



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Area de Microbiología

Respuesta al cadmio de la microalga marina
Tetraselmis suecica (Kyllin) Butch: relación entre
tolerancia y compuestos tiólicos. Aplicación de su
biomasa viva para la retirada de cadmio del medio

Memoria que para optar
al grado de Doctor presenta
MÓNICA PÉREZ RAMA

La Coruña, 2005

D. JULIO E. ABALDE ALONSO, Profesor Titular del área de Microbiología y D. JOSÉ ENRIQUE TORRES VAAMONDE, Profesor Contratado Doctor del área de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña.

INFORMAN: que la licenciada en Biología y alumna del tercer ciclo del programa de Doctorado de Biología Marina y Acuicultura **Dña. Mónica Pérez Rama**, ha realizado en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña, el trabajo con el título “**Respuesta al cadmio de la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch: relación entre tolerancia y compuestos tiólicos. Aplicación de su biomasa viva para la retirada de cadmio del medio**” bajo nuestra dirección y que presenta para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente en:

La Coruña, 5 de septiembre de 2005

Fdo. Dr. Julio E. Abalde Alonso

Fdo. Dr. José Enrique Torres Vaamonde

Si las pasiones y los sueños no pudiesen crear nuevos tiempos futuros,
la vida sería un engaño insensato.
H. R. Lenormand (1882-1951)

Un científico tiene la libertad y debe tomársela,
de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación,
de buscar cualquier evidencia,
de corregir errores.
J. Robert Oppenheimer (1904-1967)

A mis padres
A mis hermanos

Agradecimientos

Al pensar en todos los que de una forma u otra me han ayudado a la realización de este trabajo, me doy cuenta que son muchas las personas que merecen mi más sincero agradecimiento.

Debo destacar en primer lugar al Dr. Enrique Torres Vaamonde. Debo darle las gracias especialmente por su inestimable ayuda, sin la cual no habría podido realizar este trabajo. De igual manera debo agradecer toda su paciencia conmigo. Por todo ello, gracias.

Deseo también expresar mi más sincera gratitud al Dr. Julio Abalde, sin cuyo apoyo no habría sido posible la realización de este trabajo. Muchísimas gracias.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud a Concepción Herrero por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en algo que realmente me gusta: la Microbiología. Gracias por esta maravillosa oportunidad.

Gracias, también, a Angeles por su amistad.

Del mismo modo, quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio por su amistad, ayuda y apoyo en los momentos de desánimo. Deseo especialmente agradecer a Elena, Dora e Iria su esfuerzo y empeño en los duros días de trabajo, manteniendo siempre su buen humor.

De igual forma, deseo expresar mi agradecimiento a los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación por los análisis en el ICP-MS, especialmente a Alicia, que nos proporcionó información fundamental sobre este tipo de análisis.

No puedo olvidarme de mis amigos y compañeros de otros laboratorios, tanto los que se han ido como los que aún siguen, que en todo momento se han preocupado por mí. Y por supuesto, Teresa, Marta, Lucía, Laura y Boni. Os doy las gracias por vuestro apoyo y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Muchísimas gracias.

Para terminar, debo dar las gracias a las personas que más me importan. A mis padres y a mis hermanos Javier y Marta porque siempre me han apoyado sin reserva y me han animado a continuar en los momentos difíciles. Sois realmente especiales. A mi sobrina Elena porque siempre consigue hacerme sonreír. Gracias también a Montserrat, por estar siempre presente. Y no menos importante ha sido y es Jesús. Gracias por ser tan maravillosos.

A todos, muchas gracias

La realización de este trabajo fue posible gracias a una beca predoctoral de la Universidad de La Coruña, al proyecto **“Efectos tóxicos de metales esenciales y no esenciales sobre microalgas. Mecanismos de tolerancia y acumulación”** financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de I+D+I (REN2000-0458 HID) y al proyecto **“Utilización de las microalgas en procesos de biorremediación de iones metálicos: toxicidad y tolerancia”** financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de I+D+I (REN2003-02414).

Indice general

INDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
METALES, UN PROBLEMA AMBIENTAL	5
Biodisponibilidad y bioacumulación de metales.....	9
Efectos tóxicos de los metales.....	10
Retirada de los metales del medio.....	12
CADMIO	16
Concentración y procedencia del cadmio en ambientes naturales.....	17
Contaminación medioambiental por cadmio.....	18
Efectos tóxicos del cadmio.....	19
MICROALGAS, PRODUCTORES PRIMARIOS ESENCIALES	22
Pruebas de toxicidad microalgales.....	23
Potencial aplicación de las microalgas en procesos de biorremediación.....	24
MECANISMOS DE TOLERANCIA A METALES	26
Metalotioneínas.....	28
Metalotioneínas de clase III.....	29
ELECTROFORESIS CAPILAR: ANÁLISIS DE PÉPTIDOS TIÓLICOS	33
Electroforesis capilar en zona.....	34
Análisis de péptidos tiólicos mediante electroforesis capilar en zona.....	37
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	43
DESCRIPCIÓN Y CULTIVO DE LA ESPECIE MICROALGAL <i>Tetraselmis suecica</i> (KYLIN) BUTCH	45
Descripción de la especie <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butch.....	45
Aplicaciones de <i>Tetraselmis suecica</i>	48
Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i>	48
Lavado del material.....	50

Solución “stock” de cadmio	50
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Tetraselmis suecica</i>	51
Diseño experimental	51
Análisis de datos	53
TOLERANCIA AL CADMIO EN LA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i> : IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS TIÓLICOS	55
Determinación de los grupos tiol (-SH) no proteicos.....	55
Purificación, identificación y análisis de los compuestos tiólicos inducidos por el cadmio.....	57
OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS TIÓLICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN EXTRACTOS BRUTOS DE <i>Tetraselmis suecica</i>	63
Muestras biológicas utilizadas en el ensayo.....	63
Optimización de las condiciones de la electroforesis capilar.....	63
Optimización del método de extracción y derivatización con monobromobimane (mBrB) de los compuestos tiólicos	65
COMPOSICIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS TIÓLICOS SINTETIZADOS POR LA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i> AL SER EXPUESTA A CADMIO	69
Diseño experimental	69
Separación e identificación por electroforesis capilar de los compuestos tiólicos derivatizados con mBrB	69
Análisis estadístico.....	70
ESTABILIDAD Y PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS TIÓLICOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE LAS CÉLULAS DE <i>Tetraselmis suecica</i> A UN MEDIO SIN METAL..	71
Análisis estadístico.....	71
RETIRADA DE CADMIO POR LA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i>	73
Diseño experimental	73
Medida del cadmio retirado por las células de la microalga.....	73
Determinación de cadmio por ICP-MS.....	75
Análisis estadístico.....	76
RESULTADOS	77
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Tetraselmis suecica</i>	79

TOLERANCIA AL CADMIO EN LA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i> : IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS TIÓLICOS	83
Determinación de los grupos tiol (-SH) no proteicos.....	83
Purificación, identificación y análisis de los compuestos tiólicos inducidos por el cadmio.....	86
ANÁLISIS Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS TIÓLICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN EXTRACTOS BRUTOS DE <i>Tetraselmis suecica</i>	93
Optimización del método de análisis mediante CZE	93
Optimización del método de extracción y derivatización con mBrB de los compuestos tiólicos presentes en células microalgales.....	106
Características del método desarrollado.....	110
COMPOSICIÓN Y PRODUCCIÓN A LO LARGO DEL TIEMPO DE DIFERENTES COMPUESTOS TIÓLICOS EN LA MICROALGA MARINA <i>Tetraselmis suecica</i> EXPUESTA A CADMIO.	112
Producción a lo largo del tiempo de glutatión, γ -Glu-Cys y del aminoácido cisteína	113
Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas	116
Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas desgluciladas.	118
ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS TIÓLICOS DESPUÉS DE SER TRANSFERIDOS A UN MEDIO SIN CADMIO	120
RETIRADA DE CADMIO POR LA MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i>	123
Relación cadmio intracelular – grupos tiol	127
DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXO	183
CLASS III METALLOTHIONEINS IN RESPONSE TO CADMIUM TOXICITY IN THE MARINE MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i> (KYLIN) BUTCH.....	185
CADMIUM REMOVAL BY LIVING CELLS OF THE MARINE MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i>	191
CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF PHYTOCHELATINS AND OTHER THIOL PEPTIDES IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES DERIVATIZED WITH MONOBROMOBIMANE.....	197
COMPOSITION AND PRODUCTION OF THIOL CONSTITUENTS INDUCED BY CADMIUM IN THE MARINE MICROALGA <i>Tetraselmis suecica</i>	209

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de Galicia donde se muestran las zonas con un mayor aumento en la concentración de metales procedentes de fuentes antropogénicas.	8
Figura 2. Estructura de una fitoquelatina con 2 subunidades de (γ -Glu-Cys).	30
Figura 3. Representación esquemática de la organización de los principales componentes de un equipo típico de electroforesis capilar.	34
Figura 4. Modelo de distribución de la carga de la doble capa en una pared del capilar cargada negativamente que lleva a la generación del flujo electroosmótico.	36
Figura 5. Reacción del DTNB con los compuestos tiólicos.	56
Figura 6. Etapas de estabilización y marcaje de la cisteína usando DTDPA.	59
Figura 7. Reacción del mBrB con un compuesto tiólico.	66
Figura 8. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> expuesta a diversas concentraciones de cadmio.	79
Figura 9. Producción de grupos tiol en las células de <i>Tetraselmis suecica</i> expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L).	83
Figura 10. Cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-60 de extractos brutos alcalinos procedentes de células de <i>Tetraselmis suecica</i> sin exponer y expuestas a 7.9 mg Cd/L durante 7 días.	87
Figura 11. Cromatogramas obtenidos por electroforesis capilar de GSH y de las fracciones 22 a 26 obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular, que corresponden a las fracciones en que se midió mayor cantidad de grupos tiol. Solución electrolítica: H_3PO_4 150 mM. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μ m de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 25 s; voltaje aplicado: 12 KV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 210 nm.	90
Figura 12. Electroferogramas obtenidos de muestras de <i>Tetraselmis suecica</i> derivatizadas con mBrB y usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM con diferentes pHs: a)	

1.50; b) 1.55; c) 1.60; d) 1.65; e) 1.75. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras son introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 12 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar..... 97

Figura 13. Separación de los compuestos tiólicos mediante CZE usando como solución electrolítica tampón fosfato (1) y citrato (2), ambos a pH 1.60, a diferentes concentraciones: a) 150 mM; b) 170 mM; c) 200 mM. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 12. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar.... 98

Figura 14. Separación de los compuestos tiólicos mediante CZE añadiendo a la solución electrolítica, formada por tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, diferentes concentraciones de los modificadores orgánicos trifluoroetanol (1), acetonitrilo (2) y metanol (3): a) 2.5 %, b) 5 % y c) 10 % (v/v). Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 12. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar 102

Figura 15. Representación gráfica conductividad vs. voltaje obtenida al aplicar un voltaje entre 5 y 19 kV a una solución electrolítica formada por tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm). 105

Figura 16. Electroferogramas en los que se muestra el efecto del ácido sulfosalicílico y del HCl en la extracción de los compuestos tiólicos. Ácido sulfosalicílico: a) 0.2 M; b) 0.1 M; c) 0.05 M. HCl d) 0.1 M. Solución electrolítica: H_3PO_4 150 mM, pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm); las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 13 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar. 107

Figura 17. Electroferogramas en los que se muestra el efecto de los diferentes agentes reductores (2-mercaptoetanol y NaBH_4) y sus concentraciones en el proceso de derivatización y en el proceso de análisis con CZE de los compuestos tiólicos. a) muestra derivatizada sin agente reductor. NaBH_4 : b1) 5 mg/ml; b2) 1.5 mg/ml; b3) 0.5 mg/ml. 2-mercaptoetanol: c1) 10 mM; c2) 5 mM; c3) 1 mM. La solución electrolítica y las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 16. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar..... 109

- Figura 18.** Electroferogramas de los compuestos tiólicos presentes en una muestra de la microalga marina *Tetraselmis suecica* expuesta durante 7 días a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L. Solución electrolítica: H₃PO₄ 150 mM, pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 13 kV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 390 nm. Procedimiento de extracción: HCl 0.1 M. Agente reductor: 1.5 mg/ml de NaBH₄..... 110
- Figura 19.** Electroferogramas obtenidos por CZE de extractos celulares de los cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L..... 112
- Figura 20.** Evolución de la concentración de GSH, γ-Glu-Cys (γ-EC) y del aminoácido cisteína en células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) control, b) 3 mg/L, c) 7.9 mg/L, d) 15 mg/L y e) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas ± desviación típica..... 114
- Figura 21.** Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas ± desviación típica..... 117
- Figura 22.** Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas desgluciladas en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas ± desviación típica 119
- Figura 23.** Evolución a lo largo del tiempo de los compuestos tiólicos después de transferir las células en un medio sin metal (las células fueron previamente expuestas a 7.9 mg Cd/L durante 7 días). a) evolución del aminoácido cisteína y de los precursores de las fitoquelatinas, GSH y γ-Glu-Cys (γ-EC), b) evolución de las fitoquelatinas y c) evolución de las fitoquelatinas desgluciladas. Las barras representan las medias de tres réplicas ± desviación típica 121
- Figura 24.** Evolución del cadmio intracelular después de transferir células de *Tetraselmis suecica* expuestas a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L a un medio sin metal..... 122
- Figura 25.** Evolución del cadmio extraído por las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L). Los resultados representan la media ± desviación típica de tres réplicas. 124

Figura 26. Relación de los grupos tiol y el cadmio intracelular en <i>Tetraselmis suecica</i> después de seis días de cultivo.....	128
Figura 27. Representación esquemática de la interacción del cadmio con las diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de fitoquelatinas.....	149

Indice de tablas

Tabla 1. Principales usos de los metales.....	7
Tabla 2. Métodos convencionales de retirada de metales.....	13
Tabla 3. Propiedades físico-químicas del cadmio.	16
Tabla 4. Clasificación de la clase <i>Prasinophyceae</i>	45
Tabla 5. Composición química del medio Algal en 1 litro de agua de mar natural.	49
Tabla 6. Condiciones de elución aplicadas a la columna de HPLC durante el análisis de aminoácidos.....	61
Tabla 7. Parámetros de la función logística de crecimiento de los cultivos de <i>Tetraselmis suecica</i> a diferentes concentraciones de cadmio.	81
Tabla 8. Tasas de división de los cultivos de <i>Tetraselmis suecica</i> con diferentes concentraciones de cadmio.....	82
Tabla 9. Concentración de los grupos tiol ($\mu\text{mol -SH/cél}$) obtenida en las células de <i>Tetraselmis suecica</i> expuestas a diferentes concentraciones de cadmio, después de seis días de tratamiento.....	84
Tabla 10. Tiempo de migración de los diferentes compuestos tiólicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 12 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.....	94
Tabla 11. Platos teóricos de los diferentes compuestos tiólicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.	99

- Tabla 12.** Resolución de los diferentes compuestos tióxicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas. 100
- Tabla 13.** Platos teóricos de los diferentes compuestos tióxicos separados mediante electroforesis capilar usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM, pH 1.60 a la que se añadió diferentes concentraciones de trifluoroetanol, acetonitrilo o metanol. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas..... 103
- Tabla 14.** Resolución de los diferentes compuestos tióxicos separados mediante electroforesis capilar usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM, pH 1.60 a la que se añadió diferentes concentraciones de trifluoroetanol, acetonitrilo o metanol. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas..... 104
- Tabla 15.** Número de platos teóricos y resolución de los compuestos tióxicos identificados en el electroferograma del método desarrollado. La solución electrolítica y las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 18..... 111
- Tabla 16.** Porcentaje de cadmio extraído por las células de la microalga *Tetraselmis suecica* expuesta a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L) en relación con la cantidad de cadmio inicial añadido al medio. 125
- Tabla 17.** Cadmio retirado por las células de *Tetraselmis suecica* (mg/L) tratadas con diferentes concentraciones de cadmio después de seis días de cultivo. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 3 réplicas de las diferentes concentraciones de cadmio ensayadas. 127

Lista de abreviaturas

- **SH**: radical tiol

(γ -EC)_n: (γ -Glu-Cys)_n, fitoquelatinas desgliciladas con *n* subunidades de γ -Glu-Cys

(γ -EC)_nG: (γ -Glu-Cys)_n-Gly, fitoquelatinas con *n* subunidades de γ -Glu-Cys

γ -EC: γ -Glu-Cys

a: unidad del Sistema Internacional equivalente a 10⁻¹⁸. Ejemplo, amol = 10⁻¹⁸ moles

ANOVA: análisis de varianza

BSO: butionín sulfoximina

cél / céls: célula / células

Cys: cisteína

CZE: electroforesis capilar en zona

DTDPA: ácido 3,3'-ditioldipropiónico

DTNB: ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DTPA: ácido dietilenotriaminopentaacético

EC50: concentración efectiva media

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EOF: flujo electroosmótico

FMOC: 9- fluorenilmetilcloroformato

GSH: glutatión, (γ -Glu-Cys-Gly);

HCl: ácido clorhídrico

HClO₄: ácido perclórico

HNO₃: ácido nítrico

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

ICP-MS: Plasma de Acoplamiento Inducido – Espectrometría de Masas

mBrB: monobromobimane

NaBH₄: borohidruro sódico

OPA: *O*-ftaldehido

TEA: trietilamina

THF: tetrahidrofurano

Introducción

La industrialización se ha convertido en la característica distintiva de nuestra civilización. Sin embargo, los diferentes procesos industriales han afectado negativamente al medio ambiente. Como se describe en el artículo de Science “Human domination of Earth’s Ecosystem” (Vitousek *et al.*, 1997): “entre un tercio y la mitad de la superficie terrestre ha sido transformada por la acción humana; la concentración del dióxido de carbono ha aumentado un 30 % desde el comienzo de la Revolución Industrial; hoy en día es fijado más nitrógeno atmosférico por la humanidad que por todas las fuentes terrestres combinadas; más de la mitad del agua dulce accesible es utilizada por la humanidad; un cuarto de las especies de aves de La Tierra han sido conducidas a la extinción... Todos estos cambios son continuos y en muchos casos se están acelerando... Y todos ellos debidos a una sola causa, el peso creciente de la población humana. Los grados, escalas, clases y combinaciones de los cambios que ocurren ahora son fundamentalmente diferentes de aquellos ocurridos en cualquier otra época de historia; estamos cambiando la Tierra más rápidamente de lo que la entendemos. En un sentido muy real, el mundo está en nuestras manos y como lo manejemos determinará su composición y dinámica, y nuestro destino”.

“Todo lo que hacemos en tierra afecta a los océanos”

Los océanos y estuarios mundiales son los últimos depósitos para un vasto conjunto de sustancias arrojadas deliberadamente o accidentalmente debido a las actividades humanas. El inmediato y más directo impacto de estas actividades tiene lugar en las zonas costeras donde se concentra la población. Simultáneo a este crecimiento han sido los profundos cambios en la zona de interacción tierra-mar asociado con la construcción de zonas industriales, mantenimiento de puertos, desarrollo doméstico en la línea de costa, demanda de turismo y otros usos del espacio costero. Se calcula que aproximadamente el 50 % de los manglares han sido destruidos debido a estas actividades. Mientras la zona costera está claramente en riesgo debido al impacto antropogénico, el océano abierto tampoco es inmune a la polución. La entrada de sustancias químicas mediante transporte atmosférico y deposición, así como de operaciones de pesquería realizadas más allá de la plataforma continental puede afectar adversamente a las aguas de los océanos.

Los residuos antropogénicos más comúnmente encontrados en el medio ambiente marino son restos de drenados, aguas residuales y vertidos industriales y municipales. Estos residuos contienen un amplio rango de contaminantes, entre los que se encuentran petróleo y sus derivados, hidrocarburos halogenados y metales pesados. Todos ellos están considerados como sustancias críticas para la salud medioambiental de los océanos. La presencia de estos compuestos puede provocar una serie de alteraciones en los organismos acuáticos: alta mortalidad en los estados de vida más sensibles como huevos, larvas..., cambios en el desarrollo de los organismos, cambios fisiológicos y en el metabolismo fisiológico. Estas alteraciones en los organismos pueden suponer mortalidad de la población total lo que supondría cambios importantes en las comunidades acuáticas (Kennish, 1997).

Las algas son la base de la cadena trófica en todos los ecosistemas acuáticos. Entre los mayores productores primarios, las microalgas son las responsables de aproximadamente la mitad de la producción de O₂ presente en la atmósfera. Asimismo, estos microorganismos constituyen la principal fuente de alimento para moluscos bivalvos en todos sus estados de crecimiento, zooplancton (copépodos, rotíferos, pequeñas gambas) y los estados larvales de algunos crustáceos y peces. El estrés que producen diferentes contaminantes altera la composición bioquímica a nivel celular lo que supone un fuerte impacto en su valor alimenticio (ácidos grasos, minerales, aminoácidos, esteroides, azúcares y vitaminas). Se ha documentado, además, la capacidad de acumulación de tóxicos, como los metales, por las microalgas por lo que pueden ser transferidos a lo largo de la cadena trófica. Por tanto, el impacto de los diferentes contaminantes en las microalgas llevaría a cambios en la composición de especies de la comunidad acuática, cambios de los organismos dominantes en un hábitat y empobrecimiento de especies.

Metales, un problema ambiental

Los metales se encuentran entre los contaminantes más intensamente estudiados debido a su toxicidad en los organismos y ecosistemas al sobrepasar un cierto umbral de disponibilidad, y a su persistencia en el ambiente. Estos elementos son constituyentes naturales del medioambiente pero la enorme variedad de aplicaciones de los metales en diversos productos y operaciones industriales (tabla 1) ha causado un incuestionable aumento en su obtención, lo que ha llevado a un dramático incremento de los niveles de los mismos en el ambiente. En el último siglo se extrajo en minería el 90 % del total de cadmio, cobre, plomo, níquel y zinc extraído a lo largo de la historia (Hill, 2004). La importancia industrial de los metales deriva de sus propiedades eléctricas, mecánicas y tecnológicas como elevada resistencia a deformarse por torsión, presión, flexión y tracción, además de gran ductilidad y maleabilidad y excelentes propiedades conductoras.

