la biomasa de las cepas de hongos filamentosos Ed8 y H13. Las muestras de suelo contaminado se mezclaron con suelo comercial, ajustando a una concentración de 50 µg Cr(VI)/g de suelo. Las mezclas se suspendieron en medio mínimo y se incubaron con la biomasa de las cepas Ed8 y H13. A las 60 h se determinó el contenido de Cr(VI) y de Cr total en el sobrenadante. Paralelamente, se realizó una determinación control usando mezclas de suelo que no fueron incubadas con la biomasa.

Cr(VI) ocurre de manera más eficiente en el medio con glucosa que con glicerol; en medio sin fuente de carbono no ocurrió reducción. Estas observaciones sugieren que la reducción del Cr(VI) en los cultivos de las cepas Ed8 y H13 resulta de procesos metabólicos basados en el poder reductor de la fuente de carbono. Los resultados obtenidos al analizar el medio de cultivo de la cepa Ed8 mediante cromatografía de gases, indicaron que ocurren cambios importantes en la producción de algunos ácidos orgánicos y de otros compuestos cuya identificación está en proceso. Esta información será de relevancia para determinar la(s) ruta(s) metabólicas implicada(s) en la producción de moléculas probablemente involucradas en la capacidad reductora del Cr(VI) en la cepa de *Aspergillus*.

Con el fin de conocer si las cepas Ed8 y H13 son capaces de remover el Cr(VI) presente en muestras de desechos industriales, la biomasa de éstas se mezcló con muestras de

suelo contaminado que contienen Cr(VI) procedentes de un tiradero a campo abierto. Este sitio fue previamente reportado por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Profepa) y se utilizó como fuente para el aislamiento de las cepas Ed8 y H13 (Espino-Saldaña, 2002). Para estos ensayos, el suelo contaminado, se mezcló con tierra comercial para ajustar la concentración de Cr(VI) a 50 µg/g. La Figura 2 muestra que después de 60 h de incubación la concentración de Cr(VI) disminuyó en 80% y 60% en las mezclas con las cepas Ed8 y H13, respectivamente. En el experimento control sin biomasa la disminución fue de sólo un 25%, la cual se debe posiblemente a la flora microbiana endógena o a compuestos reductores de Cr(VI) presentes en las muestras. Estas observaciones indican que las cepas Ed8 y H13 poseen potencial biotecnológico para ser utilizadas en procedimientos de remoción del Cr(VI) presente en suelos contaminados o en efluentes industriales.

Mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en el protista *Euglena gracilis*

El protista unicelular flagelado de vida libre *Euglena gracilis* puede proliferar en presencia de concentraciones altas de metales pesados (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , CrVI) (Navarro et al., 1997; Devars et al., 2000; Cervantes et al., 2001). Además, este protista puede cultivarse de manera autótrofa o heterótrofa, utilizando una extensa variedad de fuentes de carbono (glucosa, lactato, glutamato, malato, etanol, acetato) y en un amplio margen de valores de pH (3.0 a 8.0) (Kempner, 1982; Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003; Rodríguez-Zavala et al., 2006). En inventarios de cuerpos de agua que reciben el drenaje ácido de la actividad minera se han detectado de 24 a 76 especies de algas y protozoarios, siendo *Euglena mutabilis* la especie más abundante (Hargreaves et al., 1975; Casiot et al., 2004). En un muestreo de efluentes industriales, la única especie fotosintética detectada fue *E. gracilis* (Hargreaves et al., 1975).

Mecanismos moleculares de resistencia a cadmio

A diferencia de las bacterias, los mecanismos de resistencia en *E. gracilis* involucran la acumulación intracelular del metal, en cepas de laboratorio tanto fotosintéticas (Mendoza-Cózatl et al., 2002) como adaptadas a la oscuridad (Avilés et al., 2003). Se han identificado y caracterizado dos de los mecanismos de acumulación e inactivación de Cd^{2+} en *E. gracilis*: (i) la unión del metal por moléculas

quelantes, principalmente compuestos con grupos tiol (cisteína-Cys, glutatión-GSH, fitoquelatinas-FQs) (Mendoza-Cózatl et al., 2005); (ii) la compartimentalización del metal libre o de sus complejos con grupos tioles en cloroplastos (Mendoza-Cózatl et al., 2002; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005) y mitocondrias (Avilés et al., 2005), pues, a diferencia de levaduras y plantas, *E. gracilis* carece de vacuola. Un tercer mecanismo de acumulación aún no bien caracterizado involucra la producción de otros grupos de quelantes como los ácidos orgánicos (malato, glutamato, citrato), el fosfato y el pirofosfato (Avilés et al., 2003, 2005). El pretratamiento de *E. gracilis* con altas concentraciones de Cd^{2+} (20-50 µM) genera una cepa resistente a Cd^{2+} , a Zn^{2+} y a Co^{2+} , pero mediante la disminución en la capacidad de captación del metal. Este último tipo de mecanismos carece de interés biotecnológico, pues no conduce a la acumulación del metal.