Las principales fuentes de procedencia de metales son:

- Minas, fundición y refino: la explotación de depósitos de metales invariablemente expone superficies de minerales y gran cantidad de material de desecho a condiciones aceleradas de desgaste. Por ejemplo, la exposición al oxígeno atmosférico de piritas y otros minerales de sulfuro produce la oxidación de este mineral y el drenaje de agua ácida mineral. Por consiguiente, elevadas cantidades de metales como arsénico, cobre, plomo, hierro, manganeso, níquel y zinc son liberados a las cuencas hidrográficas adyacentes (Moore y Luoma, 1990).

- Efluentes industriales: los procesos industriales son extremadamente diversos y complejos. La tabla 1 muestra de una forma resumida la gran diversidad de metales implicados en algunas actividades industriales. Por esta razón, las concentraciones de metales en aguas residuales industriales están generalmente en la gama de miligramos por litro (Azcue, 1993).

- Residuos domésticos: cada persona produce diariamente unos 500 litros de aguas residuales y 1.6 Kg. de basura doméstica. Aproximadamente el 10 % de la basura está compuesta de metales, mientras que el papel representa la mitad (Azcue, 1993).

- Explotaciones agrícolas: las principales fuentes de metales en suelos cultivables son abonos, pesticidas y fertilizantes. Se ha calculado que la descarga anual media de cadmio en suelos agrícolas en Europa es aproximadamente 8 gramos por hectárea vía atmosférica y 5 gramos por hectárea debido al uso de fertilizantes de fosfatos. En Japón, cerca del 9.5 % de los suelos de arrozales han sido declarados impropios para el cultivo de arroz para consumo humano, debido a los niveles excesivos de metales (Alloway y Ayres, 1993).

Numerosos estudios demuestran claramente que diferentes ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos, han sido contaminados por metales procedentes de las diferentes fuentes antropogénicas anteriormente mencionadas. Un claro ejemplo lo encontramos en la zona de Aliaga, en Turquía, donde se sitúa una importante zona industrial. En esta zona se han medido niveles elevados de Fe, Ti, Mn, Cr, Ni, Cu, Pb y Zn en los suelos y sedimentos de las cercanías. Asimismo, el agua dulce no es potable debido a los altos niveles de Pb y Cu (Sponza y Karaoglu, 2002).

Tabla 1. Principales usos de los metales.

Metal	Usos
Ag	Fotografía, conductores eléctricos, soldadura, galvanización, acuñación, baterías, catalizador.
Al	Construcción, transporte, envasados, industria eléctrica y farmacéutica.
As	Medicina, veterinaria, aleaciones, pirotecnia, esmaltes, agentes depiladores, insecticidas, pigmentos, pintura, productos electrónicos, tintes.
Cd	Galvanización, pigmentos, baterías, aleaciones de bajo punto de ebullición.
Co	Aleaciones, pigmentos, esmaltes, barnices, galvanización.
Cr	Metalurgia, materiales refractarios, galvanización, curtidos, pinturas, conservación de madera, industria química.
Cu	Industrias eléctrica y automovilística, construcción, fontanería, latón, algicidas, conservación de maderas.
Fe	Industrias de hierro y acero.
Hg	Producción de cloruro y sosa cáustica, insecticidas, industrias farmacéutica y metalúrgica, odontología, catalizador en la producción de polímeros sintéticos.
Mn	Metalurgia, baterías, industria química, cerámica.
Mo	Metalurgia, pigmentos, catalizador, fabricación de vidrio, aditivo en aceites y lubricantes.
Ni	Metalurgia, baterías, equipos solares, galvanización, catalizador en la producción de aceites comestibles.
Pb	Baterías, gasolinas, pigmentos, munición, soldadura, pintura, industria automovilística.
Sb	Plásticos, cerámica, vidrios, pigmentos, productos químicos incombustibles.
V	Metalurgia, catalizador, pigmentos.
Zn	Aleaciones, bronce y latón, galvanización, baterías, pintura, productos agrícolas, cosméticos y medicinales.

Las rías gallegas son muy sensibles a la influencia antropogénica debido a la importancia socioeconómica de estas zonas generado por las actividades industriales, la cada vez mayor importancia de la acuicultura, las actividades portuarias, la pesca y la gran cantidad de turismo que reciben. En las costas gallegas no hay un incremento notable de la concentración de metales por lo que no se consideran contaminadas, aunque hay importantes zonas localizadas donde se ha producido un enriquecimiento claramente inducido antropogénicamente. Estas zonas son la desembocadura del río Lagares, la ensenada de San Simón y la zona cercana al puerto en la Ría de Vigo, la

zona interior de la Ría de Pontevedra, el estuario del río Ulla en la Ría de Arousa, la zona interior de la ría de La Coruña, La Ría de Ferrol y el estuario del Eume en la Ría Ares-Betanzos (figura 1) (Prego y Cobelo-García, 2003). Por otro lado, el estudio de la concentración de metales (Mn, Zn, Cu, Hg, Cd, Pb y Cr) en peces comestibles capturados en cuatro reservas marítimas del suroeste de la costa atlántica española mostró una considerable concentración de metales. Los niveles de estos metales en los peces está por debajo de los límites considerados aptos para el consumo humano aunque suponen una seria preocupación (Usero *et al.*, 2003).

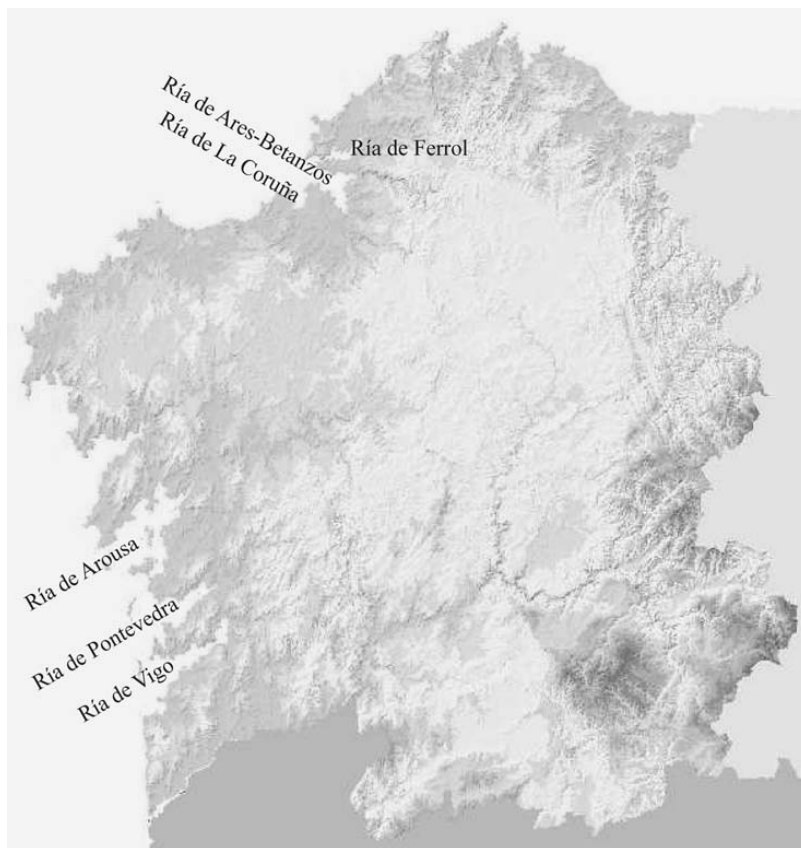


Figura 1. Mapa de Galicia donde se muestran las zonas con un mayor aumento en la concentración de metales procedentes de fuentes antropogénicas.

Biodisponibilidad y bioacumulación de metales

Los organismos marinos tienden a acumular metales del medio, siendo igualmente importante en este proceso la forma química del metal como su biodisponibilidad. Por encima de cierto umbral de biodisponibilidad todos los metales son tóxicos. La toxicidad del metal depende de la actividad iónica del metal libre más que de su concentración, puesto que puede estar unido tanto a complejos orgánicos como inorgánicos. El equilibrio entre estas especies metálicas es intercambiable y depende de numerosos factores físico – químicos que controlan la biodisponibilidad del metal:

- Como regla general, las altas *temperaturas* y la baja *salinidad* actúan de forma sinérgica con los metales para aumentar la toxicidad (McLusky *et al.*, 1986). La alta toxicidad de metales como Cd, Cr, Pb, Hg, Ni, y Zn a bajas salinidades es atribuida normalmente a una acumulación más rápida de estos metales siendo de mayor importancia en los estuarios.

- El *potencial redox* también puede influir enormemente en la especiación, disponibilidad y, por tanto, en la toxicidad del metal, sobre todo en sedimentos. Las condiciones anóxicas están frecuentemente acompañadas por unas altas concentraciones del metal en lugares contaminados (Neuhoff, 1983).

- La presencia de otros metales o contaminantes también pueden influir en la toxicidad del metal mediante *interacciones* tanto *antagónicas* como *sinérgicas* (Sunda y Huntsman, 1996).

- El pH del medio influye en la solubilidad del metal y por tanto en su disponibilidad. Collins *et al* (2003) observaron que una disminución del pH en un suelo calcáreo provocaba un considerable incremento en el Cd biodisponible.

Asimismo la biodisponibilidad depende de factores intrínsecos que varían tanto intraespecíficamente como interespecíficamente; entre estos factores destacan la impermeabilidad de la superficie, el estado nutricional, fase del ciclo vital o muda... muchos de ellos, al mismo tiempo afectados por factores físico-químicos.

La entrada de metales en los organismos puede ser vía ingestión de comida o material particulado con metales adsorbidos o directamente de los sedimentos o aguas intersticiales. Tras estudiar los niveles de metales en una cadena trófica en la zona de la Antártica, se observó que los niveles de metales en el krill determinaba los niveles de los mismos en las especies de los eslabones superiores, así el cadmio está casi ausente en los huevos pero aumenta rápidamente con el tiempo, en las crías de aves (Nygard *et al.*, 2001).

La capacidad de los diferentes organismos marinos para retirar, almacenar o destoxificar metales contaminantes varía considerablemente. La acumulación de metales por ciertos organismos ha mostrado ser útil en la valoración de la contaminación de aguas y sedimentos. Las especies empleadas para monitorizar los niveles de contaminantes son conocidas como bioindicadores, indicadores bioacumulativos, biomonitores u organismos señalizadores. Estas especies deben cumplir unos requisitos para ser considerados eficientes bioindicadores: deben ser buenos acumuladores, reflejar la biodisponibilidad en el ambiente, estar ampliamente distribuido geográficamente y ser fácilmente identificables taxonómicamente (Kennish, 1997). Asimismo, esta capacidad de acumulación de diferentes organismos acuáticos ha demostrado ser útil en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales.

Efectos tóxicos de los metales

Paracelso, físico del siglo XVI, fue recriminado por haber tratado a sus pacientes con arsénico y mercurio, que se sabía eran tóxicos. Paracelso respondió con una afirmación todavía repetida 500 años más tarde: “Todas las sustancias son venenos.

No hay ninguna que no sea veneno. La dosis correcta diferencia un veneno y un remedio.” Por tanto, una regla conveniente podría ser “la dosis hace el veneno” Así, una sustancia considerada “no-tóxica” puede ser tóxica a una dosis suficientemente alta y una sustancia extremadamente tóxica puede ser segura si la dosis es suficientemente baja. Así, metales como el cobre, el zinc, el cobalto, el hierro o el manganeso son oligoelementos cuya presencia en pequeñas cantidades en la naturaleza es esencial para la vida pero resultan tóxicos en concentraciones elevadas. Sin embargo, otros metales como el mercurio, el cadmio, el plomo o el arsénico no tienen función biológica conocida y pueden ser tóxicos en dosis mínimas.

El umbral de toxicidad para cada metal depende de la especie biológica, tiempo, vía de exposición, concentración y forma química del metal en el medio ambiente.

Los metales son *elementales* por lo que una vez dispersos en la biosfera no pueden ser degradados, siendo por lo tanto bioacumulados y transferidos a lo largo de la cadena trófica lo que ha llevado a serios problemas ecológicos y de salud. La exposición de los diferentes organismos a niveles tóxicos de metales contaminantes produce un amplio rango de respuestas patológicas como inflamación y degeneración de tejidos, insuficiencia en la reparación y regeneración de tejidos dañados y trastornos genéticos. Asimismo pueden producir inhibición del crecimiento y cambios en la fisiología, reproducción y desarrollo. Elevados niveles de los metales también puede afectar al metabolismo respiratorio, al comportamiento alimentario y a la eficiencia digestiva (Kennish, 1997).

Los metales pueden ejercer sus efectos deletéreos de distintas formas, aunque la mayoría de los mecanismos de toxicidad son consecuencia de las fuertes propiedades de coordinación de los iones metálicos (Ochiai, 1987). Los efectos de los metales pueden ser:

- Bloqueo de grupos de biomoléculas esenciales mediante la unión a grupos funcionales como los grupos –SH. Por ejemplo, el mercurio puede inactivar enzimas

como la fosfatasa alcalina o la glucosa-6-fosfatasa mediante su unión al grupo –SH (Fisher y Jones, 1981).

- Desplazamiento/sustitución de iones metálicos esenciales en biomoléculas. Esta sustitución se ve favorecida por un exceso celular del metal contaminante y una deficiencia del metal esencial. Si el dominio de unión está geoméricamente comprimido la sustitución isomórfica puede producirse entre iones de tamaño similar (Pb\Cd por Ca). En otras situaciones en que el dominio de unión tiene una estructura menos rígida (por ejemplo, en una proteína), la sustitución requiere que los dos metales muestren una química de coordinación comparable (Sr por Mg; Au por Cu) (Ilangovan *et al.*, 1992).

- Modificación de la conformación activa de las biomoléculas. Por ejemplo, el mercurio reacciona con las uniones disulfuro, que son de gran importancia en la integridad estructural y geométrica de proteínas, disminuyendo su actividad biológica (Mason y Jenkins, 1995).

Retirada de los metales del medio

Las cada vez más estrictas regulaciones medioambientales obligan a las industrias a cambiar a métodos de producción más limpios, demandando el desarrollo de técnicas de tratamiento de efluentes ricos en metales eficientes y de bajo coste. En la tabla 2 se presentan algunas de las ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas actualmente en la retirada de metales.

Las tecnologías utilizadas actualmente en la retirada de metales de efluentes industriales son inadecuadas, creando problemas secundarios con fangos cargados de metales muy difíciles de desechar. Requieren una manipulación, métodos de eliminación y espacios especiales.

Tabla 2. Métodos convencionales de retirada de metales.

Método	Desventajas	Ventajas
Precipitación química y filtración	Para altas concentraciones, difícil separación, técnica no efectiva, produce fangos	Sencilla y barata
Oxidación química o reducción	Requiere químicos, sensible a las temperaturas	Mineralización
Tratamiento electroquímico	Para altas concentraciones, caro	Recuperación del metal
Osmosis reversa	Altas presiones, necesita escalado de membranas, caro	Efluente puro (para reciclar)
Intercambio iónico	Sensible a partículas, resinas caros	Efectivo, posible recuperación de metales
Adsorción		Convencional, material utilizado: carbón
Evaporación	Necesita gran cantidad de energía, caro, produce fangos	Efluente puro (para reciclar)

El interés por eliminar las numerosas desventajas de las técnicas físico-químicas ha promovido un extenso estudio de métodos biológicos para la retirada de metales. La flexibilidad en el manejo de los parámetros físico-químicos de los efluentes, selectividad para retirar solo los metales deseados y la relación efectividad-coste son algunas de las ventajas de las técnicas biológicas de limpieza.

Bacterias, microalgas marinas y levaduras se encuentran entre los microorganismos estudiados como posibles bioacumuladores. Los microorganismos juegan un papel fundamental en la transformación de iones metálicos en el ambiente. Las células liberan compuestos orgánicos, así como diversos productos de la biodegradación de diferentes compuestos, que actúan como agentes complejantes y disminuyen la toxicidad. Diversos procesos metabólicos, como la fotosíntesis,

respiración, captación de nutrientes, etc. tienen lugar durante el crecimiento celular. Todos ellos influyen en el equilibrio entre los iones metálicos libres y las formas unidas, así como en la sedimentación y redisolución en medios acuáticos. Dichos microorganismos son capaces de soportar la toxicidad producida por los metales, al tiempo que son capaces de acumular una elevada concentración de estos (Kaplan, 2004).

La retirada de metales por estos microorganismos es un proceso bifásico. La primera fase es adsorción a materiales extracelulares asociados a la célula como polisacáridos, mucílagos... y a componentes de la pared celular como grupos hidróxido, carboxilo y sulfato. Este es un proceso rápido y no metabólico que ocurre en células vivas y no-vivas y se denomina bioadsorción. La segunda fase es la acumulación en el interior celular o bioacumulación. Este es un proceso lento que implica un transporte activo a través de las membranas celulares hacia el interior y posterior unión a moléculas intracelulares. Es un proceso dependiente del metabolismo celular que es inhibido por bajas temperaturas, ausencia de una fuente de energía, inhibidores metabólicos y desacopladores y que ocurre solo en células vivas.

La aplicación tanto de biomasa viva como muerta en el tratamiento de aguas residuales, para obtener una técnica biológica eficiente y con una adecuada relación coste-efectividad, ha recibido un gran interés. Son numerosos los estudios que muestran la viabilidad del uso de ambos tipos de biomasa como biomaterial para la retirada de metales (Holan y Volesky, 1995; Hu *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2003).

La unión a biomasa muerta es un proceso pasivo, en el que los metales se unen a los diferentes grupos funcionales de los componentes de la superficie celular (grupos carboxilo y sulfato). Se utiliza de manera similar a los adsorbentes sintéticos por lo que no es un proceso selectivo. Sin embargo, es un proceso rápido y reversible que permite la regeneración del biomaterial utilizado.

La retirada de metales mediante células vivas tiene lugar por procesos tanto activos, que requieren energía (el metal penetra en el interior celular), como pasivos (el metal se une a la superficie celular). El uso de este tipo de biomasa puede asegurar una mejor retirada del metal mediante la combinación de bioprecipitación, bioadsorción y una continua entrada de metales en el interior celular o bioacumulación. Asimismo, la acumulación del metal en el interior celular supone un menor riesgo de liberación del metal al medio (Malik, 2004).

Cadmio

El cadmio fue descubierto en 1817 por el químico alemán F. Strohmeyer. Es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, con una concentración media de 0.1 mg/Kg en la corteza terrestre que raramente se encuentra en estado puro.

El cadmio es un metal de transición que pertenece al grupo IIB de la tabla periódica, en el cual se incluye el zinc y el mercurio. Es un metal blando, maleable, de color blanco grisáceo, que cristaliza en el sistema hexagonal. Sus principales propiedades físico-químicas se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del cadmio.

número atómico	48
peso atómico	112.4
densidad a 20 °C	8.64 g/cm ³
punto de fusión	320.9 °C
punto de ebullición	767°C
radio iónico	0.97 Å
estado de oxidación	+2
electronegatividad	1.7
isótopos más comunes	¹¹² Cd, ¹¹⁴ Cd

El cadmio puede formar numerosas sales. Algunas de las sales de cadmio son prácticamente insolubles en agua, como las de sulfuro, carbonato u óxidos. Estas sales en contacto con ácidos u oxígeno pueden convertirse en solubles; así, los sulfatos, nitratos y halógenos son solubles en agua. Su movilidad en el medio ambiente y efectos en el ecosistema depende de la naturaleza de estas sales.

Concentración y procedencia del cadmio en ambientes naturales

El cadmio es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una concentración media de 0.1 mg/Kg. Sin embargo, se han encontrado concentraciones muy superiores en rocas sedimentarias: las rocas fosfatadas marinas pueden presentar concentraciones de hasta 15 mg/Kg.

La erosión de las menas de los diferentes minerales con cadmio (las menas de zinc, plomo y cobre son las principales fuentes naturales de este metal) y su posterior transporte a los océanos a través de los ríos, representa la mayor fuente de cadmio en el ciclo de este metal. Se ha estimado un aporte global anual de 15000 toneladas.

La actividad volcánica es otra de las mayores fuentes naturales de cadmio. Se ha estimado un flujo anual global de 100 a 500 toneladas. En suelos volcánicos se han medido concentraciones de hasta 4.5 mg/Kg. La actividad volcánica en los fondos marinos también es una fuente natural de descarga de cadmio al medio marino.

En áreas alejadas de menas de minerales y zonas volcánicas, la concentración de cadmio en la superficie de suelos no contaminados alcanza valores entre 0.1 y 0.4 mg/Kg.

En ambientes marinos, la concentración natural de cadmio se sitúa en niveles de ultra traza. En aguas superficiales puede alcanzar concentraciones menores de 5 ng/L. La distribución vertical del cadmio disuelto en aguas oceánicas se caracteriza por una disminución drástica en la superficie y enriquecimiento a medida que aumenta la profundidad. Esta distribución se considera resultado de la bioacumulación de cadmio por el fitoplancton en aguas superficiales y posterior transporte a las profundidades mediante la incorporación a desechos biológicos. Los sedimentos oceánicos pueden contener elevadas cantidades de cadmio como resultado del aporte asociado a los desechos biológicos. Se han medido concentraciones superiores a 5 mg/Kg en sedimentos de ríos y lagos y de 0.03 a 1 mg/Kg en sedimentos marinos. La

remineralización de los nutrientes, debido a la descomposición de la materia orgánica acumulada en los sedimentos, supone una nueva puesta en circulación del cadmio en la columna de agua.

Contaminación medioambiental por cadmio

Entre las características más notables del cadmio se encuentra su gran resistencia a la corrosión, su bajo punto de fusión y sus excelentes propiedades como conductor eléctrico. Los compuestos de cadmio presentan una gran resistencia a agentes químicos y a altas temperaturas. Finalmente, los pigmentos a base de cadmio producen una intensa coloración amarilla, naranja y roja, siendo muy usados como pigmentos en vidrio, plásticos, cerámicas y esmaltes.

Debido a estas adecuadas características, el cadmio se utiliza mayoritariamente en pinturas y plásticos (PVC) para darles estabilidad frente a la luz UV y al calor, procesos de galvanizado, baterías recargables (Ni-Cd), aleaciones, semiconductores, como sustancia fosforescente en tubos de TV, en reactores nucleares como absorbente de neutrones y en células solares para la conversión directa de luz en energía eléctrica. Su utilización en procesos industriales ha supuesto un importante aumento de las concentraciones en el medio ambiente. Esto es debido a que menos del 10 % del cadmio usado en estos productos primarios es reciclado y se asume que el resto es liberado al medio ambiente desde una gran variedad de fuentes:

- humo, polvo y aguas residuales de la extracción y refinado de plomo y zinc, así como de la producción de cadmio.

- agua de lavado del galvanizado

- las industrias del hierro, acero y metales no férricos liberan humo, polvo, aguas residuales y fango que contienen cadmio.

- el zinc usado en recubrimientos galvanizados de metales contienen un 2 % de cadmio como una impureza. Se estima que todo este cadmio es liberado al medio ambiente debido a la corrosión después de 4-8 años.

- los fertilizantes fosfatados, extraído de rocas fosfatadas que presentan una gran concentración de cadmio, son una de las fuentes de redistribución del metal presente en estas rocas.

- el fango de aguas residuales

- la quema de petróleo

Efectos tóxicos del cadmio

Todas las formas de vida, incluyendo microorganismos, plantas, animales y el hombre se ven afectados por la presencia de cadmio en el medio (Ramo *et al.*, 1993). La toxicidad del cadmio depende de numerosos factores medioambientales. La presencia de sedimentos, materia orgánica o altas concentraciones de sales disueltas reduce la disponibilidad del cadmio, y por tanto, su impacto tóxico. En los suelos, la presencia de arcillas, protege a los diferentes organismos del impacto tóxico de este metal. En medios acuáticos, la salinidad y la dureza del agua disminuyen su biodisponibilidad y el impacto tóxico de este metal, mientras que la temperatura favorece su bioacumulación y, por tanto, sus efectos tóxicos. La forma libre del metal, que es la biodisponible, es la forma más tóxica. Cualquier proceso que acelere su transformación a una forma unida supone una reducción en la toxicidad para la biota.

Un ejemplo de los efectos tóxicos del cadmio en el hombre lo encontramos en la denominada enfermedad Itai-Itai. En Japón, el cadmio procedente de una fundición contaminó el agua de irrigación. La cosecha de arroz irrigada con este agua contaminada contenía hasta 1.02 mg/L de cadmio. La enfermedad provocada por el consumo del arroz afectó primero a las mujeres mayores y de mediana edad y se

caracterizó por la extrema fragilidad de sus huesos, con fracturas espontáneas, deformidad y extremo dolor en los huesos. Esta enfermedad provocada por el cadmio, afectó a cientos de personas (Francis, 1994). Tal ha sido la preocupación por los efectos provocados por el cadmio ingerido en la dieta que han sido repetidamente evaluados en la “FAO/WHO Joint Meeting of Experts on Food Additives and Contaminants (JECFA, 1972, 1989, 1993, 2001, 2003)”. Este comité recomendó como PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake) una cantidad de 7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal.

Los efectos teratogénicos sobre animales parecen más importantes para el cadmio que para otros metales, describiéndose numerosas malformaciones en aves y mamíferos. Un estudio realizado en las Montañas Rocosas de Colorado reveló que la perdiz blanca presentaba daños renales y alta mortalidad de los pollos; estas aves se alimentaban de brotes de sauce que presentaban una concentración de cadmio de 2.1 mg/L (peso seco) (Larison *et al.*, 2000). En musarañas atrapadas cerca de una factoría de aleaciones de cobre y cadmio se detectaron importantes lesiones en tejidos; en estos organismos se midieron entre 300 y 1000 $\mu\text{g Cd/g}$ de peso seco en el hígado y de 150 a 560 $\mu\text{g Cd/g}$ de peso seco en el riñón (Klaine y Lewis, 1995b).

Los productores primarios son un nivel trófico esencial de cualquier ecosistema tanto terrestre como acuático por lo que los posibles efectos en algas y plantas son particularmente críticos. Se han llevado a cabo numerosos estudios relativos al efecto del cadmio en estos organismos. Entre los efectos observados se incluyen: reducción del crecimiento (Okamoto *et al.*, 1996), reducción en el transporte electrónico fotosintético y de la fijación del carbono fotosintético (De Filippis y Ziegler, 1993), inhibición de las enzimas debido al desplazamiento de metales esenciales (Jeanne *et al.*, 1993), disminución en la entrada nutrientes (Husaini y Rai, 1991) y desarrollo morfológico anormal (Guanzón *et al.*, 1994).

De forma general, el modo de acción del cadmio se basa en la competición con otros metales, especialmente con el zinc, hierro, cobre y calcio. El cadmio, por

ejemplo, desplaza al zinc como cofactor de ciertas reacciones enzimáticas, perturbando sus funciones normales (Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001). Este metal también compite de forma activa con el calcio en los sistemas enzimáticos implicados en la contracción muscular, sobre todo a nivel de las fibras musculares lisas vasculares. También ejerce una acción competitiva con el hierro y el cobre como cofactor del sistema enzimático de las monoaminooxidasas, disminuyendo su actividad (Foster y Morel, 1982; Franklin *et al.*, 2002).

Asimismo, el cadmio por presentar una gran afinidad por los grupos tiol (-SH), altera el metabolismo de los aminoácidos sulfurados e inhibe el funcionamiento de numerosas enzimas (ATPasas, deshidrogenasas, anhidrasa carbónica, etc.) cuyo grupo funcionalmente activo es el grupo tiol (Vymazal, 1987).

Microalgas, productores primarios esenciales

Las microalgas son algas eucariotas unicelulares muy abundantes en medio ambientes naturales y adaptadas a un amplio rango de hábitats: agua dulce y salada, efluentes industriales y domésticos, marismas y humedales artificiales. Son productores primarios y por tanto forman parte de un nivel trófico esencial. Alteraciones de la composición de las especies de la comunidad fitoplanctónica como resultado de un impacto tóxico puede alterar la estructura y funcionamiento de un ecosistema (Kennish, 1997).

Estos microorganismos juegan un papel importante como organismos modelo en biología molecular, genética, bioquímica, biología celular y biología del desarrollo debido a sus simples requerimientos para crecer, tasas de crecimiento rápido y sincronización en el ciclo celular. Por estos mismos motivos se utilizan en acuicultura para alimentación de larvas, rotíferos..., en agricultura para mejorar la textura de los suelos, en aplicaciones biotecnológicas como producción de químicos o nutrientes o en el tratamiento de aguas residuales y como organismos test para monitorizar la calidad del agua (Richmond, 2004).

Las microalgas son muy sensibles a la toxicidad por metales pues afectan a casi todos los aspectos de su metabolismo, crecimiento y diferenciación, por lo que son a menudo usadas como sensores biológicos para detectar potenciales efectos tóxicos de los metales.

Estos organismos han desarrollado medios para transformar los metales tóxicos en una forma inocua, para lo que poseen diversos mecanismos como son adsorción a componentes de la pared celular, secreción de compuestos orgánicos quelantes de metales, unión a componentes intracelulares específicos y/o transporte a compartimentos celulares específicos.

Pruebas de toxicidad microalgales

Las microalgas se encuentran entre los organismos más utilizados para evaluar la toxicidad de los diversos agentes químicos que son liberados al mar. Esto es debido a que tienen un ciclo de vida corto y no se requieren grandes volúmenes de cultivo.

El principio fundamental sobre el que se basan todas las pruebas de toxicidad microalgales es el reconocimiento de que la respuesta de los organismos vivos a la presencia (exposición) de agentes tóxicos depende de la dosis del mismo. Las pruebas de toxicidad aguda evalúan la relación respuesta-concentración para la supervivencia, siendo la concentración efectiva media (EC50) o concentración letal (LC) los valores calculados más a menudo; mientras que los estudios crónicos evalúan efectos subletales a través del crecimiento o efectos bioquímicos (actividad fotosintética...) y están diseñados para calcular la concentración que no produce efectos adversos.

La mayoría de los estudios de toxicidad crónica se basan en el efecto del tóxico en el crecimiento algal. Al comparar 4 tipos de pruebas de toxicidad crónica usando microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), bacterias (*Microtox*) e invertebrados (*Brachionus calyciflorus* y *Daphnia*), la evaluación del crecimiento microalgal resultó ser el tipo de test o prueba más sensible (Radix *et al.*, 2000).

Sin embargo, las pruebas de toxicidad aguda son más frecuentes que las pruebas de toxicidad crónica. El diseño básico de todas estas pruebas es similar para la mayoría de los métodos: el efecto de un tóxico, normalmente cinco concentraciones, se determina durante el crecimiento exponencial en el periodo que dura la exposición. La microalga se cultiva en un medio enriquecido con nutrientes bajo condiciones controladas de pH, luz y temperatura. La respuesta de la biomasa es directa o indirectamente determinada usando medidas como peso seco, recuento celular y clorofila *a* (Klaine y Lewis, 1995a).

Potencial aplicación de las microalgas en procesos de biorremediación

En la actualidad se acepta que las biotecnologías basadas en procesos naturales tienen numerosas ventajas sobre las técnicas físico-químicas tradicionales aplicadas en el tratamiento de aguas contaminadas con metales.

Las microalgas tienen una destacable habilidad para acumular metales del medio que las rodea. Diversos estudios han estudiado el posible uso de microalgas, tanto biomasa viva como células muertas, para retirar metales de aguas contaminadas (Travieso *et al.*, 1999; Hamdy, 2000; Radway *et al.*, 2001).

Biomasa microalgal no-viva ha sido exitosamente usada como material adsorbente llegándose incluso a comercializar un producto denominado algaSORB®, constituido con biomasa algal (Kaplan, 2004). La ventaja de este tipo de biomasa algal es que los metales unidos a la superficie de la pared celular pueden ser recuperados y el biomaterial utilizado puede ser reutilizado. La capacidad de unión de metales de los diferentes biomateriales depende de la composición de la pared celular del organismo y por tanto, también de la composición química de la solución metálica que debe ser tratada (Klimmek *et al.*, 2001). Por lo tanto, para elegir el más adecuado biosorbente es esencial saber que metales están presentes y la concentración de los mismos.

La capacidad de las microalgas vivas para retirar metales del medio está ampliamente estudiada y aceptada (Kaplan, 2004). Durante el crecimiento celular, los metales son retirados del medio ambiente y acumulado en las células mediante tanto procesos no metabólicos como dependientes del metabolismo celular. Proporcionando condiciones ambientales adecuadas para mantener el crecimiento celular como luz, temperatura y pH, el uso de biomasa viva de microalgas ofrece un método, simple, eficiente y no costoso. Entre las diferentes técnicas desarrolladas para obtener un método adecuado para la retirada de metales con microalgas vivas, cabe destacar el diseño de un reactor con células microalgales inmovilizadas que sus diseñadores denominaron BIOALGA (Travieso *et al.*, 2002). Utilizando este biorreactor con la microalga *Scenedesmus obliquus* como bioacumuladora consiguieron una eficiencia

máxima en la retirada de cobalto del 94.5 % tras 10 días, disminuyendo la concentración de este metal en el medio de 3000 $\mu\text{g/L}$ a 165 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, los exámenes realizados a diferentes especies microalgales muestran que la eficacia en la retirada del metal depende de la especie algal y del metal. Así, la cianobacteria *Cyanidium caldarium* y la microalga *Scenedesmus quadricauda* retiraron más del 90 % de la concentración inicial de Cd^{+2} , mientras que *Mastigocladus laminosus* resultó la más eficaz en la retirada de Al^{+3} (>90 %) (Radway *et al.*, 2001).

La búsqueda de una cepa adecuada puede incrementar potencialmente la retirada de metales específicos de las aguas residuales. Asimismo, entender el mecanismo de resistencia a metales de estos microorganismos, puede proporcionar mejores estrategias para su retirada del medio ambiente y facilitar la búsqueda de una cepa adecuada que permita una eficiente retirada de metales de las aguas residuales.

Mecanismos de tolerancia a metales

La tolerancia a metales representa un proceso celular o fisiológico que impide, atenúa, reduce o elimina los efectos tóxicos inducidos por los metales. Se han identificado diferentes mecanismos que ofrecen a células y organismos protección contra la intoxicación por metales. Estos mecanismos se basan en dos estrategias principales: limitar la acumulación del metal y unir de forma inocua el metal a ligandos celulares.

Los principales mecanismos de tolerancia a metales presentes en células microalgales son:

- Unión del metal a la superficie celular, evitando de esta manera que penetre en el interior de la célula (Garnham *et al.*, 1992). Los metales pueden unirse electrostáticamente a cargas de la superficie celular y formar uniones más o menos estables que impiden la entrada del metal al interior celular. Un claro ejemplo lo encontramos en la cianobacteria *Cyanidium caldarium*, adaptada a vivir en aguas de drenaje de minas con bajo pH y ricas en metales (Cu, Ni, Cr, Al); bajo estas condiciones, este microorganismo puede acumular metales hasta el punto de suponer el 20 % del peso seco celular, gracias a que los metales se adhieren a la membrana celular externa donde se incorporan a microcristales de sulfuros metálicos.

- Cambios en la permeabilidad de la membrana, que alteran la incorporación del metal (Mason y Jenkins, 1995). La incorporación de metales esenciales presenta en la mayoría de los casos una cinética de saturación, lo que indica un mecanismo de transporte mediado por un transportador. Así, la entrada de metales esenciales o no esenciales puede ser mediada por transportadores poco específicos o por difusión pasiva (tanto mediada por transportador como sin él). Cambios en la composición y la estructura de la membrana pueden prevenir la incorporación pasiva de algún metal o al menos reducir su entrada. Cepas resistentes al cobre del alga parda filamentosa

Ectocarpus siliculosus, son capaces de excluir grandes concentraciones de este metal produciendo el denominado efecto “fouling” (Mason y Jenkins, 1995).

- Complejación de los iones metálicos mediante la excreción de metabolitos. Es un hecho muy conocido que muchos organismos liberan significantes cantidades de compuestos capaces de quelar o precipitar los metales (SH_2 , oxalato, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, compuestos fenólicos). Algunas especies de microalgas (*Euglena gracilis*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*) tienen la capacidad de reducir la incorporación del cobre limitando la concentración del ion cúprico en la superficie del agua de mar mediante la excreción de compuestos ligantes de cobre.

- Los metales también se pueden acumular en gránulos o vacuolas (Klerks y Bartholomew, 1991). Estos gránulos suelen ser de mayor densidad que las estructuras celulares que los rodean y varían en forma, composición y localización. El almacenamiento de metales en determinados orgánulos donde no se produzcan reacciones metabólicas importantes, constituye también un mecanismo para impedir el contacto de metales con las dianas celulares. La microalga *Scenedesmus acutiformis* acumula el cobre principalmente en vacuolas.

- Alteraciones en el metabolismo celular. Existe la posibilidad de que un proceso metabólico sensible a algún metal no se vea afectado gracias a que se activa una ruta metabólica alternativa. Asimismo, se puede incrementar la síntesis de una enzima para contrarrestar la que se va perdiendo como consecuencia de la unión del metal tóxico, o incluso cambios en la estructura de la enzima que la hagan menos afín por el metal (Seiler *et al.*, 1988).

- Desarrollo de mecanismos de transporte activo que mantienen los niveles de metal a bajas concentraciones intracelulares. Estos sistemas eliminan el exceso de metal mediante bombas de transporte que pueden ser más o menos específicas o

mediante la excreción del metal en forma de complejos moleculares (Waiwood *et al.*, 1987; Rea *et al.*, 1998).

- Transformaciones químicas del metal de manera que una forma más tóxica de un metal es convertida enzimáticamente en una forma menos tóxica mediante reacciones de oxidación, reducción o metilación (Sunda y Gessner, 1989). Este proceso se denomina biotransformación. *Chlamydomonas* reduce enzimáticamente el Hg^{+2} a Hg^0 que es volátil. En algunas cianobacterias se observó la reducción de Cr^{+6} y As^{+5} a las formas menos tóxicas Cr^{+6} y As^{+5} respectivamente.

- Unión de metales a ligandos celulares. La resistencia a metales también puede resultar de la capacidad de hacer frente a grandes cantidades de metales en el interior celular. Una vez en la célula se unen ligandos endógenos que unen el metal de manera inocua y reversible y/o son transportados a compartimentos celulares específicos. El malato, el citrato, el polifosfato, el glutatión, diversos aminoácidos y las fitoquelatinas se han identificado como agentes quelantes intracelulares en microalgas (Mason y Jenkins, 1995).

Metalotioneínas

Las metalotioneínas son proteínas o polipéptidos de bajo peso molecular y ricas en cisteína capaces de unir iones metálicos al grupo -SH de la cisteína. Presentan, por tanto, un importante papel en la detoxificación de metales.

Las metalotioneínas fueron originalmente aisladas de tejidos del riñón de caballo (Kagi *et al.*, 1974) y posteriormente identificadas en distintas especies del reino animal: mamíferos (Kwoh *et al.*, 1988), reptiles, anfibios, peces, moluscos (Roesijadi *et al.*, 1991), etc. Otras proteínas, ricas en cisteína, pero no homólogas a las primeras metalotioneínas fueron identificadas en hongos. Asimismo, polipéptidos ricos en cisteína, estructuralmente diferentes a las primeras metalotioneínas, fueron identificados en plantas (Grill *et al.*, 1985), hongos (Al-Lahham *et al.*, 1999) y algas

eucariotas (Gekeler *et al.*, 1988) y se denominaron cadistinas o fitoquelatinas. Todos estos compuestos se clasifican como metalotioneínas, que se agrupan en tres clases en función de su estructura primaria y modo de síntesis:

- Clase I. Son productos de la transcripción de ARNm. En su estructura contiene 20 residuos de cisteína altamente conservados. Están ampliamente extendidas entre los vertebrados.

- Clase II. Se diferencian de la clase I en que no presentan esa estricta distribución de los residuos de cisteína. También son productos de la transcripción de ARNm. Se han encontrado en invertebrados, levaduras y plantas.

- Clase III. Son polipéptidos sintetizados enzimáticamente y no transcripcionalmente. Aparecen en levaduras, plantas superiores y algas eucariotas.

Metalotioneínas de clase III

Las metalotioneínas de clase III son polipéptidos que se componen de repeticiones del dipéptido γ -glutamilcisteína con un solo residuo carboxi-terminal de glicina presentando la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n varía de 2 a 11, siendo esta longitud característica de las especies (figura 2). Estos polipéptidos han recibido alternativamente el nombre de cadistinas, fitoquelatinas (PCs), péptidos γ -glutámicos, poli-(γ -glutamil-cisteinil)-glicinas y fitometalotioneínas. El término más habitual es el de fitoquelatinas.

Aunque en la mayoría de especies donde se han aislado fitoquelatinas, estas presentan como aminoácido terminal glicina, se han identificado otras variantes estructurales en que el aminoácido glicina es sustituido por serina (Klapheck *et al.*, 1994), β -alanina (Klapheck *et al.*, 1995) o glutámico (Meuwly *et al.*, 1993). Asimismo, es frecuente la aparición de las denominadas fitoquelatinas desgliciladas que no presentan aminoácido terminal (Maitani *et al.*, 1996).

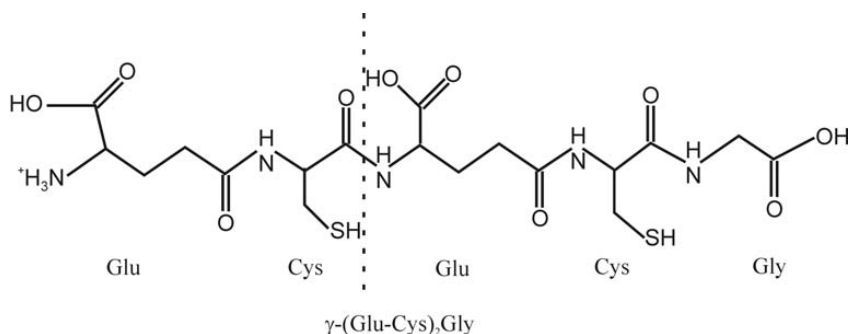
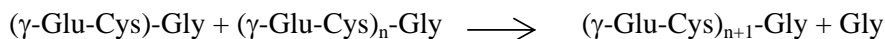


Figura 2. Estructura de una fitoquelatina con 2 subunidades de $(\gamma$ -Glu-Cys).

Las fitoquelatinas están estructuralmente relacionadas con el glutatión (GSH, γ -(Glu-Cys)_n-Gly). Diversas investigaciones han llevado a sugerir que este péptido podría ser el sustrato en la síntesis de fitoquelatinas: disminución del GSH disponible después de la adición del metal al medio, sensibilidad a metales tras la exposición a BSO, un conocido inhibidor de la síntesis de glutatión, mutantes de levadura incapaces de sintetizar GSH resultaron sensibles a metal. El papel del GSH como precursor se confirmó con el aislamiento de la enzima γ -glutamylcysteína dipeptidil transpeptidasa (fitoquelatín sintasa) de cultivos de células de plantas (Grill *et al.*, 1989). Este enzima se activa en presencia de iones metálicos polimerizando moléculas de GSH para formar $(\gamma$ -Glu-Cys)_n-Gly (Chen *et al.*, 1997) como se muestra en la siguiente reacción:



La enzima transfiere el dipéptido γ -Glu-Cys desde una molécula de GSH a otra para crear un oligómero de $n = 2$. Posteriormente, la cadena se alarga mediante la unión enzimática de γ -Glu-Cys adicionales al terminal carboxilo de la cadena peptídica. Se asume que las diferentes variantes estructurales conocidas de las fitoquelatinas (que varían en el aminoácido terminal) se sintetizan de manera análoga a las fitoquelatinas. Así, las homofitoquelatinas (que presentan la alanina como aminoácido terminal) tendrían como precursor el homoglutaratión.