Otro problema que puede surgir al aplicar microorganismos en la biorremediación de sistemas acuosos y suelos es la biomagnificación de los metales tóxicos (aumento en su concentración en niveles tróficos superiores de la cadena alimenticia). Sin embargo, no se ha observado biomagnificación por microalgas para los siguientes metales y metaloides: Mn, Cr, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb y As. Cabe señalar que esta última observación se realizó con algunas algas verdes, pero no con *Euglena*. Los predadores iniciales de las microalgas del plancton son principalmente protistas

ciliados (*Paramecium*) y rotíferos, los cuales son muy susceptibles a la presencia de metales pesados; esta característica favorecería la ausencia de biomagnificación.

Una estrategia racional para el mejoramiento de organismos utilizables en la biorremediación de ecosistemas contaminados con metales pesados consiste en: (i) la identificación y descripción de los mecanismos moleculares y celulares que confieren la resistencia y acumulación del metal; (ii) el análisis de control de los mecanismos de acumulación, con lo cual se detectan los sitios (enzimas, transportadores) susceptibles de manipulación genética o química; (iii) evaluación de las cepas transformadas genéticamente o de las drogas específicas diseñadas para afectar los sitios principales de control metabólico.

La refinación metodológica de la ingeniería genética de las últimas dos décadas permite modular la expresión de una enzima o transportador con relativa facilidad. Así, con el objetivo final de incrementar el flujo y la concentración de intermediarios metabólicos, los investigadores han sobreexpresado enzimas que supuestamente son las etapas limitantes de vías metabólicas como la glicólisis (y la producción de alcohol) en levadura, la glicólisis (y la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos) en lactobacilos, y la síntesis de GSH y FQs en levaduras y plantas (Moreno-Sánchez et al., 2005; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2006). Sin embargo, a pesar de sobreexpresar a la hexocinasa, a la fosfofructocinasa-1 o a la piruvato cinasa, o bien a la γ -glutamyl cisteína sintetasa (γ -ECS) o a la fitoquelatina sintasa (FQS), las supuestas enzimas clave de la glicólisis y la síntesis de GSH y FQs (Fig. 3), respectivamente, no se ha conseguido aumentar el flujo de

la vía ni la concentración de los metabolitos de interés. Por lo tanto, el concepto frecuentemente utilizado de “enzima clave” o “etapa limitante” es erróneo, pues no conduce al resultado esperado. En cambio, el análisis cuantitativo del control de flujo ha establecido que en una vía metabólica, el control se distribuye entre varios sitios. El desafío es entonces discernir cuáles son esos sitios controladores en cada vía metabólica, y los mecanismos moleculares que determinan porqué algunas enzimas ejercen control significativo y otras no lo hacen.

Biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas

Nuestro grupo ha identificado a la síntesis de GSH y FQs (Fig. 3) como una de las principales vías metabólicas involucradas en la resistencia y acumulación de Cd^{2+} en *E. gracilis* (Mendoza-Cózatl et al., 2002, 2005; Avilés et al., 2003, 2005; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005). En una cepa heterotrófica pretratada con Hg^{2+} se logró seleccionar un fenotipo hiperacumulador de Cd^{2+} ($>200 \text{ nmol Cd}^{2+}/10^7$ células), el cual se acompaña de una sobreproducción de Cys y GSH ($>250 \text{ nmol}/10^7$ células) y FQs ($>50 \text{ nmol-SH}/10^7$ células). Cuando la cepa hiperacumuladora se cultiva con 0.2 mM de CdCl_2 por cuatro días se alcanza el 1.1% de Cd^{2+} en peso ($11.2 \text{ g Cd}^{2+}/\text{Kg}$ peso seco); este valor se compara favorablemente con plantas hiperacumuladoras de metales como *Thlaspi caerulescens*, la cual alcanza el $0.4\text{-}1.0\%$ de Cd^{2+} en peso después de más de cuatro semanas de cultivo. *E. gracilis* fotosintética (12 h luz/12 h oscuridad) no requiere pretratamiento con Hg^{2+} para exhibir una capacidad alta de acumulación de Cd^{2+} ($>200 \text{ nmol}$