Estos péptidos han sido identificadas en una gran variedad de especies de plantas (Szalai *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Carrier *et al.*, 2003; Ederli *et al.*, 2004; Wójcik *et al.*, 2005), macroalgas (Rijstenbil *et al.*, 1993; Hu y Wu, 1998), levaduras (Inouhe *et al.*, 1996; Al-Lahham *et al.*, 1999) y microalgas (Ahner *et al.*, 1995; Knauer *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001; Scarano y Morelli, 2002). Asimismo, aunque no se ha detectado actividad de la enzima, se han identificado los genes que codifican para la misma en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.*, 2001) y *Caenorhabditis briggsae* (Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Las fitoquelatinas son sintetizadas intracelularmente en respuesta a la presencia de altas concentraciones de metal. La síntesis de fitoquelatinas puede ser inducida por una gran variedad de metales que incluye Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, Pb, y Zn. Sin embargo, distintos estudios muestran que el cadmio es el mejor inductor de la síntesis de estos péptidos. El ligante principal de metales en los complejos metalotioneína-metal es el grupo -SH del residuo de la cisteína. La elevada absorbancia en el rango de 240-255 nm es indicativa de la presencia de tiolatos metálicos en esta estructura. La incorporación de sulfuro en los complejos metalotioneína-Cd da como resultado la formación de cristales S₂Cd, los cuales pueden almacenar el metal de una forma inocua mucho más eficaz, actuando los péptidos como recubrimiento de esos cristales (Ortiz *et al.*, 1992). Una vez que el cadmio es quelado por las fitoquelatinas, diversas evidencias han demostrado que estos complejos son transportados hacia el sistema vacuolar. Nassiri *et al.* (1997a; 1997b) observaron que el cadmio acumulado en las vacuolas de *Tetraselmis suecica* y *Skeletonema costatum* mostraron una buena correlación entre cadmio, azufre y nitrógeno. Esto sugiere que los complejos fitoquelatina-Cd pueden estar secuestrados en el sistema vacuolar o lisosomal.

No cabe duda de que las fitoquelatinas presentan un importante papel en la detoxificación de metales. Se han propuesto otras funciones alternativas como un importante papel en la homeostasis de metales esenciales y en el metabolismo del hierro y del azufre (Zenk, 1996; Sanita di Toppi y Gabrielli, 1999). Sin embargo,

actualmente no hay evidencias directas de que las fitoquelatinas tengan funciones diferentes de la de destoxificación de metales.

Electroforesis capilar: análisis de péptidos tiólicos

El proceso de electroforesis se define como el movimiento o migración diferencial de iones por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Un electrodo positivo (ánodo) y otro negativo (cátodo) se sitúan en una solución iónica. Al aplicar voltaje a través de los electrodos, los iones de diferente carga se mueven a través de la solución hacia el electrodo de carga opuesta. La electroforesis capilar es una optimización de la técnica de electroforesis que consiste en la inyección de la muestra en un capilar de diámetro interno normalmente entre 25 y 100 μm relleno con una solución electrolítica. Una de las principales ventajas de la electroforesis capilar es la capacidad de inyectar y analizar volúmenes de muestra extremadamente pequeños, que varían de picolitros a nanolitros. Una vez inyectada la muestra en el capilar, se aplica un elevado potencial eléctrico a través del mismo y tiene lugar la separación de los iones de la muestra.

En este tipo de equipos se utilizan diferentes métodos de detección. Los métodos de detección más frecuentes es la medida de la absorbancia en el rango del UV-visible o mediante técnicas de fluorimetría, siendo los límites de detección (mol) 10^{-13} - 10^{-12} y 5×10^{-7} , respectivamente.

Las técnicas basadas en electroforesis capilar han mostrado un tremendo potencial en un amplio rango de aplicaciones, desde pequeñas moléculas que incluyen iones inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, drogas, nucleótidos, vitaminas, esteroides y carbohidratos a moléculas de gran tamaño como hormonas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células vivas. Las principales técnicas de electroforesis capilar desarrolladas y que se utilizan actualmente incluyen electroforesis capilar en zona, cromatografía capilar electrocinética micelar, isotacoforesis capilar, enfoque isoelectrico capilar y electroforesis capilar en gel.

Electroforesis capilar en zona

La electroforesis capilar en zona es la forma más sencilla de electroforesis capilar y la más utilizada. La instrumentación básica de un equipo de electroforesis capilar en zona se muestra en la figura 3.

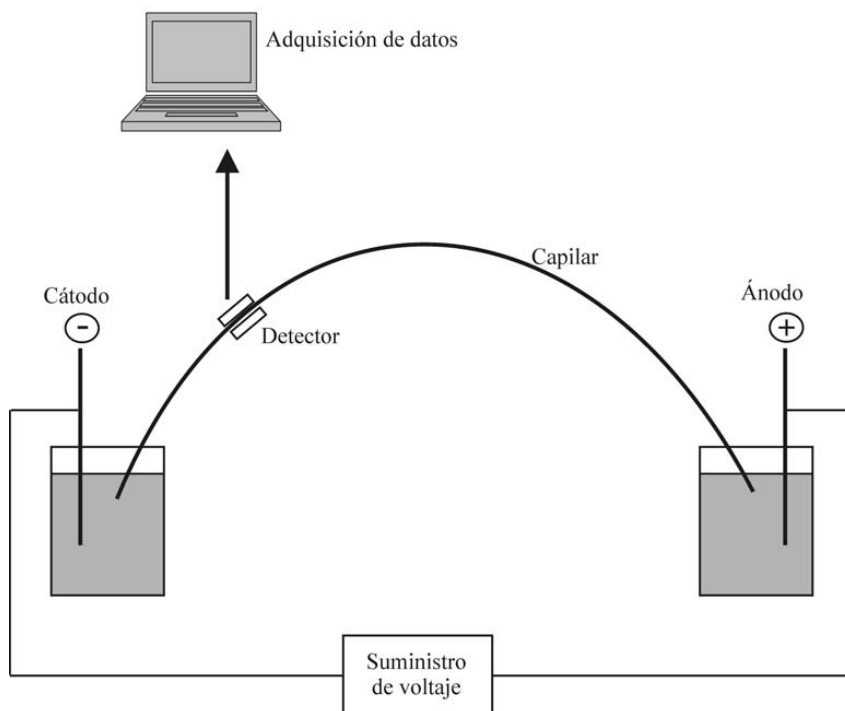


Figura 3. Representación esquemática de la organización de los principales componentes de un equipo típico de electroforesis capilar.

El equipo de electroforesis capilar consta de una fuente de energía de alto voltaje (0 a 30 kV), un capilar cubierto externamente de poliamida y con un diámetro interno $\leq 100 \mu\text{m}$, dos contenedores de tampón de separación o electrolito que puedan alojar adecuadamente el capilar, dos electrodos conectados a la fuente de energía y un detector. La muestra se aplica en una estrecha “zona” (banda) en un extremo del capilar que está rodeada del electrolito. Al aplicar un campo eléctrico en esta “zona”

donde se sitúa la muestra, cada componente de la misma migra en función de su movilidad electroforética. Los métodos de detección más frecuentes es la medida de la absorbancia en el rango del UV-visible o mediante técnicas de fluorometría.

Principales conceptos en electroforesis capilar en zona. La separación mediante electroforesis se basa en la velocidad de migración de iones y solutos. La *velocidad de migración* de un ion se puede expresar como sigue

$$v = \mu_e \cdot E$$

v es la velocidad de migración del ion (m/s), μ_e es la movilidad electroforética ($\text{m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$) y E es la intensidad del campo eléctrico (V/m).

La intensidad del campo eléctrico es una función del voltaje aplicado dividido por la longitud total del capilar. La *movilidad electroforética* es un factor que indica como de rápido se mueve un ion o soluto a través de un medio determinado (un tampón...). Es una expresión del balance de las fuerzas que actúan en cada ion individual: la fuerza eléctrica actúa a favor del movimiento y la fuerza de fricción actúa en contra del movimiento. La ecuación que describe la movilidad electroforética es

$$\mu_e = q / (6\pi\eta r)$$

q es la carga del ion, η la viscosidad y r el radio del ion. Por tanto la movilidad electroforética es proporcional a la carga del ion y es inversamente proporcional al coeficiente de fricción ($f = 6\pi\eta r$). De la anterior ecuación se deduce que la movilidad del ion dependerá de la carga y del tamaño del radio del analito. La carga del ion es fija para iones completamente disociados como ácidos o bases fuertes pero puede variar con cambios de pH en el caso de bases y ácidos débiles. Por lo tanto, el pH del electrolito es un factor determinante en la adecuada selectividad y eficiencia de separación de los componentes de una mezcla.

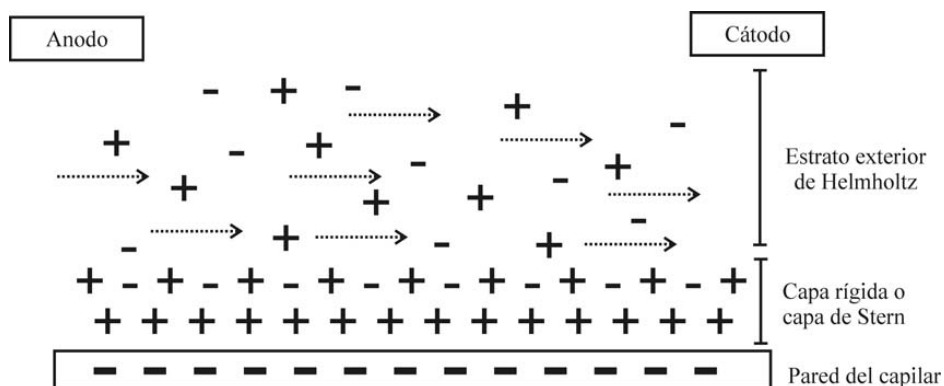


Figura 4. Modelo de distribución de la carga de la doble capa en una pared del capilar cargada negativamente que lleva a la generación del flujo electroosmótico.

Otro concepto muy importante es el *flujo electroosmótico*. La superficie interna del capilar está cubierta con grupos silanol (SiOH) que a pH mayor de 2 está ionizado formando iones SiO^- . El pH de la solución electrolítica determinará la fracción de grupos silanol que se ionizan. Las cargas negativas de la superficie atraen los iones positivos del electrolito. La capa iónica que se forma tiene una densidad de carga positiva que disminuye exponencialmente con la distancia a la pared. La doble capa eléctrica que se forma más cerca de la superficie se denomina capa de Stern y es esencialmente estática (figura 4). Una capa más difusa de cationes se forma a lo largo de la capa de Stern y se denomina estrato exterior de Helmholtz. Al aplicar un campo eléctrico, los cationes del estrato exterior de Helmholtz migran en dirección al cátodo provocando el EOF que actúa como una bomba impulsando a todas las moléculas (catiónicas, neutras y aniónicas) hacia el cátodo, reduciendo el tiempo de análisis si el detector se sitúa en el cátodo. Sin embargo, esto puede provocar una reducción en la capacidad de separación electroforética de los analitos.

La magnitud del flujo electroosmótico depende de diferentes parámetros como son el pH y la fuerza iónica. El flujo electroosmótico disminuye utilizando electrolitos con pH bajo, debido a que los grupos SiO^- de la superficie del capilar pierden la carga negativa (SiOH). Otra forma de reducir el flujo electroosmótico es recubrir el capilar

con un material que suprima la ionización de los grupos silanol como poliacrilamida o metilcelulosa.

La *movilidad aparente* de un soluto (μ_{app}) es un vector suma de la movilidad electroforética (μ_{ep}) y la movilidad electroosmótica de la solución (μ_{eo}).

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

La velocidad aparente del soluto (v_{app}) es directamente proporcional a μ_{app} y al potencial eléctrico (E) a través del capilar

$$v_{app} = \mu_{app} \cdot E$$

Por lo tanto, al no tener carga, los solutos neutrales migran en la misma dirección y velocidad que el flujo electroosmóticos y no son separados, mientras que los cationes y los aniones se separan en función de las diferencias en su movilidad aparente.

Como hemos visto, el pH es un factor fundamental en el control del flujo electroosmótico y en la carga de la molécula por lo que es uno de los factores selectivos más importantes en las separaciones electroforéticas.

Análisis de péptidos tiólicos mediante electroforesis capilar en zona

La electroforesis capilar en zona (CZE) es, actualmente, la técnica de electroseparación más frecuentemente usada para el análisis cuantitativo y cualitativo de los péptidos (Hearn, 2001; Righetti, 2001; Kasicka, 2003). La CZE ofrece varias ventajas frente al HPLC, incluyendo instrumentalización simple, requiere el uso de pequeñas cantidades de reactivos, la posibilidad de procesar volúmenes muy pequeños de muestra y tiempos de análisis cortos. Por esta razón, esta técnica es una alternativa útil para el análisis de péptidos que contienen grupos tiol.

La derivatización con monobromobimane (mBrB) previa separación con HPLC (Doring *et al.*, 2000; Cazale y Clemens, 2001; Maier *et al.*, 2003) y la derivatización post-columna con el reactivo de Ellman (Maita y Kawaguchi, 1989; Sneller *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001) son las técnicas tradicionales para el análisis de péptidos tiólicos siendo todavía utilizados para la detección y cuantificación de estos compuestos. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la electroforesis capilar en zona es una herramienta muy eficiente para el análisis de fitoquelatinas.

El primer trabajo que describe el análisis de fitoquelatinas mediante CZE fue publicado por Torres *et al.* (1997a). En este trabajo los péptidos tiólicos eran purificados mediante cromatografía de exclusión molecular y su identificación se realizó mediante CZE midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 200 nm. Posteriormente, Kubota *et al.* (1998) usaron un equipo de CZE para separar fitoquelatinas marcadas con el 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. Con este método consiguen, además, detectar fitoquelatinas desgliciladas en un corto tiempo de análisis. Sutter *et al.* (1999) utilizaron la derivatización en línea con N-etilmaleimida de los péptidos tiólicos, el método sirvió para la determinación simultánea de fitoquelatinas y sus moléculas precursoras mediante CZE. Mounicou *et al.* (2001) desarrollaron una técnica alternativa para la determinación de fitoquelatinas mediante electroforesis capilar acoplada con un espectrofotómetro de masas, lo cual permitió la caracterización estructural de estas moléculas.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar la toxicidad del cadmio sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch mediante la evaluación del efecto de este metal sobre el crecimiento.

- Evidenciar en esta microalga un mecanismo de protección frente a la toxicidad por cadmio: síntesis de compuestos tiólicos.

- Desarrollar una técnica de separación mediante electroforesis capilar para el análisis de compuestos tiólicos, que permita un análisis rápido y eficiente con el fin de poder realizar una correcta cuantificación y caracterización de los mismos.

- Estudiar la producción y la función de diferentes compuestos tiólicos, como la cisteína, el glutatión y las fitoquelatinas como mecanismo de tolerancia al cadmio de esta microalga. Para ello, se pretende hacer un seguimiento de la síntesis de estos compuestos tiólicos a lo largo del tiempo, estudiando la magnitud de la respuesta de los mismos frente a diferentes concentraciones de cadmio, así como del grado de polimerización alcanzado por las fitoquelatinas.

- Estudiar la utilidad de esta microalga en su uso como biomasa viva para la retirada de cadmio de aguas contaminadas. Para ello se analizará la eficiencia de *Tetraselmis suecica* en la retirada de este metal del medio y se estudiará la relación entre la eficiencia de esta retirada y los compuestos tiólicos que es capaz de sintetizar.

Material y Métodos

Descripción y cultivo de la especie microalgal *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

Descripción de la especie *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch

Tetraselmis suecica es una microalga marina unicelular y móvil, que se clasifica dentro del phylum (división) *Chlorophyta*, en la clase *Prasinophyceae*, orden *Chlorodendrales*, familia *Chlorodendraceae*. Los nombres genéricos *Aulacochlamys*, *Prasinocladus* y *Platymonas* son todos sinónimos de *Tetraselmis*.

El phylum *Chlorophyta* incluye todas las algas con plástidos rodeados por dos membranas, que contienen los pigmentos fotosintéticos clorofila *a* y *b* y que forman estados flagelados de esporas o gametos. El principal producto de almacenamiento de carbohidratos es el almidón (α -1,4- glucano) depositado dentro del plástido.

Tabla 4. Clasificación de la clase *Prasinophyceae*.

Orden	Familia	Géneros
Orden Mamiellales	Familia Mamiellaceae	Géneros: <i>Mamiella</i> , <i>Dolichomastix</i> , <i>Mantoniella</i>
Orden Pseudoscourfieldiales	Familia Pseudoscourfieldiaceae	Género <i>Pseudoscourfieldia</i>
	Familia Nephroselmidaceae	Género <i>Nephroselmis</i>
Orden Chlorodendrales	Familia Chlorodendraceae	Género <i>Tetraselmis</i> , <i>Scherffelia</i>
Orden Pyramimonadales	Familia Pterospermataceae	Género <i>Pterosperma</i> , <i>Pachysphaera</i>
	Familia Pyramimonadaceae	Género <i>Pyramimonas</i> , <i>Halosphaera</i>
	Familia Mesostigmataceae	Género <i>Mesostigma</i>

En la tabla 4 se presenta la clasificación de la clase *Prasinophyceae*. La clase *Prasinophyceae* fue establecida por Christensen (1962) para un grupo de clorófitas móviles que tienen tanto los flagelos como el cuerpo celular cubiertos por escamas

orgánicas no mineralizadas. Asimismo, los cuerpos de golgi (dictiosomas) están localizados en una posición parabasal y a menudo presentan cuerpos mucíferos o tricocistes. Poseen típicamente una mancha ocular en el interior del cloroplasto constituida por una o varias capas de glóbulos pigmentados que no están asociados a los flagelos. El cloroplasto contiene gránulos de almidón generalmente envolviendo al pirenoide. La reproducción es por división celular, formando dos células hijas y no se conoce reproducción sexual. Se encuentran en hábitats marinos, de agua dulce y salobre siendo especialmente comunes en hábitats marinos y componentes destacados del fitoplancton.

En las *Chlorodendrales*, incluida *Tetraselmis*, los flagelos están recubiertos por capas de escamas, pero la célula está recubierta por una teca (células tunicadas). Escamas y teca se originan a partir del material ensamblado en el dictiosoma, siendo la teca probablemente el resultado de la fusión de escamas. Las escamas del cuerpo celular se originan en las cisternas del dictiosoma durante la división celular y son transportadas a la membrana celular por pequeñas vesículas que se fusionan con ella cerca de las bases de los flagelos. Pueden ser almacenadas en un reservorio único, y antes de ser depositadas en el exterior del plasmalema se reagrupan por tipos similares (Chrétiennot-Dinnet, 1990). Característica de la familia *Chlorodendraceae* es que las escamas flagelares de la capa interna están recubiertas por pequeñas escamas bacilariformes dispuestas aparentemente en 24 hileras.

Las raíces flagelares son complejas, formando un rizoplasto característico de esta clase. Además de los microtúbulos que unen la base de los flagelos a la superficie, una red denominada sinistosoma reúne las bases de los flagelos y a veces hay un grueso corpúsculo rodeado por el rizoplasto. Este orgánulo está unido a los corpúsculos basales de los flagelos en el polo anterior y a la membrana plasmática o a otros orgánulos en el polo posterior. El núcleo está situado entre las ramas del rizoplasto y los lóbulos del cloroplasto.



Foto 1. Fotografía de células de la microalga marina *Tetraselmis suecica* realizada mediante microscopio óptico de contraste de fase con un aumento de 100x.

El género *Tetraselmis* comprende células verdes solitarias, libres, móviles, de forma ovoide o elipsoidal y aplanada en sección transversal. Presentan 4 flagelos iguales e isodinámicos, insertados en una depresión anterior, un núcleo central, un cloroplasto en copa, lobulado en la parte anterior, con un pirenoide basal rodeado de almidón y generalmente, un estigma.

La reproducción ocurre por fisión longitudinal de las células, que adoptan el estado inmóvil; las células hijas pueden observarse completamente flageladas antes de su liberación de la teca parental.

A partir de los estudios de células en cultivo, además del estado móvil, se consideran dos estados inmóviles: un estado vegetativo, considerado como un “falso quiste” (frecuentemente obtenido en cultivos envejecidos) y el estado de “quiste verdadero”, mucho menos común (Bold y Wynne, 1985; Chrétiennot-Dinnet, 1990). Los quistes verdaderos contienen 4 células y la pared es ornamentada. La formación de quistes ocurre bajo condiciones desfavorables, como deficiencia prolongada en

nutrientes o pH extremo. Es común en aguas costeras y de estuarios, y soportan amplios márgenes de salinidad y temperatura.

Las células de *Tetraselmis suecica* presentan en el cloroplasto, típico del género, un pirenoide penetrado por invaginaciones citoplasmáticas constituidas por un brazo simple que se ramifica. El estigma, de color rojizo y localizado a un lado de la célula, está constituido por dos capas de gránulos osmiofílicos separados por tilacoides hinchados, los cuales parecen carecer de contenido. La estructura de los flagelos es pancronemática, y los mastigonemas recubren el flagelo en toda su longitud, salvo en su parte terminal.

Aplicaciones de *Tetraselmis suecica*

En los pasados años diferentes microalgas han sido utilizadas y ensayadas para aplicaciones biotecnológicas, organismos test para monitorizar la calidad del agua y como alimentación de diferentes organismos (rotíferos, bivalvos y peces herbívoros). Pero solo algunas especies son producidas en biomasa, entre ellas *Tetraselmis suecica*, debido a su alto valor nutricional para larvas de peces y rotíferos, ausencia de toxicidad para sus predadores, buena capacidad para adaptarse a las condiciones estandarizadas de cultivo en masa y la alta tasa de reproducción en ambientes artificiales. *Tetraselmis suecica* es una microalga fácil de cultivar a gran escala en cultivo interior y actualmente es una microalga fundamental en la alimentación de rotíferos, bivalvos y peces herbívoros (Robert *et al.*, 2001), así como una posible fuente de minerales y vitaminas (Fábregas *et al.*, 1995).

Cultivo de *Tetraselmis suecica*

La especie microalgal utilizada se mantiene en cultivos “stock” de 2 L. Estos cultivos se renuevan periódicamente para mantener el crecimiento en fase logarítmica. Para ello la mitad del cultivo se deshecha añadiendo un volumen igual al desechado de medio nuevo de cultivo. Estos cultivos se realizan con una iluminación de 68.25

$\mu\text{Einstein/m}^2/\text{s}$ proporcionada por tubos fluorescentes MAZDA flúor, aplicada con un ritmo nictimeral de 12:12 horas, en una cámara a temperatura constante de $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Se les suministra aire estéril a un flujo constante de 10 L/min.

Los cultivos se realizan en agua de mar natural, filtrada y estéril. La salinidad del agua de mar es de 35 ‰ y el pH inicial de 7.8. El agua de mar se filtra con filtros de acetato de celulosa MF-Millipore de tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$, con el fin de eliminar la materia particulada en suspensión. Posteriormente, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El medio de cultivo utilizado tanto en los cultivos stock como en los diferentes ensayos realizados, es el medio Algal (Fábregas *et al.*, 1984) sin EDTA, pues este compuesto actúa como quelante de metales. La composición de este medio por litro de agua de mar se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Composición química del medio Algal en 1 litro de agua de mar natural.

Compuestos químicos	Nitrógeno	2 mmol
	Fósforo	100 μmol
	Hierro	20 μmol
	Zinc	1 μmol
	Manganeso	1 μmol
	Molibdeno	1 μmol
	Cobalto	0.1 μmol
	Cobre	0.1 μmol
Vitaminas	Tiamina	35 μg
	Biotina	5 μg
	B ₁₂	3 μg

Lavado del material

Uno de los principales problemas que se plantean en las experiencias de toxicidad de los iones metálicos, es que el metal puede quedar adsorbido a las paredes del material después de haber sido usado, por lo que al añadir nuevo medio con una determinada cantidad de metal su concentración final pueda ser distinta de la esperada.

Por ello, el tratamiento de lavado al que se debe someter todo el material a utilizar, tanto para la solución “stock” de cadmio como para los recipientes de cultivo, es el siguiente:

- Lavado del material en detergente neutro, permaneciendo en él durante 24 horas.

- Se enjuaga bien con agua destilada y se introduce 48 horas en HCl al 10 %.

- Posteriormente, se lava con agua destilada Milli-Q y se deja en ella durante 24 horas.

Solución “stock” de cadmio

La solución “stock” de cadmio se preparó disolviendo CdCl_2 en agua destilada Milli-Q, de forma que se obtenga una concentración de 10 g/L de cadmio, lo que permitirá obtener, añadiendo la cantidad adecuada de esta solución, los rangos de concentraciones deseados en los ensayos realizados.

Evaluación del efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Tetraselmis suecica*

Diseño experimental

Los ensayos se llevan a cabo en botellas de 2 L con agua de mar tratada como se indicó anteriormente, y con adición de medio de cultivo Algal sin EDTA.

T. suecica es expuesta a las siguientes concentraciones de cadmio: 0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg Cd/L. Además se incluye un cultivo control al que no se le añade metal. Se bombea aire natural estéril a un flujo constante de 10 L/min. Todos los cultivos se realizan por triplicado, expresándose los resultados como la media \pm desviación típica de las tres réplicas.

La densidad celular inicial es de 25×10^4 células/ml.

Diariamente, desde el comienzo de la experiencia hasta que se alcanza la fase estacionaria, se retiran alícuotas de los cultivos para la determinación de la densidad celular. Para evitar la movilidad celular se añaden 25 μ l de lugol por cada ml de muestra, el cual impide el movimiento celular sin romper las células. Posteriormente, la muestra se carga en una cámara hematológica de tipo NEUBAUER con una pipeta Pasteur y se realiza el recuento en un microscopio NIKON Labophot de contraste de fases utilizando un objetivo de 40x. De cada cultivo se toman tres alícuotas y se hace recuento celular en cada uno de ellos. Para disminuir el error del método se calcula la media de los tres recuentos. Una vez contadas las células se aplica el coeficiente correspondiente a la cámara utilizada en el recuento para conocer la densidad celular.

a)



b)



Foto 2. Cultivos de *Tetrastelmis suecica* expuestos a diversas concentraciones de cadmio, a) al inicio del ensayo y b) tras 4 días de cultivo.

Análisis de datos

Al final de la experiencia, con los datos de la densidad celular obtenidos para todos los cultivos se comprueba si las curvas de crecimiento obtenidas se ajustan a una función logística.

La representación matemática de esta función es:

$$N_t = K / [1 + B e^{-zt}]$$

donde N_t representa la densidad de la población en el tiempo t expresada como número de células ($\times 10^4$)/ml, K es la capacidad de carga del medio o tamaño límite que la población podría alcanzar bajo unas condiciones ambientales determinadas, B es una constante que carece de valor biológico, y su valor viene dado por la expresión: $B = (K - N_0) / N_0$, donde N_0 es la densidad inicial de la población. El parámetro z es una medida de la velocidad a la cual la población se aproxima a su valor máximo y viene expresado como incremento en número de células por unidad de tiempo y por célula. Todos los parámetros de la ecuación se calcularon mediante una regresión no lineal, utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

La tasa de división μ se obtuvo para todas las curvas de crecimiento, calculando este valor a partir del tramo de crecimiento exponencial. La tasa de división se calcula a partir de la pendiente de la recta de regresión obtenida de la representación gráfica logaritmo de la densidad vs. tiempo.

Para determinar si el cadmio tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la microalga se realizó un ANOVA de un solo factor. Posteriormente, se realizó una prueba de Duncan de rangos múltiples de los valores medios de densidad celular obtenidos al final del ensayo para los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de cadmio. El nivel de significación de la prueba fue del 5 %.

En función de las densidades celulares, se calculó mediante un análisis PROBIT la EC50 (Finney, 1964), esto es, la concentración del metal que reduce la densidad celular de la población a la mitad, frente al valor del control.

Tolerancia al cadmio en la microalga *Tetraselmis suecica*: identificación y caracterización de compuestos tiólicos

La unión de metales a ligandos celulares es una de las estrategias más comúnmente adoptada por los organismos al ser expuestos a los mismos. Los metales, tras entrar en la célula, se unen a estos ligandos endógenos de manera inocua y reversible. Una de las respuestas más comunes a la toxicidad por metales es la síntesis de péptidos ricos en cisteína que quelan el metal. El ligante principal de metales en estos complejos es el grupo –SH.

Una vez realizados los ensayos de toxicidad del cadmio sobre el crecimiento se estudió el posible papel de diferentes compuestos tiólicos como respuesta a la expresión de la tolerancia de esta microalga al metal. La elevada absorbancia en el rango de 240-255 nm es indicativa de la presencia de tiolatos metálicos en esta estructura.

Determinación de los grupos tiol (-SH) no proteicos

Diseño experimental

Las condiciones de cultivo se mantienen sin modificaciones respecto a los ensayos realizados previamente, así como las concentraciones de cadmio a las que fueron expuestas las células microalgales (0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg Cd/L). Se incluye además un cultivo control. Los cultivos se llevaron a cabo en volúmenes de 2 L.

Determinación de los grupos tiol (-SH)

Los compuestos tiólicos no proteicos fueron determinados en extractos acidificados mediante el método descrito por Ellman (1959).

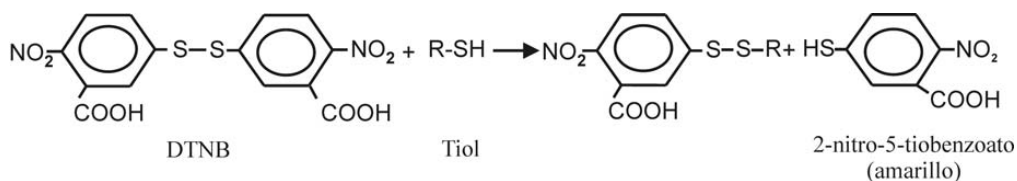


Figura 5. Reacción del DTNB con los compuestos tiólicos.

El método de Ellman es un método espectrofotométrico, sencillo y preciso basado en la utilización de un reactivo denominado DTNB o reactivo de Ellman que reacciona con los tioles alifáticos para dar una mezcla de disulfuros y de 2-nitro-5-tiobenzoato, el cual tiene un intenso color amarillo, presentando una elevada absorbancia a 412 nm (figura 5).

La cantidad de 2-nitro-5-tiobenzoato es proporcional a la cantidad de grupos tiol reactivos que hay en la muestra, permitiendo de esta manera su cuantificación mediante una recta de calibrado.

Cada día de duración del ensayo se recogieron por centrifugación alícuotas de 10 ml de los cultivos control y de los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de cadmio. Las muestras se lavan dos veces con agua de mar filtrada, estéril y libre de cadmio, con el fin de eliminar el metal que pudiera quedar pegado a las células. El pellet celular se resuspende en un volumen apropiado de HCl 0.1 N y se somete a la acción de ultrasonidos con el fin de romper las células y liberar su contenido. La aplicación de ultrasonidos se realiza durante 4 minutos a una amplitud de 14 μ m usando un equipo Soniprep 150 MSE y estando la muestra inmersa en un baño de hielo. El material insoluble se elimina mediante centrifugación del extracto a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, se mezclan 400 μ l de extracto con 700 μ l de una solución que contiene 10 mM de DTNB + 1 mM de EDTA en tampón fosfato sódico 0.5 M, pH 7.5. Transcurridos 10 minutos de reacción en oscuridad se lee la absorbancia a 412 nm

frente a un blanco sin adición de muestra. Todos los valores obtenidos se corrigen en función de la absorbancia que puedan tener los extractos a esa longitud de onda.

La cantidad de grupos tiol no proteicos que hay en las muestras se cuantifica mediante una recta de calibrado utilizando diferentes concentraciones de glutatión como patrón.

Purificación, identificación y análisis de los compuestos tiólicos inducidos por el cadmio.

Diseño experimental

La concentración de cadmio utilizada para el desarrollo de este ensayo fue de 7.9 mg Cd/L, que coincide con la EC50 calculada para esta microalga en los ensayos de crecimiento. En el ensayo, se incluye un cultivo control sin la adición de cadmio. Los cultivos se mantienen durante 7 días para obtener una cantidad suficiente de biomasa.

Cada día de duración del ensayo se recogieron alícuotas de 10 ml tanto del cultivo control como del cultivo expuesto a 7.9 mg Cd/L para la determinación de los grupos tiol (-SH) no proteicos. Tras siete días de cultivo se recogieron alícuotas de 500 ml para la purificación de los compuestos tiólicos.

Purificación de los compuestos tiólicos mediante cromatografía de exclusión molecular

Estos compuestos tiólicos fueron purificados mediante cromatografía de exclusión molecular usando un cromatógrafo de baja presión Econo System (Bio-Rad Laboratories).

Se prepararon extractos alcalinos a partir de las alícuotas obtenidas de los cultivos celulares expuestos a 7.9 mg Cd/L y de los cultivos no expuestos a cadmio. Las células se recogieron, después de 7 días de cultivo, por centrifugación y

posteriormente se lavaron con agua libre de metal. El pellet celular se resuspendió en tampón borato sódico 75 mM (pH 8.6) y se sometió a la acción de ultrasonidos con el fin de romper las células utilizando las mismas condiciones y equipo que en la determinación de los grupos tiol.

Una alícuota de 1 ml del extracto alcalino clarificado por centrifugación (12000 x g durante 15 minutos a 4°C) se aplicó a una columna cromatográfica de exclusión molecular (2.5 x 50 cm) que contiene como fase estacionaria Biogel P-60 (Bio-Rad Laboratories), equilibrada con tampón borato sódico 75 mM, pH 8.6. El extracto se eluyó con el mismo tampón a un flujo de 0.4 ml/min y a temperatura ambiente. La absorbancia se registró a 254 nm, que corresponde a la longitud de onda en la que absorben los grupos que presentan tiolatos metálicos.

Se recogieron fracciones de 4 ml y estas se analizaron para determinar la cantidad de grupos tiol (-SH) y la cantidad de cadmio. Los grupos -SH fueron determinados por el método de Ellman (descrito anteriormente) y el cadmio presente en cada fracción mediante ICP-MS. Asimismo, se determinó la composición de aminoácidos en aquellas fracciones en que se detectó mayor cantidad de tiolatos metálicos. Los aminoácidos se determinaron por el método de Barkholt y Jensen (1989).

Composición de aminoácidos de los péptidos purificados

Debido a la importancia que el aminoácido cisteína tiene en relación a la estructura y función de las fitoquelatinas, es necesario recurrir a un método de análisis de aminoácidos que permita cuantificar correctamente este aminoácido. El análisis del aminoácido cisteína es difícil debido a su susceptibilidad de oxidarse durante la hidrólisis. Así, la composición de aminoácidos de los péptidos se realiza según el método desarrollado por Barkholt & Jensen (1989).

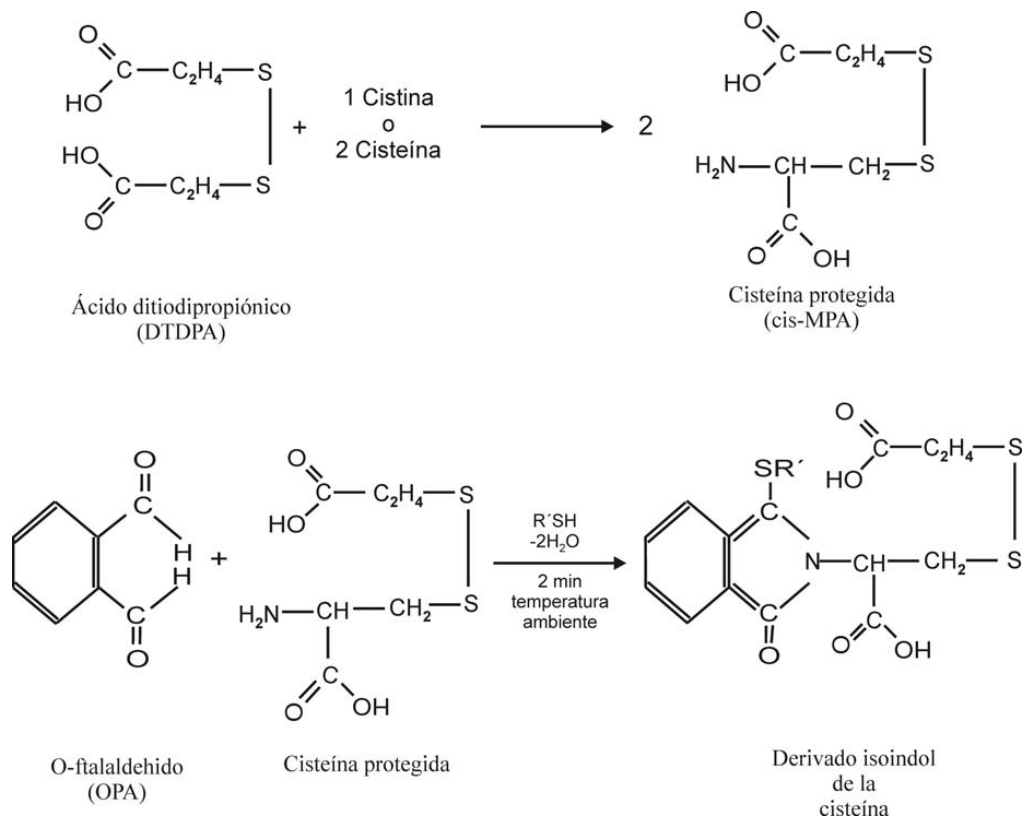


Figura 6. Etapas de estabilización y marcaje de la cisteína usando DTDPA.

Este método está basado en la conversión de cisteína usando el DTDPA para formar un compuesto estable que es S-2-carboxietiltiocisteína. En la figura 6 se representan las etapas de estabilización y derivatización de la cisteína usando el DTDPA. Finalmente, este compuesto junto con el resto de aminoácidos es analizado por HPLC después de su hidrólisis.

La metodología seguida consiste en añadir una solución al 10 % de DTDPA en tampón borato pH 10.4 a los péptidos que se van a analizar y dejar que se produzca la reacción durante 1 hora, al cabo de la cual se realiza la hidrólisis con una mezcla de HCl 6 N y fenol al 0.1 % durante 24 horas a 110°C. Finalizada la hidrólisis, las muestras se evaporan mediante la aplicación de vacío a una temperatura de 60°C. A

continuación, se resuspenden en tampón borato y se centrifugan a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. Por último, se procede a su análisis por HPLC.

La separación de estos aminoácidos se realiza en un cromatógrafo Hewlett Packard 1090 equipado con un detector de fluorescencia Hewlett Packard 1046A, un muestreador automático Hewlett Packard 1050 y con una columna de fase reversa C₁₈ ODS Hypersil 5 µm (250 x 4 mm) equipada con un protector de columna LiChrospher100 RP-18, 5 µm (4 x 4 mm).

Se utilizan los siguientes eluyentes:

Eluyente A: 20 mM acetato sódico pH 7.2 /0.3 % THF/ 0.018 % TEA.

Eluyente B: 100 mM acetato sódico pH 7.2 / acetonitrilo / metanol; 20/40/40.

El análisis por HPLC se realiza mediante una técnica de derivatización en dos etapas. Primero se derivatizan los aminoácidos primarios con el reactivo OPA, y en la segunda etapa, los aminoácidos secundarios (que no reaccionan con OPA), se derivatizan con el reactivo FMOC.

Después de la derivatización de los aminoácidos con los reactivos OPA y FMOC estos fueron eluidos de la columna con las condiciones que se muestran en la tabla 6.

La detección se realizó mediante fluorescencia:

- Aminoácidos primarios (OPA): exc: 340 nm, em: 450 nm

- Aminoácidos secundarios (FMOC): exc: 266 nm, em: 305 nm

Tabla 6. Condiciones de elución aplicadas a la columna de HPLC durante el análisis de aminoácidos.

Tiempo (min)	% B	Flujo (ml/min)
0	0	1.63
17	60	1.63
18	100	1.63
18.5	100	2.5
28	100	2.5
28.2	100	1.63
30	0	1.63

Reequilibrado: 5 minutos

Separación e identificación por electroforesis capilar de los péptidos purificados

El análisis se llevó a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector de fotodiodos. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa informático HP^{3D}CE ChemStation de Hewlett Packard (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

El capilar (Composite Metal Services Ltd., UK Block) utilizado presenta un diámetro interno de 50 μm y una longitud total de 38 cm, siendo la distancia efectiva de análisis (desde el extremo del inyector al detector) de 30 cm.

Previamente el capilar se acondicionó pasando una solución de NaOH durante 5 minutos seguida de HCl 0.1 N y agua Milli-Q durante 10 minutos; finalmente el capilar se rellenó con la solución electrolítica compuesta por 150 mM de ácido fosfórico. Entre muestra y muestra el capilar se lava con la solución electrolítica durante cinco minutos para lavar cualquier material que pudiese quedar adherido a las paredes del capilar.

La muestra se inyecta en el capilar mediante una presión de 50 mbar durante 15 segundos. Una vez cargada la muestra, se aplica un voltaje de +12 kV, realizándose la detección mediante absorbancia a una longitud de onda de 200 nm (Torres *et al.*, 1997a).

Optimización de un método de separación y análisis de compuestos tiólicos mediante electroforesis capilar en extractos brutos de *Tetraselmis suecica*

Los compuestos que poseen grupos tiol se separaron y analizaron mediante el empleo de electroforesis capilar, sometiendo previamente los extractos celulares a una derivatización con mBrB.

Muestras biológicas utilizadas en el ensayo

Para la optimización del electrolito, así como del método de extracción y derivatización con mBrB se utilizaron extractos crudos de células de *T. suecica* expuestas a una concentración de cadmio de 7.9 mg Cd/L durante 7 días. Las condiciones de cultivo fueron idénticas a las utilizadas en ensayos previos.

Optimización de las condiciones de la electroforesis capilar

La separación de los péptidos purificados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en zona libre (CZE). El análisis se llevó a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector con un dispositivo de fotodiodo. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa informático HP^{3D}CE ChemStation de Hewlett Packard (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

La detección se realizó a una longitud de onda de 390 nm. La temperatura del capilar se mantuvo a 25 °C. Antes de cada análisis el capilar se lavó con una solución de NaOH 0.1 M, agua Milli Q y finalmente con el electrolito. El protocolo para cada muestra consiste en un lavado de 3 min con el electrolito y posterior inyección de la misma mediante presión de 50 mbar durante 17 s.

Se utilizó un capilar (Composite Metal Services Ltd., UK Block) con una longitud efectiva de 30 cm (38 cm de longitud total), 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo.

Optimización del electrolito

Con el fin de conseguir un electrolito óptimo para obtener una adecuada resolución de los picos en los electroferogramas se consideraron diferentes características del mismo, como el pH y la concentración. Se utilizó como electrolito de fondo ácido fosfórico 150 mM al que se modificó el pH con NaOH 1 M para obtener un rango de pH que variaba entre 1.50 y 1.75. Una vez obtenido el pH adecuado se probaron varias concentraciones del tampón fosfato para obtener una mejor separación de los picos. Las concentraciones usadas fueron 150, 170 y 200 mM. Las mismas condiciones de concentración y pH ensayadas con el ácido fosfórico fueron probadas con el ácido cítrico, como posible sustituto del ácido fosfórico.