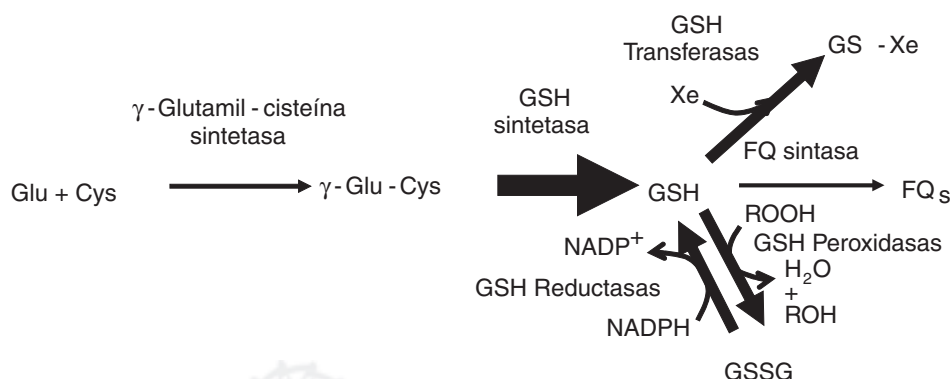


Figura 3. Ruta biosintética del glutatión en plantas, algunas levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Candida glabrata*) y algunas microalgas. Las dos primeras enzimas (γ -ECS y GS) requieren ATP como fuente de energía para formar el enlace peptídico, mientras que la FQ sintetasa no consume ATP, pues utiliza la energía de la ruptura de un enlace peptídico para formar otro. Xe representa cualquier xenobiótico generado durante la exposición a estrés, por ejemplo, antibióticos, aniones orgánicos, o hidroxi alquenos generados a partir de ácidos grasos por estrés oxidativo o por exposición a metales pesados; dependiendo del tipo de xenobiótico, diferentes GSH transferasas catalizan la reacción. El estado redox celular se mantiene por acción de las enzimas GSH reductasas y GSH peroxidasas, las cuales conectan con el metabolismo intermediario a través de la relación $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ y del nivel de peroxidación de lípidos y proteínas (ROOX), principalmente.

$\text{Cd}^{2+}/10^7$ células), la cual también se acompaña de la sobreproducción de Cys, GSH y FQs (40, 80 y 33 nmol/ 10^7 células). *E. gracilis* carece de vacuola y en consecuencia una fracción significativa del metal acumulado (aprox. 50%) se compartamentaliza en cloroplastos y mitocondrias.

Como la acumulación de Cd^{2+} genera estrés oxidativo, también hemos iniciado la caracterización de los cambios en las enzimas y metabolitos antioxidantes en *E. gracilis*. Además del GSH, otros metabolitos antioxidantes que también aumentan por exposición al Cd^{2+} son el α -tocoferol y la ubiquinona-9; todavía no se ha determinado el nivel de ascorbato. A pesar de que los tres metabolitos antioxidantes aumentaron, su estado redox resultó ser más oxidado (p. ej., la relación GSH/GSSG disminuyó de 90% en células control a aprox. 65% en células expuestas a 50 μM de CdCl_2). Además, las actividades de las enzimas antioxidantes GSH peroxidasa, GSH reductasa y ascorbato peroxidasa también se incrementan significativamente cuando hay estrés por Cd^{2+} .

El modelaje de la biosíntesis de GSH y FQs en plantas y levaduras permitió determinar que el flujo de la vía es controlado por la γ -glutamyl cisteína sintetasa (γ -ECS = 58%) y la FQ sintasa (FQS = 40%); la concentración de GSH es igualmente controlado por estas dos enzimas. El análisis de control del modelo cinético mostró que la manipulación individual de cada enzima no es suficiente, pues conduce a una disminución del nivel de GSH y a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y al efecto tóxico de los metales pesados, tal como se ha observado reiteradamente por otros investigadores. El análisis de control también demostró que la sobreexpresión simultánea de la γ -ECS y la FQS conduce a un aumento en la velocidad de síntesis de GSH y FQs (2.5-3 veces), a un aumento significativo de la concentración de FQs (4.5 veces) y a la preservación del nivel de GSH, respecto a la condición sin sobreexpresión, con lo cual no se compromete el manejo del estrés oxidativo; la disminución moderada de las GSH-S- transferasas (< 30%) también favorecería la acumulación del metal, pues se aumentaría el nivel de GSH y disminuiría una de las fugas del consumo de GSH. Organismos con estas características podrían desarrollar un fenotipo hiperacumulador de Cd^{2+} (Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2006).

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los apoyos de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana, de CONACYT (No. 41712-Q), de la Universidad de Guanajuato y del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG).