Una vez que el pH y la concentración del electrolito fueron establecidos, se intentó mejorar la resolución añadiendo al electrolito distintas concentraciones de varios modificadores orgánicos. La adición de modificadores al electrolito tiene diferentes efectos, en función de la naturaleza del aditivo. Estos cosolventes pueden mejorar la solubilidad del analito, la sensibilidad del detector, la separación y resolución y pueden ayudar a controlar el flujo electroosmótico. Tres modificadores orgánicos fueron ensayados: acetonitrilo, metanol y trifluoroetanol.

Todas las soluciones electrolíticas fueron filtradas con filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm y desgasificados antes de su uso.

Cada análisis con los diferentes electrolitos ensayados se repitió 6 veces para asegurar la reproducibilidad del análisis.

Determinación del voltaje adecuado

Para seleccionar el voltaje adecuado se utilizó la ley de Ohm, basada en la linealidad de la representación gráfica: conductividad vs. voltaje. Para ello, se aplicaron diferentes voltajes al electrolito optimizado y se registró la conductividad. Una vez realizada la representación gráfica de estos dos parámetros, el máximo voltaje fue indicado por el punto en el cual se pierde la linealidad en la representación gráfica obtenida.

Longitud del capilar adecuado

Las separaciones comparativas de los diferentes electrolitos ensayados se realizaron a 12 kV y con un capilar de longitud efectiva de 30 cm. El acortamiento del capilar significa un tiempo de análisis más corto pero también puede implicar una pérdida de resolución. Por lo tanto, se realizaron ensayos con un capilar más corto, de longitud efectiva 25 cm y longitud total 33 cm (no se varió el diámetro interno)

Inyección del volumen de muestra adecuado

Finalmente, otro de los parámetros importantes que se tuvo en cuenta al realizar el análisis mediante CZE, fue el volumen de muestra inyectado en el capilar. Por lo tanto, manteniendo la presión de inyección a 50 mbar, se inyectaron diferentes volúmenes de la muestra modificando el tiempo de inyección: 15, 17, 20, 25 y 30 s.

Optimización del método de extracción y derivatización con monobromobimane (mBrB) de los compuestos tiólicos

El mBrB es un compuesto fluorescente que se incluye dentro del denominado grupo de los “bromobimanes” que reaccionan selectivamente con los compuestos tiólicos. Este compuesto es estable y no fluorescente cuando se almacena sin disolver y en oscuridad. Al reaccionar específicamente con los tioles se origina un derivado

soluble en agua que presenta fluorescencia cuando se excita a 380 nm, emitiendo luz a 480 nm. Asimismo, este compuesto es detectable en la región de luz visible a 390 nm.

La alta selectividad del bromobimane, la rápida reactividad con los tioles y la estabilidad y fluorescencia producida por los derivados tioles hace del uso del monobromobimane una poderosa arma para el análisis de biotioles de bajo peso molecular como el glutatión y el aminoácido cisteína.

La figura 7 describe la reacción de este reactivo con un compuesto tiólico (RSH) para formar un producto estable y que permite su cuantificación.

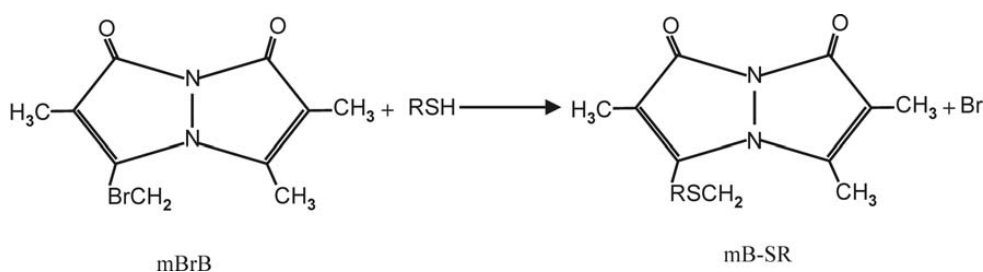


Figura 7. Reacción del mBrB con un compuesto tiólico.

El monobromobimane es soluble en solventes orgánicos de polaridad media como el acetonitrilo o diclorometano pero poco soluble en agua. La solución “stock” de mBrB se preparó añadiendo 1 ml de acetonitrilo a 25 mg de este compuesto para obtener una solución 150 mM. Las soluciones de acetonitrilo son estables a temperatura ambiente durante meses aunque deben ser mantenidos en oscuridad ya que la luz produce fotólisis y conversión a un bimane fluorescente.

El procedimiento de derivatización fue adaptado del método desarrollado por Rijstenbil *et al.* para derivatización y análisis de fitoquelatinas mediante HPLC (Rijstenbil *et al.*, 1998).

La extracción ácida de los compuestos tiólicos presentes en las células es necesaria para evitar la oxidación del grupo $-SH$. Asimismo, esta extracción ácida produce la precipitación de las proteínas y otras moléculas indeseables que pudieran interferir en la reacción de derivatización. Para ello las células de *Tetraselmis suecica* fueron resuspendidas en medio ácido, formado por HCl 0.1 M o por ácido sulfosalicílico 0.05, 0.1 y 0.2 M.

Después de la sonicación de las muestras, el material insoluble se elimina mediante centrifugación del extracto celular a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C.

A 500 μ l del sobrenadante se le añadió 500 μ l del tampón de derivatización preparado en el momento de ser utilizado. El tampón está compuesto por tampón borato 1 M, pH 9, DTPA 1 mM y un agente reductor (mercaptoetanol o $NaBH_4$).

La reacción del bromobimane con el compuesto tiólico es dependiente del pH. Un pH básico acelera la reacción. Sin embargo, la mayoría de los tioles sufren una rápida oxidación a un pH básico. Por lo tanto, una consideración fundamental al preparar las muestras es prevenir su oxidación. El $NaBH_4$ y el mercaptoetanol actúan como agentes reductores de los posibles ditioles convirtiéndolos en tioles reactivos. Diferentes concentraciones de $NaBH_4$ (0.5, 1.5 y 5 mg/ml), así como de 2-mercaptoetanol (1, 5 y 10 mM) fueron ensayadas para optimizar este proceso. De la misma manera, se derivatizó una muestra sin usar agente reductor, que se utilizó como control.

Después de añadirle tampón de derivatización a las muestras y dejados transcurrir 20 minutos de reacción en un baño de hielo, se le añaden 8 μ l de la solución stock de mBrB y se incuba a temperatura ambiente y oscuridad durante 1 hora. Las muestras así derivatizadas se clarifican por centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos y se guardan a $-20^\circ C$ hasta su análisis.

Finalmente, 600 μ l del sobrenadante son transferidos a viales específicos para electroforesis capilar para ser inyectados.

Estándares de cisteína, γ -Glu-Cys, GSH y fitoquelatinas derivatizados con el mismo procedimiento seguido para los extractos celulares, se usan para identificar los diferentes picos que aparecen en los electroferogramas.

Composición y producción de los diferentes compuestos tiólicos sintetizados por la microalga *Tetraselmis suecica* al ser expuesta a cadmio

Diseño experimental

Las células de *T. suecica* fueron expuestas a diferentes concentraciones de cadmio durante 8 días. Las concentraciones de cadmio ensayadas fueron 3, 7.9, 15 y 30 mg/L. Se incluye un cultivo control. Las células de *T. suecica* se resuspendieron en un volumen de 6 L. Las condiciones de cultivo se mantienen sin modificaciones respecto a los ensayos realizados previamente. Cada cultivo se realiza por triplicado.

Diariamente, desde el comienzo del ensayo, se recogen por centrifugación (12000 x g durante 10 min) alícuotas cuyo volumen dependerá de la densidad celular de los cultivos. Las muestras se guardan a - 20 °C hasta su análisis.

Separación e identificación por electroforesis capilar de los compuestos tiólicos derivatizados con mBrB

Para el análisis de las muestras se utilizan las condiciones de la CZE así como la solución electrolítica optimizados previamente. Las condiciones optimizadas así como la solución electrolítica son las siguientes: capilar de sílice fundido y sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 µm de diámetro interno (longitud total de 38 cm); las muestras son introducidas mediante presión de 50 mbar durante 17 s, el voltaje aplicado fue de 13 kV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 390 nm.

El ácido utilizado para la extracción fue HCl 0.1 M. Durante el proceso de derivatización se utilizó como agente reductor 1.5 mg/ml de NaBH₄. El proceso de extracción y derivatización son explicados en el apartado anterior (Optimización del

método de separación y análisis de compuestos tiólicos mediante electroforesis capilar en extractos crudos de *Tetraselmis suecica*).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS 11.5. Los resultados fueron examinados mediante el análisis ANOVA y los valores medios de los diversos tratamientos fueron comparados utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel del 5 %.

Estabilidad y producción de compuestos tiólicos después de la transferencia de las células de *Tetraselmis suecica* a un medio sin metal

Las células de *T. suecica* expuestas a una concentración de cadmio de 7.9 mg Cd/L durante 7 días fueron transferidos a un medio libre de metal para estudiar la persistencia de los diversos compuestos tiólicos presentes en las células. Los cultivos fueron realizados con volúmenes de 6 L con las mismas condiciones descritas en los ensayos previos.

Las células se recogieron por centrifugación (1500 x g para 10 min en 15 °C) y fueron resuspendidas en una solución de EDTA 0.02 M disuelta en agua de mar. Las células permanecieron en esta solución durante 10 min; posteriormente fueron centrifugadas y lavadas dos veces con agua de mar. El lavado con EDTA extrae el cadmio adsorbido a la superficie celular. Las células fueron resuspendidas en agua de mar libre de metal a la que se añadió, como en los ensayos previamente descritos, medio Algal sin EDTA como medio de cultivo. Se mantuvieron las mismas condiciones de cultivos que en los ensayos previos

Los compuestos tiólicos, así como la concentración de metal son analizados cada dos horas durante el transcurso del ensayo. Los grupos -SH fueron determinados por el método de Ellman (descrito anteriormente) y el cadmio mediante ICP-MS. El método de extracción y digestión para cuantificar metales es descrito en el siguiente apartado (“Retirada de cadmio por la microalga *Tetraselmis suecica*”)

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS 11.5. Los resultados fueron examinados mediante ANOVA y los valores medios de los diversos

tratamientos fueron comparados utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel del 5 %.

Retirada de cadmio por la microalga *Tetraselmis suecica*

Los metales no se pueden biodegradar y la única forma para tratar la contaminación por metales de los medios naturales es su extracción. Esto ha creado la necesidad de desarrollar técnicas que permita la extracción de los metales del medio ambiente de manera eficaz. Las microalgas pueden ser utilizadas como bioacumuladoras debido a que poseen diversas características que las hacen buenas candidatas para el tratamiento de agua contaminada por metales. Entre estas características se encuentra su elevada tolerancia a la toxicidad por metales.

Diseño experimental

Las células de *Tetraselmis suecica* se exponen a las mismas concentraciones de cadmio que se utilizaron para evaluar los efectos del cadmio sobre el crecimiento: 0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg Cd/L. Asimismo, los cultivos se realizaron en las mismas condiciones (temperatura, flujo de aire y luminosidad) e igual volumen (2 L). Todos los cultivos se realizan por triplicado, expresándose los resultados como la media \pm desviación típica de las tres réplicas. La densidad celular inicial es de 25×10^4 células/ml. Diariamente, desde el comienzo del ensayo, se retiran alícuotas de los cultivos para la determinación del cadmio intracelular y extracelular, así como del cadmio total bioacumulado por la célula, incluyendo el día 0, que es el día en que se inicia el cultivo.

Medida del cadmio retirado por las células de la microalga

De los diferentes métodos de extracción y digestión que se han propuesto para cuantificar metales, la extracción ácida es la más frecuentemente usada debido a que ofrece una gran reproducibilidad. La mayoría de estos métodos se basan en el tratamiento de la muestra con una mezcla concentrada de ácidos fuertes como HNO₃,

HCl o HClO₄, que se pueden someter a alta temperatura y eventualmente a alta presión.

La eficiencia de extracción está influenciada por la naturaleza específica de la muestra, así como por parámetros experimentales como la concentración del ácido, tiempo de extracción, temperatura y presión. El tiempo de extracción es un factor crítico para obtener una total descomposición de la muestra. Un tiempo de extracción largo asegura que la mayoría de las formas del metal han sido extraídas, proporcionando una cuantificación adecuada de la concentración del metal.

El cadmio retirado por la microalga *T. suecica* fue evaluado usando el método descrito por Stauber y Florence (1985) con algunas modificaciones. El cadmio total retirado por cada célula se midió cada día hasta finalizar el ensayo (cadmio intracelular). Por otra parte, en las células se diferenció entre el cadmio presente en el interior celular y el cadmio adsorbido en las membranas celulares. Para cada medida se recogieron diferentes alícuotas que se trataron de la siguiente manera:

Cadmio total. Cada día, durante el transcurso del ensayo, se recogieron alícuotas de 15 ml de cada cultivo de *T. suecica* expuesto a las diferentes concentraciones del metal. Estas muestras se filtraron a través de dos filtros superpuestos de nitrocelulosa MF-Millipore de tamaño de poro de 1.2 µm. Cada filtro se digirió por separado con una mezcla ácida compuesta por 1 ml de HNO₃ 15 M y 0.5 ml HClO₄ al 70 %. Los filtros se dejaron durante 24 horas en esta mezcla ácida para obtener una adecuada digestión. El cadmio se determinó en ambos filtros, usando como blanco el filtro colocado en la parte inferior durante la filtración.

Cadmio intracelular. Se recogieron cada día por centrifugación (1500 x g durante 10 min) alícuotas de 25 ml del cultivo con *T. suecica*. El pellet se resuspendió en 25 ml de una solución de EDTA 0.02 M preparada con agua de mar en el momento de su utilización. El lavado con EDTA elimina el cadmio adsorbido a la superficie celular, de esta manera, en estas muestras solo se mide el cadmio acumulado

intracelularmente. Las células se dejaron durante unos 20 min en la solución con EDTA para asegurar la eliminación del cadmio que pueda estar adsorbido a la superficie celular. Después de una nueva centrifugación el pellet recogido se digiere de igual manera que los filtros en la determinación del cadmio total.

Cadmio bioadsorbido a la superficie celular. El cadmio bioadsorbido a la superficie celular se determina mediante una sencilla operación matemática. A la cantidad de cadmio total se le resta el cadmio intracelular:

$$\text{cadmio bioadsorbido} = \text{cadmio total} - \text{cadmio intracelular}$$

Determinación de cadmio por ICP-MS

Las muestras digeridas con la mezcla ácida fueron diluidas con agua Milli – Q hasta un volumen final de 5 ml. La medida del cadmio presente en las muestras se llevó a cabo en los Servicios Xerais de Apoio a Investigación de la Universidad de La Coruña mediante un ICP-MS VG Elemental Plasma Quad 2 ICP-MS System (VG Elemental, 63069 Offenbach, Germany).

La técnica de ICP-MS es una técnica espectroscópica multielemental que proporciona medidas rápidas, exactas y precisas de casi todos los elementos del sistema periódico en un amplio intervalo de concentraciones, llegando a niveles de trazas (ppb) y ultratrazas (ppt o ppq).

Esta técnica está especialmente desarrollada para el análisis de elementos, primero, por ofrecer muy bajos límites de detección en el análisis directo de muestras en disolución; segundo, porque los espectros de masas de los elementos son simples y únicos, lo cual permite la identificación cualitativa de un elemento de forma rápida e inmutable.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS 11.5. Los resultados fueron examinados mediante un ANOVA y los valores medios de los diversos tratamientos fueron comparados utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel del 5 %.

Asimismo se halló la correlación entre la concentración de cadmio intracelular y la concentración de grupos tiol medida en ensayos previos.

Resultados

Evaluación del efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Tetraselmis suecica*

Las células de la microalga marina *T. suecica* se sometieron a varias concentraciones de cadmio (0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg/L), preparándose además un cultivo control sin adición de metal. Diariamente, desde el comienzo de la experiencia se retiran alícuotas de los cultivos para la determinación de la densidad celular. En la figura 8 se representa la densidad celular frente al tiempo para cada concentración ensayada.

La exposición de las células de *T. suecica* a mayores concentraciones de cadmio resultó en una progresiva inhibición del crecimiento. La inhibición fue proporcional a la concentración de cadmio, a mayor concentración de cadmio menor fue el crecimiento celular.

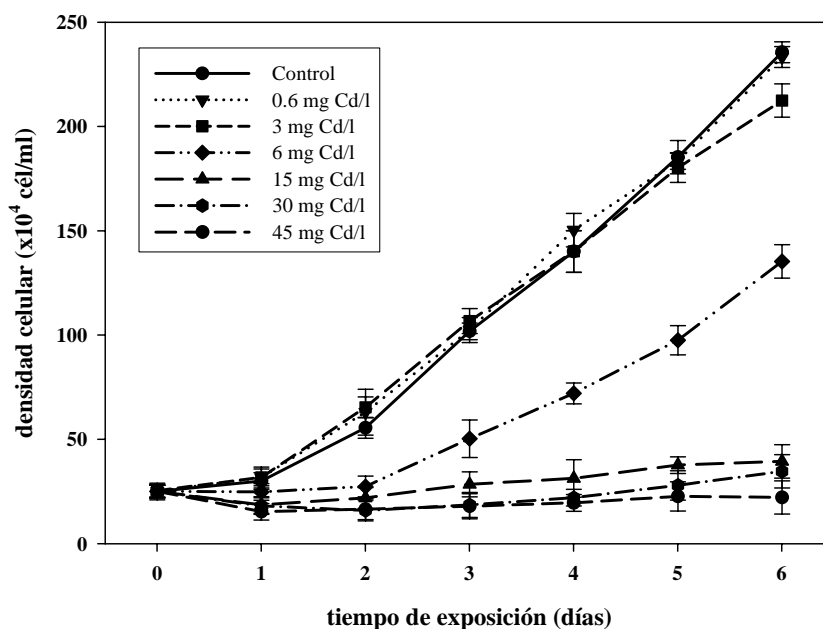


Figura 8. Curvas de crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* expuesta a diversas concentraciones de cadmio.

En esta figura se observa que el efecto del cadmio sobre el crecimiento de la microalga dependió de la concentración en el medio. Las concentraciones más pequeñas de cadmio, 0.6 y 3 mg Cd/L, mostraron un efecto estimulante en el crecimiento celular. Este efecto no se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo. Después de 4 días de exposición a 3 mg Cd/L, el cadmio produjo una disminución del crecimiento. En los cultivos expuestos a 0.6 mg Cd/L, después de 5 días de cultivo, disminuye el efecto estimulante del cadmio y el crecimiento celular se mantiene al mismo nivel que el control, por lo que no se observan efectos negativos sobre el crecimiento. En los cultivos tratados con 3 mg Cd/L, la densidad final fue de 212.75×10^4 cél/ml mientras que en los cultivos control fue de 235×10^4 cél/ml. En los cultivos expuestos a 6 mg Cd/L se observó un efecto inhibitorio del cadmio desde el primer día de cultivo, siendo la densidad final de 135.25×10^4 cél/ml. Los cultivos expuestos a 15 y 30 y 45 mg Cd/L apenas crecieron y la densidad celular se mantuvo casi constante a lo largo de los seis días.

El análisis estadístico mediante un ANOVA muestra que hay un efecto significativo del cadmio sobre el crecimiento de la microalga ($p < 0.001$) tras 6 días de crecimiento. Según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($\alpha = 0.005$), hay un efecto significativo de este metal sobre el crecimiento de la microalga *T. suecica* en los cultivos expuestos a concentraciones mayores de 0.6 mg Cd/L. Después de realizar esta prueba se puede decir que el efecto tóxico del cadmio en el crecimiento de la microalga, en las condiciones de cultivo ensayadas, fue como sigue:

$$\text{Control} = 0.6 < 3 < 6 < 15 < 30 < 45$$

A partir de los datos de densidad celular en cada cultivo se calculó la EC50 el último día del ensayo mediante un análisis PROBIT. Para las células de *T. suecica* expuestas a cadmio, la EC50 fue de 7.9 ± 1 mg Cd/L después de 6 días de exposición al metal.

Tabla 7. Parámetros de la función logística de crecimiento de los cultivos de *Tetraselmis suecica* a diferentes concentraciones de cadmio.

Concentración de cadmio	z (Δ cél / día)/cél	K ($\times 10^4$ células/ml)	r^2	N_6 (real) ($\times 10^4$ células/ml)
Control	0.58	338.1	0.99	235.5
0.6	0.56	337.2	0.99	233.25
3	0.62	273.3	0.99	212.37
6	0.32	134.9	0.98	135.25
15	*	*	*	39.37
30	*	*	*	34.62
45	*	*	*	22.12

Asimismo, se realizó una prueba de ajuste a una función logística de los datos de crecimiento obtenidos para todos los cultivos. La tabla 7 presenta los parámetros obtenidos para cada curva de crecimiento ajustada a la función logística y el coeficiente de determinación del ajuste en cada caso. Se comprobó que las gráficas de los cultivos control, 0.6, 3 y 6 mg Cd/L se ajustan a una función logística. Los coeficientes de regresión fueron 0.99, 0.99, 0.99 y 0.98 respectivamente. En el resto de los cultivos la curva de crecimiento no se ajustó a una función logística.

En la tabla 7 se observa que la capacidad de carga del medio (K) es un parámetro dependiente de la concentración de cadmio, experimentando una disminución a medida que aumenta la concentración de dicho metal. En los cultivos control la capacidad máxima del medio fue de 338.1×10^4 células/ml y baja hasta 134.9×10^4 células/ml en los de 6 mg Cd/L. En las concentraciones más altas no se pudo calcular este valor ya que no se produjo un ajuste a la función logística. Sin embargo, se observa para estas concentraciones que las densidades celulares reales alcanzadas el último día (N_6) sí fueron inferiores a los del resto de los cultivos, siendo este descenso proporcional a la concentración de cadmio en el medio.

Tabla 8. Tasas de división de los cultivos de *Tetraselmis suecica* con diferentes concentraciones de cadmio.

Concentración de cadmio en el medio (mg Cd/L)	μ (divisiones/día)
0	0.40
0.6	0.38
3	0.36
6	0.38
15	0.18
30	0.19
45	0.19

En la tabla 8 se representan las tasas de división de las células en cada cultivo. Se expresa como número de divisiones celulares/día. Las tasas de división se mantuvieron sin cambios significativos en los cultivos expuestos a 0.6, 3 y 6 mg Cd/L disminuyendo en los cultivos expuestos a altas concentraciones de cadmio, alcanzando valores de 0.19 divisiones/día en el cultivo con una concentración de cadmio de 45 mg Cd/L.

En consecuencia, el cadmio limita la capacidad de carga, y por tanto, la densidad final que esta especie podría alcanzar en el medio si no estuviera presente dicho metal; esta limitación es más severa cuanto mayor es la concentración de cadmio en el medio. Sin embargo, pequeñas concentraciones de cadmio pueden producir un efecto estimulante sobre el crecimiento de *T. suecica* en los primeros días de cultivo.

Tolerancia al cadmio en la microalga *Tetraselmis suecica*: identificación y caracterización de compuestos tiólicos

Determinación de los grupos tiol (-SH) no proteicos

La figura 9 muestra la producción de grupos tiol (-SH) no proteicos a lo largo del tiempo en los diferentes cultivos de *Tetraselmis suecica*, expuestos a distintas concentraciones de cadmio (0.6, 3, 6, 15, 30 y 45 mg/L) y un cultivo sin adición de metal, utilizado este último como control. Los cultivos se realizan por triplicado, representándose en la figura la media de los tres cultivos \pm la desviación típica correspondiente. Cada día, a lo largo del tiempo de duración del ensayo, se recogieron tres alícuotas de cada cultivo y se midieron los grupos tiol en cada una de ellas. La medida del contenido de grupos -SH en los extractos acidificados se llevó a cabo con el método de Ellman como se explica en el apartado de Material y Métodos.

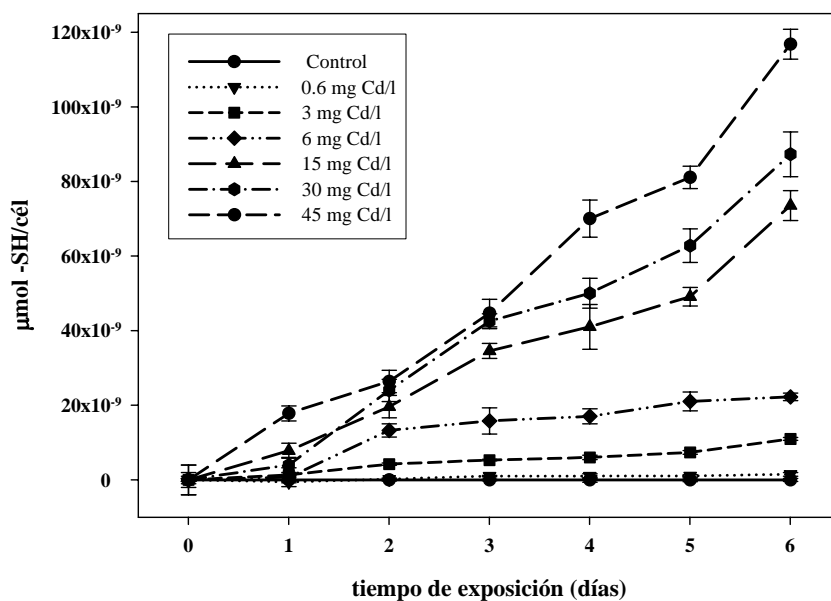


Figura 9. Producción de grupos tiol en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L).

Tabla 9. Concentración de los grupos tiol ($\mu\text{mol -SH/cél}$) obtenida en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio, después de seis días de tratamiento.

Concentración de cadmio en el medio (mg/L)	Concentración grupos tiol $\mu\text{mol -SH/cél}$
0.6	1.46×10^{-9}
3	1.09×10^{-8}
6	2.22×10^{-8}
15	7.35×10^{-8}
30	8.73×10^{-8}
45	1.17×10^{-7}

La evolución de los grupos tiol (-SH) en los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de cadmio y los cultivos control mostró que la concentración de los mismos fue proporcional a la concentración inicial de cadmio en el medio (figura 9). En los cultivos control la cantidad de grupos tiol (expresados como moles de -SH/célula) permanece estable a lo largo de los días. Por el contrario, en todos los cultivos expuestos a cadmio, se observa un claro incremento en la cantidad de grupos tiol a medida que transcurren los días de cultivo. La aparición de estos compuestos aumentó rápidamente hasta el último día del ensayo. La concentración de grupos -SH fue mayor cuanto mayor era la cantidad de cadmio a la que fueron expuestas las células. Por lo tanto, los valores más altos de grupos -SH se alcanzaron en los cultivos expuestos a las mayores concentraciones de cadmio (15, 30 y 45 mg/L), llegando la concentración de los grupos -SH en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L a superar 80 veces la concentración alcanzada en los cultivos expuestos a 0.6 mg Cd/L al final del ensayo. La tabla 9 muestra la concentración de grupos tiol alcanzada al final del ensayo en los diferentes cultivos expuestos a metal.

Por tanto, las células de *T. suecica* acumulan compuestos tiólicos al ser expuestas a cadmio. Estos compuestos no fueron detectados en células no expuestas. En consecuencia, la síntesis de compuestos tiólicos en las células de *T. suecica* es debida a

la exposición de las células al metal, dependiendo la concentración de los mismos de la cantidad de metal presente en el medio.

Purificación, identificación y análisis de los compuestos tiólicos inducidos por el cadmio.

Purificación de los compuestos tiólicos mediante cromatografía de exclusión molecular

Como se expuso en el apartado anterior, las células de *T. suecica* expuestas a cadmio sintetizan y acumulan compuestos con grupos tiol, detectándose una clara relación metal/-SH. La presencia y considerable aumento de estos compuestos ricos en grupos tiólicos en las microalgas expuestas a cadmio se consideró la primera prueba de la presencia de algún tipo de metalotioneínas de clase III en estas células. Para poder caracterizar estos compuestos se procedió a la purificación de estas moléculas mediante cromatografía en columna de exclusión molecular.

Para ello se obtuvieron extractos celulares brutos alcalinos de *T. suecica* a partir de las células de un cultivo control y de un cultivo de la microalga expuesto a 7.9 mg Cd/L durante 7 días. Se seleccionó esta concentración para el ensayo, por ser la EC50 obtenida en los ensayos previos de evaluación de toxicidad del cadmio sobre el crecimiento (ver apartado “Evaluación del efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Tetraselmis suecica*”).

La cromatografía se realizó en Biogel P-60 midiéndose la absorbancia a una λ de 254 nm que es donde absorben los compuestos metálicos. Se obtuvieron fracciones de 4 ml que se analizaron para conocer la cantidad de grupos tiol y la cantidad de cadmio en cada fracción. Los cromatogramas obtenidos de estos extractos se muestran en la figura 10.

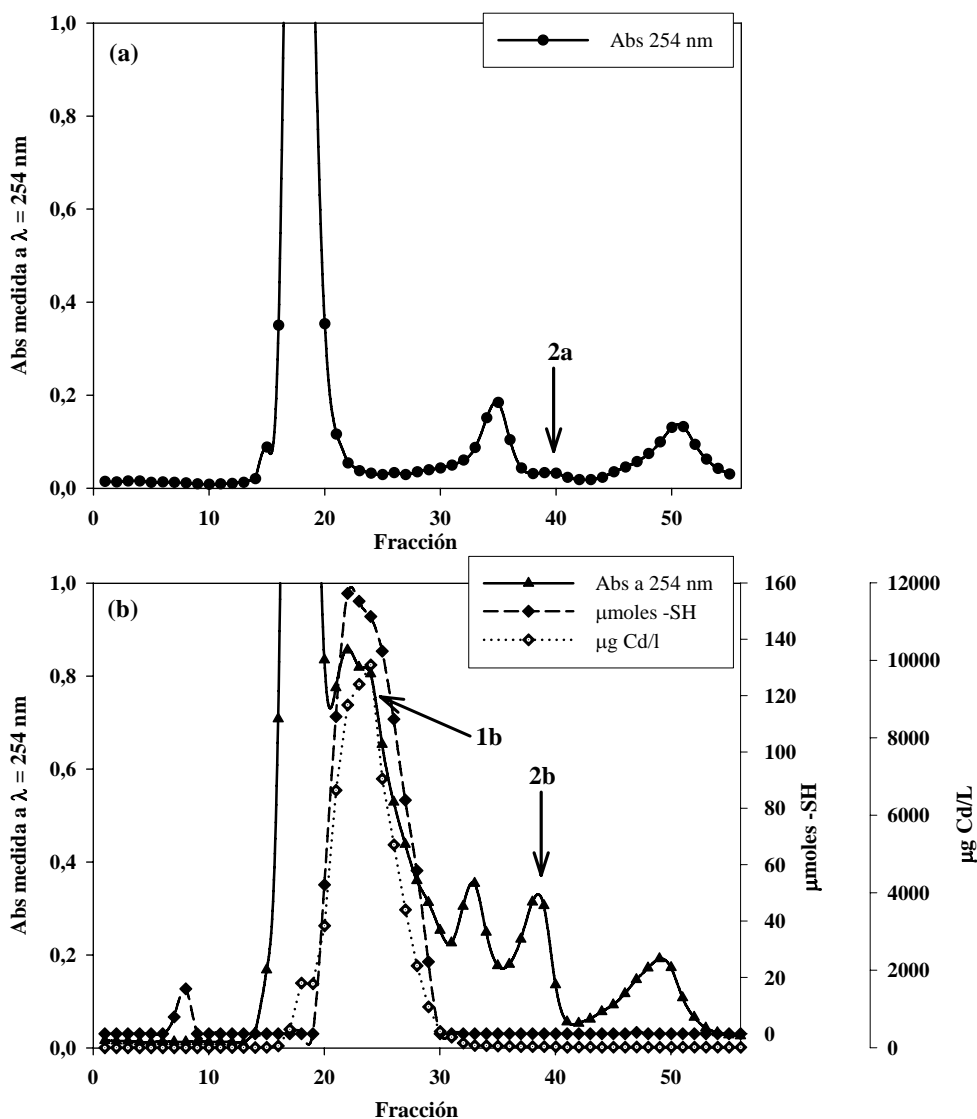


Figura 10. Cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-60 de extractos brutos alcalinos procedentes de células de *Tetraselmis suecica* sin exponer y expuestas a 7.9 mg Cd/L durante 7 días.

Observamos que en el cromatograma del extracto perteneciente al cultivo de *T. suecica* expuesto a cadmio (figura 10b) aparece claramente un pico con una elevada absorbancia a 254 nm que no está presente en el control (figura 10a) y que

denominamos pico 1b. La aparición de este pico es una consecuencia de la exposición de las células al cadmio.

El análisis del contenido de los grupos tiol de las distintas fracciones, obtenidas del extracto de células expuestas al cadmio, se lleva a cabo por el método de Ellman. Como se observa en la figura 10, la mayor cantidad de grupos tiol se corresponde con el pico 1 de la figura b que aparece en este cromatograma

El análisis del contenido de cadmio en las distintas fracciones realizado mediante ICP-MS indicó que al igual que sucede con los grupos tiol, el pico máximo de concentración de cadmio coincide también con el pico 1b que aparece en este cromatograma (figura 10b). Este análisis de metales mostró que del total del cadmio presente en el extracto inicial aplicado a la columna de cromatografía el mayor porcentaje aparece en las fracciones de este pico (fracciones 20-29) alcanzando una concentración del 91.43 %. El otro pico de cadmio, más pequeño con respecto al anterior, se correspondería con metal unido no específicamente a proteínas celulares de alto peso molecular.

Por tanto, el tratamiento con cadmio de las células de *T. suecica* origina un claro incremento en la concentración intracelular de compuestos no proteicos con grupos -SH. La separación cromatográfica en Biogel P-60 muestra que la mayoría de estos compuestos tiólicos se localizan en unas pocas fracciones, las cuales tienen el mayor contenido en cadmio, formando de esta manera tiolatos metálicos. Esta es la principal característica de las metalotioneínas de clase III, cuya síntesis es inducida por la presencia de cadmio en el medio. Estas moléculas estarían actuando como sustancias quelantes para este metal.

La exposición a cadmio supuso el aumento del pico 2. Este pico pertenece a moléculas de bajo peso molecular y más pequeñas que las metalotioneínas de clase III puesto que su aparición en el cromatograma es posterior a las mismas. Los diferentes

análisis realizados en las fracciones pertenecientes a estos picos mostraron que no presentaban grupos tiol ni tampoco cadmio.

Composición de aminoácidos de los péptidos purificados

El análisis de los aminoácidos de los péptidos purificados se llevó a cabo mediante digestión y posterior análisis por HPLC (ver sección Material y Métodos).

En la fracción purificada sólo se detectaron tres aminoácidos: glicina, glutámico y cisteína, siendo el glutámico y la cisteína los aminoácidos más abundantes y la glicina el minoritario. Este dato confirma que las moléculas purificadas se corresponden con la estructura de las fitoquelatinas, la forma más típica de metalotioneínas de clase III, ya que estos compuestos se componen de repeticiones del dipéptido γ -glutamilcisteína con un solo residuo carboxi-terminal de glicina, presentando la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$

Separación por electroforesis capilar de los péptidos purificados

Para la determinación de los compuestos presentes en las fracciones purificadas se llevó a cabo un análisis mediante electroforesis capilar. Los electroferogramas obtenidos por esta técnica se muestran en la figura 11, en los que se representan la separación del glutatión y el tiempo de migración que emplea en recorrer el capilar desde el extremo de inyección al detector y la migración de las fitoquelatinas purificadas.

En los electroferogramas de las fracciones 22 a 26 se detectan fitoquelatinas de diferente longitud, esta longitud depende del número de subunidades. Dicha longitud se representa en los electroferogramas indicando el valor correspondiente de n .

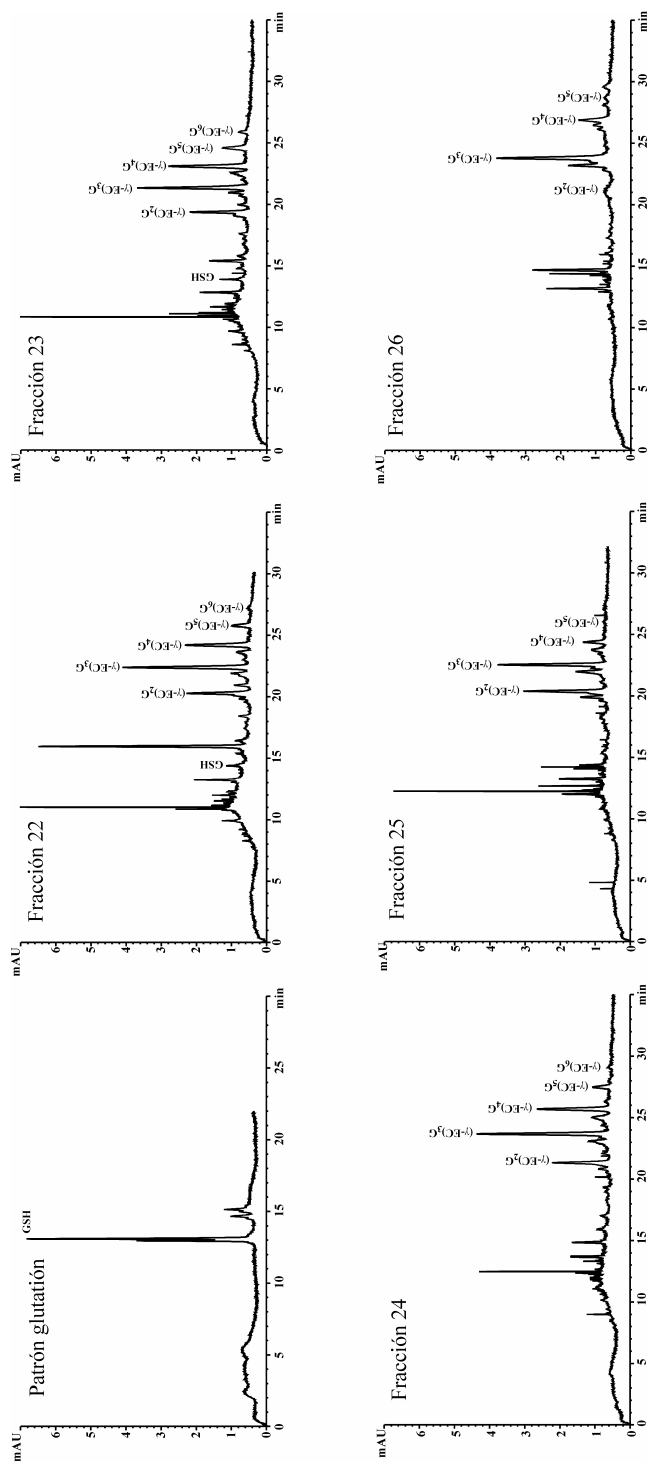


Figura 11. Cromatogramas obtenidos por electroforesis capilar de GSH y de las fracciones 22 a 26 obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular, que corresponden a las fracciones en que se midió mayor cantidad de grupos tiol. Solución electrolítica: H_3PO_4 150 mM. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 25 s; voltaje aplicado: 12 KV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 210 nm.

La determinación del valor de n se puede deducir a partir de esta técnica de electroforesis capilar, desarrollada por Torres *et al.* (1997b). Con la finalidad de suprimir la carga negativa de los péptidos se usó un electrolito ácido (ácido fosfórico 150 mM), de tal manera que su movilidad electroforética dependa exclusivamente de su tamaño molecular y de la carga positiva que tienen en estas condiciones. La carga positiva viene determinada por el grupo amino del aminoácido terminal glicina, siendo único en todos los péptidos, por lo tanto, tendrán la misma carga positiva y su diferente movilidad electroforética hacia el cátodo dependerá solamente de su diferente tamaño molecular. Asumiendo que las fitoquelatinas purificadas se diferencian entre sí por una única subunidad adicional, la diferencia en el tiempo de migración de dos de estas moléculas vendrá determinada por esa subunidad a mayores (ya que la carga positiva es igual en ambas). Si relacionamos el tiempo de migración que corresponde a esta diferencia con la diferencia en el tiempo de migración del glutatión (que equivale a una fitoquelatina de una sola subunidad) y de la primera de las fitoquelatinas purificadas, obtendremos el número de subunidades de la primera de las fitoquelatinas que aparece. Haciendo este cálculo, el valor obtenido es dos, indicando que la primera de las fitoquelatinas purificadas presenta dos subunidades de (γ -Glu-Cys); el resto correspondería a una fitoquelatina con una subunidad más que la anterior.

De este modo, en las fracciones 22 a 24 se detectaron fitoquelatinas de 2 a 6 subunidades, mientras que en la 25 y 26 se detectaron fitoquelatinas con 2 a 5 subunidades (figura 11). En consecuencia, esta microalga, debido a su exposición a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L durante 7 días, es capaz de sintetizar fitoquelatinas con hasta 6 subunidades de (γ -Glu-Cys). Asimismo, se detectó GSH en dos de las fracciones (fracciones 22 y 23).

Esta técnica aunque permite determinar el tipo de compuestos presentes en las fracciones, así como el número de subunidades de las fitoquelatinas, no permite realizar una cuantificación directa de los diferentes componentes tóxicos detectados en las células. La técnica utilizada necesita la previa purificación de los compuestos

tiólicos, lo que alarga enormemente el tiempo de análisis. Por lo tanto fue necesario el desarrollo de una nueva técnica más sencilla y rápida (sin previas purificaciones) que permitiera cuantificar los grupos tiol sin producir ningún tipo de alteración en los mismos, como la oxidación.

Análisis y separación de compuestos tiólicos mediante electroforesis capilar en extractos brutos de *Tetraselmis suecica*.

Se investigaron las condiciones necesarias para obtener una adecuada resolución de los picos de los electroferogramas, obtenidos mediante electroforesis capilar, de muestras derivatizadas con mBrB. Para ello, se tuvieron en consideración tanto la composición de la solución electrolítica como de la matriz de la muestra.

Optimización del método de análisis mediante CZE

Optimización del electrolito

Se utilizó como electrolito de base ácido fosfórico 150 mM, que es el electrolito utilizado para el análisis de muestras purificadas por cromatografía de exclusión molecular.

Optimización del pH de la solución electrolítica. La primera etapa para mejorar la selectividad y eficiencia de separación fue la modificación del pH. Los pHs ensayados fueron 1.5, 1.55, 1.60, 1.65 y 1.75 (figura 12).

El tiempo de migración más corto se obtuvo con el pH más bajo pero los picos no se separaban correctamente pues el aminoácido cisteína comigraba con otros picos no identificados. Los tiempos de migración obtenidos para los diferentes compuestos tiólicos se muestran en la tabla 10. Asimismo, el GSH y el γ -Glu-Cys migraban formando un solo pico (figura 12a). Tampoco se consiguieron separar las fitoquelatinas de sus respectivas fitoquelatinas desgliciladas.

Tabla 10. Tiempo de migración de los diferentes compuestos tiólicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μ m de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 12 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.