REFERENCIAS

1. Aguilera, S., M.E. Aguilar, M.P. Chávez, J.E. López-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-García and C. Cervantes. 2004. Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 232:107-112.
2. Ahmad, I., M.I. Ansari and F. Aqil. 2006. Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. using single and multi-metal solution. Ind. J. Exptl. Biol. 44:73-76.
3. Avilés, C., H. Loza, N. Terry and R. Moreno-Sánchez. 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 180:1-10.
4. Avilés, C., M.E. Torres-Márquez, D. Mendoza-Cózatl and R. Moreno-Sánchez. 2005. Time-course development of the Cd^{2+} -hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 184:83-92.
5. Casiot, C., O. Bruneel, J.C. Personne, M. Leblanc, F. Elbaz-Poulichet. 2004. Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoules, France). Sci. Total Environ. 320:259-267.
6. Cervantes, C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán and R. Moreno-Sánchez. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25:335-347.
7. Devars, S., C. Avilés, C. Cervantes and R. Moreno-Sánchez. 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 174:175-180.
8. Espino-Saldaña, A.E. 2002. Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromato nativos de desechos industriales. Tesis de Licenciatura. IIBE, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.
9. Greenberg, A.D., J.J. Connors, D. Jenkins and M. A. Franson. 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., pp 187-190.
10. Haney, C.J., G. Grass, S. Franke and C. Rensing. 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32:215-226.
11. Hargreaves, J.W., W.J.H. Lloyd and B.A. Witton. 1975. Chemistry and vegetation of highly acidic streams. Freshwater Biol. 5:563-576.
12. Jasso-Chávez, R. and R. Moreno-Sánchez. 2003. Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. Eur. J. Biochem. 270:4942-4951.
13. Katz, S.A. and H. Salem. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. J. Appl. Toxicol. 13:217-224.
14. Kempner, E.S. 1982. Stimulation and inhibition of metabolism and growth of *Euglena gracilis*. En: The Biology of *Euglena*, Buetow DE (Ed.). Academic Press, New York. Vol. III, p. 197-252.
15. McGrath, S.P. and S. Smith. 1990. Chromium and nickel. En: Heavy Metals in Soils. Alloway, B.J. (Ed.), pp. 125-150. Wiley, New York.
16. Mendoza-Cózatl, D., S. Devars, H. Loza and R. Moreno-Sánchez. 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol. Plant. 115:276-283.
17. Mendoza-Cózatl, D., H. Loza, A. Hernández and R. Moreno-Sánchez. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS Microbiol. Rev. 29:653-671.
18. Mendoza-Cózatl, D. and R. Moreno-Sánchez. 2005. Cd^{2+} transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. BBA-Bioenergetics 1706:88-97.

19. Mendoza-Cózatl, D. and R. Moreno-Sánchez. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J. Theor. Biol.* 238:919-936.
20. Moreno-Sánchez, R., E. Saavedra, D. Mendoza-Cózatl and S. Rodríguez-Enríquez. 2005. El análisis de control de flujo como herramienta en la manipulación de vías metabólicas. *Mensaje Bioquímico Vol. XXIX. Fac. Medicina, UNAM.* pp.181-123.
21. Mukhopadhyay, R., B.P. Rosen, L.T. Phung and S. Silver. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:311-325.
22. Muter, O., A. Patmalnieks and A. Rapoport. 2001. Interrelations of the yeast *Candida utilis*: metal reduction and its distribution in the cell and medium. *Proc. Biochem.* 36: 963-970.
23. Navarro, L., M.E. Torres-Márquez, S. González-Moreno, S. Devars, R. Hernández and R. Moreno-Sánchez. 1997. Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:265-272.
24. Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:313-339.
25. Nies, D.H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch and M.H. Saier. 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.
26. Park, D., Y.S. Yun, J.H. Jo and J.M. Park. 2005. Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Water Res.* 39:533-540.
27. Paulsen, I.T., M.H. Brown and R.A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.
28. Pimentel, B.E., R. Moreno-Sánchez and C. Cervantes. 2002. Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212:249-254.
29. Ramírez-Ramírez, R., C. Calvo-Méndez, M. Avila-Rodríguez, P. Lappe, M. Ulloa, R. Vázquez-Juárez and J.F. Gutiérrez-Corona. 2004. Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 85:63-68.
30. Rodríguez-Zavala, J.S., M.A. Ortiz-Cruz and R. Moreno-Sánchez. 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *Eukaryot. J. Microbiol.* 53:36-42.
31. Saier, M.H. Jr. 2003. Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* 48:1145-1156.
32. Silver, S. and L.T. Phung. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.
33. Solioz, M.A., A. Odermatt and R. Krapf. 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346:44-47.
34. Srivastava, S. and I.S. Thakur. 2006. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Biores. Technol.* 97:1167-1173.
35. Wrobel, K., K. Wrobel, P.L. López-de-Alba and L. López-Martínez. 1997. Enhanced spectrophotometric determination of chromium (VI) with diphenylcarbazide using internal standard and derivative spectrophotometry. *Talanta* 44:2129-2136.

Correspondencia:

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
 Universidad Michoacana
 Edificio B-3, Ciudad Universitaria
 58030 Morelia, Mich., México
 Tel/fax: (443) 326-5788
 E-mail: cvega1999@yahoo.com