	Cys	γ -Glu-Cys	GSH	(γ -EC) ₂ G	(γ -EC) ₃ G	(γ -EC) ₄ G	(γ -EC) ₅ G
pH 1.50	9.48 \pm 0.14	10.31 \pm 0.10	10.46 \pm 0.15	13.13 \pm 0.21	14.91 \pm 0.16	16.35 \pm 0.13	17.59 \pm 0.21
pH 1.55	11.94 \pm 0.15	12.29 \pm 0.13	12.92 \pm 0.21	16.56 \pm 0.17	19.17 \pm 0.22	21.38 \pm 0.27	23.37 \pm 0.24
pH 1.60	12.61 \pm 0.18	13.28 \pm 0.19	13.69 \pm 0.16	17.65 \pm 0.23	20.56 \pm 0.25	23.05 \pm 0.33	25.13 \pm 0.33
pH 1.65	12.96 \pm 0.14	13.80 \pm 0.11	14.04 \pm 0.17	18.37 \pm 0.23	21.52 \pm 0.28	24.09 \pm 0.29	26.32 \pm 0.36
pH 1.75	13.67 \pm 0.19	14.53 \pm 0.25	14.95 \pm 0.21	19.52 \pm 0.19	22.71 \pm 0.28	25.37 \pm 0.20	27.65 \pm 0.24
150 mM	12.61 \pm 0.09	13.28 \pm 0.16	13.69 \pm 0.17	17.65 \pm 0.25	20.56 \pm 0.19	23.05 \pm 0.29	25.13 \pm 0.31
170 mM	12.99 \pm 0.08	13.72 \pm 0.13	14.20 \pm 0.19	18.43 \pm 0.17	21.48 \pm 0.24	24.31 \pm 0.31	26.59 \pm 0.36
200 mM	12.72 \pm 0.11	13.70 \pm 0.15	14.02 \pm 0.23	18.24 \pm 0.26	21.20 \pm 0.31	23.75 \pm 0.33	26.40 \pm 0.34

Al aumentar el pH de la solución electrolítica el aminoácido cisteína, γ -Glu-Cys y GSH se separaron perfectamente en tres picos diferentes (figura 12: b, c, d y e). La mejor separación fue obtenida con una solución electrolítica de pH 1.60 (figura 12c), el uso de este electrolito permitió también diferenciar los picos de las fitoquelatinas y sus respectivas fitoquelatinas desgliciladas que en las soluciones electrolíticas de pHs más bajos migraban como un solo pico o no se diferenciaban claramente. Asimismo, el número de platos teóricos mejoró considerablemente con un pH de 1.60 respecto a las soluciones electrolíticas de pH más bajo (tabla 11). Con la solución electrolítica de pH 1.75, aunque se mejoró la resolución (tabla 12) de la mayoría de los picos, el número de platos teóricos (tabla 11) disminuyó y aumentó el tiempo de migración (tabla 10) puesto que el electroferograma tardó 2 minutos más en finalizar que con la solución electrolítica de pH 1.60.

Elección del tampón y de su adecuada concentración. Una vez optimizado el pH que debe tener la solución electrolítica, se ensayaron diferentes concentraciones de tampón fosfato y citrato a ese pH (pH 1.60) como posibles soluciones electrolíticas (figura 13). Las concentraciones usadas fueron 150, 170 y 200 mM. Aunque con el tampón citrato la conductividad fue relativamente baja (55, 60 y 65 μ A, respectivamente) y el tiempo de migración fue más corto, la sensibilidad y resolución fueron superiores con fosfato. Por otra parte, los tioles peptídicos más pequeños (γ -Glu-Cys y GSH) y el aminoácido cisteína no se diferenciaron entre sí usando tampón citrato, migrando como un solo pico. De la misma manera, los picos de las fitoquelatinas, obtenidos con las soluciones electrolíticas formadas por citrato, son anchos y mal definidos y las fitoquelatinas desgliciladas no se detectaron (figura 13: 2a, 2b y 2c).

Por lo tanto, el fosfato se eligió como la solución electrolítica más óptima, obteniéndose una adecuada separación de la cisteína, el γ -Glu-Cys, el GSH, las fitoquelatinas y de las fitoquelatinas desgliciladas (figura 13, 1a, 1b y 1c). El aumento en la concentración del tampón fosfato supone principalmente un aumento en el tiempo de migración y en la conductividad. Así, con las concentraciones más altas del

electrolito formado por fosfato (170 y 200 mM), el tiempo de migración aumentó ligeramente y disminuyó la resolución (tablas 10 y 12 respectivamente). Asimismo, con estas concentraciones más altas del electrolito, el considerable aumento de la conductividad, supone un ensanchamiento de los picos y una disminución en el número de platos teóricos de la mayoría de los picos identificados. Los mejores resultados se obtuvieron con tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, saliendo el último pico identificado después de 25 minutos.

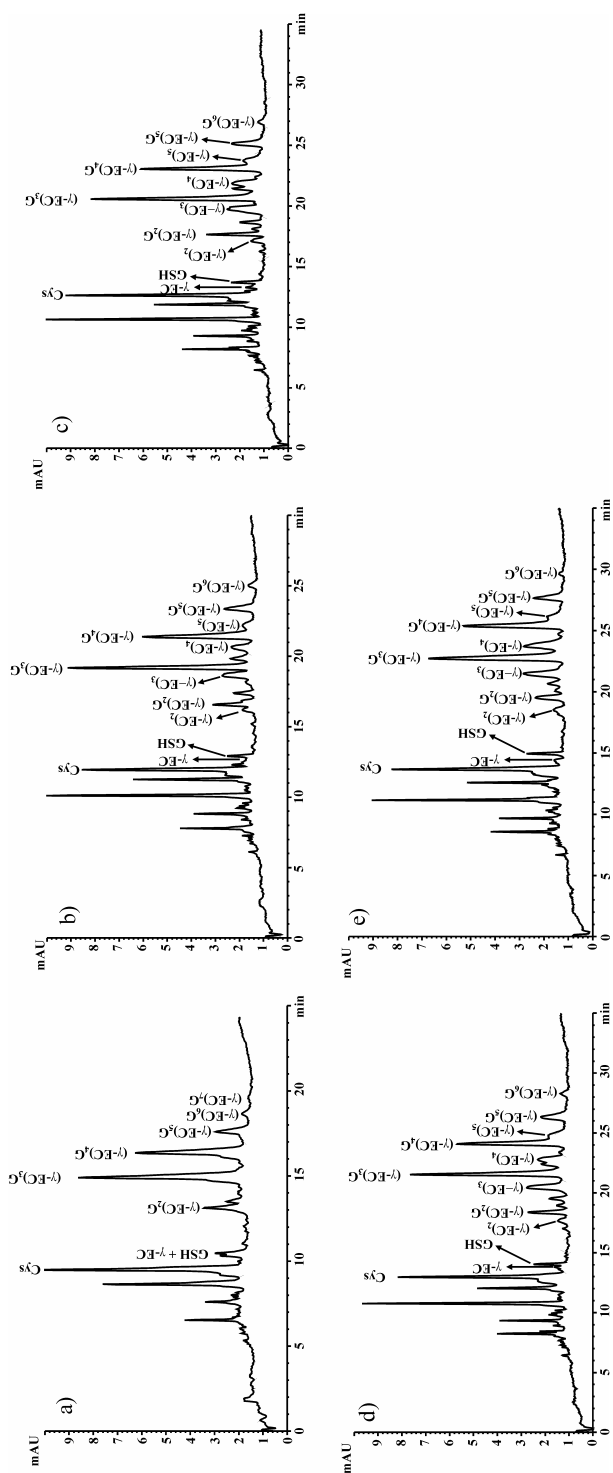


Figura 12. Electroferogramas obtenidos de muestras de *Tetrasetimis suecica* derivatizadas con mBrB y usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM con diferentes pHs: a) 1.50; b) 1.55; c) 1.60; d) 1.65; e) 1.75. Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μ m de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras son introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 12 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los picos sin asignación son compuestos tiónicos sin identificar.

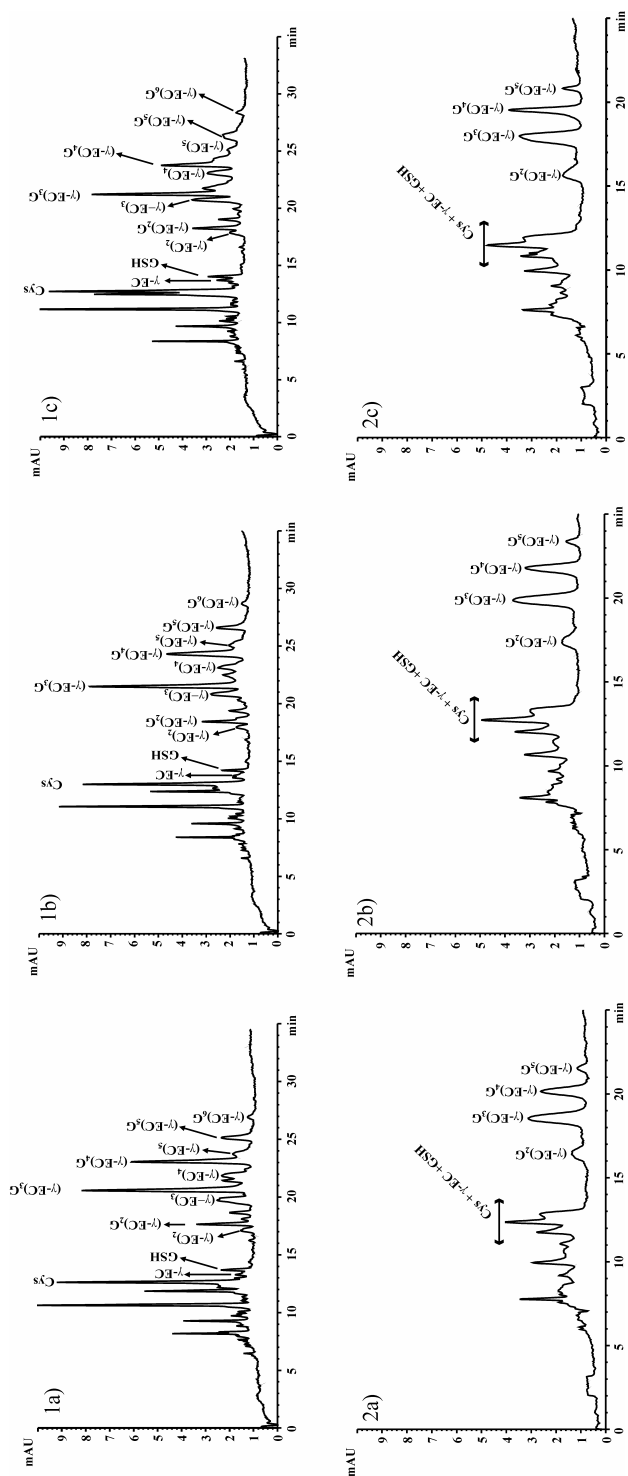


Figura 13. Separación de los compuestos tiólicos mediante CZE usando como solución electrolítica tampón fosfato (1) y citrato (2), ambos a pH 1.60, a diferentes concentraciones: a) 150 mM; b) 170 mM; c) 200 mM. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 12. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar.

Tabla 11. Platos teóricos de los diferentes compuestos tiólicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.

	Cys	γ -Glu-Cys	GSH	(γ -EC) ₂ G	(γ -EC) ₃ G	(γ -EC) ₄ G	(γ -EC) ₅ G
pH 1.50	18890 \pm 789	30746 \pm 2365	21927 \pm 1740	24338 \pm 2654	24287 \pm 1103	23711 \pm 2134	24739 \pm 1871
pH 1.55	27730 \pm 1228	61883 \pm 3675	37248 \pm 2447	40127 \pm 3246	50920 \pm 4243	37858 \pm 1509	30265 \pm 2043
Tampón fosfato 150 mM	28111 \pm 1788	13744 \pm 1653	36976 \pm 2312	51246 \pm 4337	43875 \pm 2618	47107 \pm 2434	29885 \pm 3200
pH 1.65	28760 \pm 1876	16672 \pm 1100	58093 \pm 3453	34798 \pm 2103	40865 \pm 3445	43041 \pm 2376	22003 \pm 1178
pH 1.75	30799 \pm 2102	-	62802 \pm 3212	16826 \pm 1856	23792 \pm 1667	36563 \pm 2020	37696 \pm 2343
150 mM	28111 \pm 1788	13744 \pm 1653	36976 \pm 2312	51246 \pm 4337	43875 \pm 2618	47107 \pm 2434	29885 \pm 3200
Tampón fosfato pH 1.60	29187 \pm 3167	9585 \pm 198	42633 \pm 2778	50055 \pm 4334	48199 \pm 3767	23506 \pm 1786	41663 \pm 3111
200 mM	27824 \pm 1056	26313 \pm 987	40740 \pm 2131	40534 \pm 3566	51483 \pm 3778	43973 \pm 4231	10271 \pm 1567

Tabla 12. Resolución de los diferentes compuestos tiólicos obtenidos en los electroferogramas usando como solución electrolítica tampón fosfato a diferentes pHs y concentraciones. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.

	Cys	γ -Glu-Cys	GSH	(γ -EC) ₂ G	(γ -EC) ₃ G	(γ -EC) ₄ G	(γ -EC) ₅ G
pH 1.50	3.26 \pm 0.85	-	0.56 \pm 0.03	8.61 \pm 1.01	4.33 \pm 0.11	3.57 \pm 0.08	2.84 \pm 0.07
pH 1.55	2.74 \pm 0.11	2.67 \pm 0.18	12.16 \pm 2.08	2.16 \pm 0.86	1.10 \pm 0.12	1.29 \pm 0.09	4.06 \pm 0.76
Tampón fosfato 150 mM	1.54 \pm 0.14	0.79 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04	1.19 \pm 0.05	1.30 \pm 0.12	1.81 \pm 0.32	4.13 \pm 0.88
pH 1.65	3.31 \pm 0.23	2.27 \pm 0.87	0.73 \pm 0.03	1.31 \pm 0.16	1.91 \pm 0.34	2.04 \pm 0.88	3.80 \pm 0.98
pH 1.75	4.25 \pm 0.54	-	4.66 \pm 0.32	10.86 \pm 1.25	1.83 \pm 0.05	2.37 \pm 0.07	4.13 \pm 0.76
150 mM	1.54 \pm 0.14	0.79 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04	1.19 \pm 0.05	1.30 \pm 0.12	1.81 \pm 0.32	4.13 \pm 0.88
Tampón fosfato pH 1.60	0.80 \pm 0.02	0.37 \pm 0.06	1.13 \pm 0.06	1.14 \pm 0.21	1.16 \pm 0.09	1.56 \pm 0.09	2.09 \pm 0.13
200 mM	0.80 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01	1.03 \pm 0.07	0.89 \pm 0.02	0.99 \pm 0.09	1.22 \pm 0.12	3.54 \pm 0.45

Adición de modificadores orgánicos. Una vez seleccionados el pH, el tipo y la concentración del electrolito, se ensayaron de manera independiente, diferentes modificadores orgánicos para mejorar la solución electrolítica (figura 14). Los modificadores orgánicos utilizados fueron metanol, acetonitrilo y trifluoroetanol. Las concentraciones añadidas de estos modificadores al electrolito fueron del 2.5, 5 y 10 % (v/v). La adición de estos modificadores no supuso variaciones importantes en el número de platos teóricos y en la resolución (tablas 13 y 14), pero sí supuso un aumento en el tiempo de migración, la disminución de la conductividad y ligeras modificaciones en la eficiencia de separación de los picos como se aprecia en la figura 14. Así, tanto al añadir trifluoroetanol como acetonitrilo con una concentración del 2.5 % no se apreciaron cambios en el número de platos teóricos ni en la resolución, aunque al añadir acetonitrilo, la $(\gamma\text{-EC})_4$ comigra con un componente tóxico no identificado (figura 14, 2a). Al aumentar la concentración de acetonitrilo y trifluoroetanol hasta un 10 % (v/v), tanto $\gamma\text{-Glu-Cys}$ como la cisteína comigraron con otros tioles no identificados (figura 14: 1c y 2c).

Los mejores resultados se obtuvieron con metanol, pues la adición de un 2.5 % supuso una ligera mejora en la resolución y en el número de platos teóricos. El aumento de la concentración de metanol no implicó cambios significativos en la resolución pero sí un aumento en el tiempo de migración (figura 14: 3a, 3b y 3c).

Por lo tanto, los mejores resultados se obtuvieron con una solución electrolítica formada por tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, y metanol al 2.5 % (v/v).

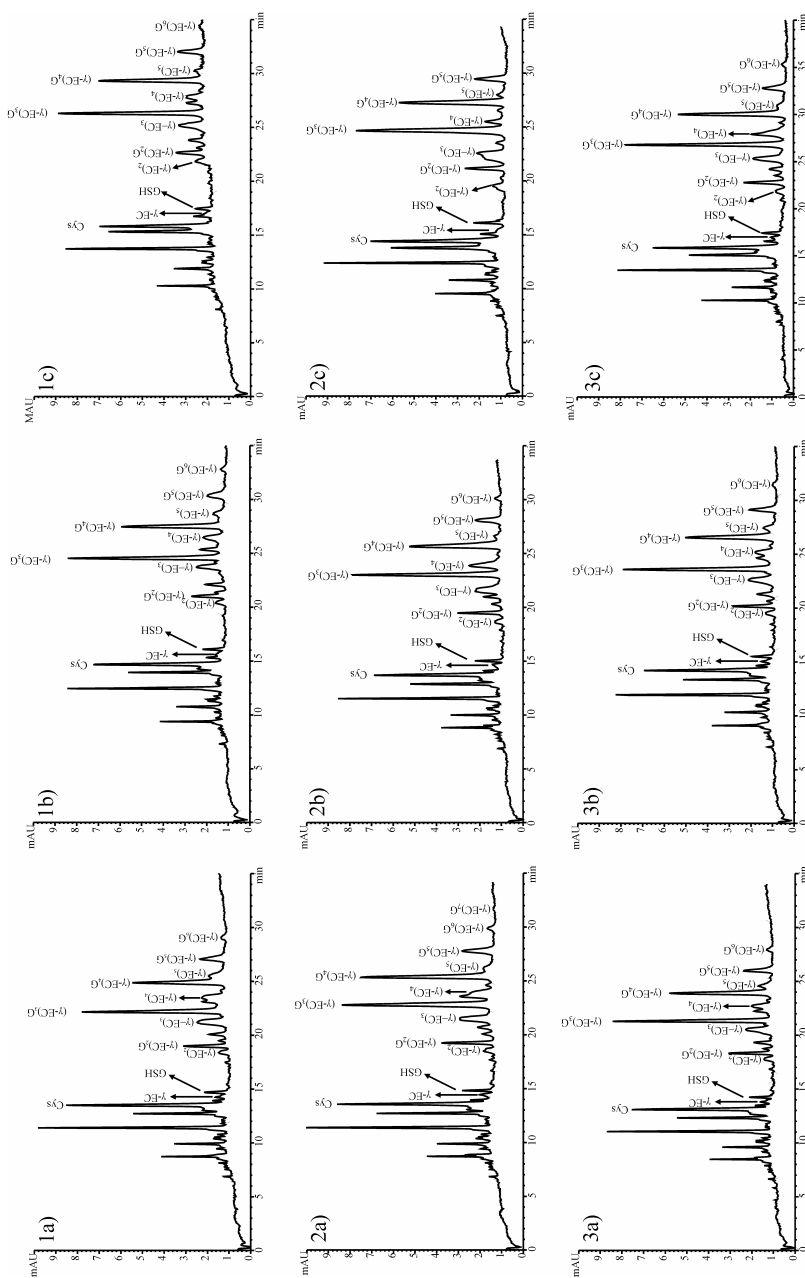


Figura 14. Separación de los compuestos tiólicos mediante CZE añadiendo a la solución electrolítica, formada por tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, diferentes concentraciones de los modificadores orgánicos trifluoroetanol (1), acetonitrilo (2) y metanol (3): a) 2.5 %, b) 5 % y c) 10 % (v/v). Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 12. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar.

Tabla 13. Platos teóricos de los diferentes compuestos tóxicos separados mediante electroforesis capilar usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM, pH 1.60 a la que se añadió diferentes concentraciones de trifluoroetanol, acetonitrilo o metanol. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.

	Cys	γ-Glu-Cys	GSH	(γ-EC)₂G	(γ-EC)₃G	(γ-EC)₄G	(γ-EC)₅G
2.5 %	28928 \pm 2658	13790 \pm 1377	42561 \pm 2868	53531 \pm 3054	50919 \pm 3144	48173 \pm 2330	33754 \pm 1984
5 %	30650 \pm 2443	9431 \pm 683	52735 \pm 3134	41918 \pm 2077	64895 \pm 3454	60309 \pm 3933	21686 \pm 1494
10 %	31862 \pm 1741	45800 \pm 2375	47038 \pm 3656	31978 \pm 2871	71731 \pm 4897	70500 \pm 5178	49856 \pm 3662
2.5 %	26786 \pm 976	20661 \pm 2132	61250 \pm 5490	62065 \pm 3871	33367 \pm 2434	54026 \pm 3321	30676 \pm 2387
5 %	28190 \pm 2457	-	72189 \pm 4332	65826 \pm 4467	48890 \pm 3421	31010 \pm 2136	36384 \pm 2477
10 %	27006 \pm 1765	32603 \pm 1779	57885 \pm 3437	49825 \pm 3765	31743 \pm 2154	39267 \pm 3214	43764 \pm 3657
2.5 %	29551 \pm 989	12122 \pm 879	49618 \pm 2755	60256 \pm 3242	58377 \pm 4129	46580 \pm 3226	50898 \pm 3369
5 %	27941 \pm 1347	18282 \pm 677	48275 \pm 2577	62472 \pm 4565	57690 \pm 3456	42092 \pm 2407	49380 \pm 1893
10 %	27324 \pm 2375	17123 \pm 2386	41960 \pm 2631	48511 \pm 3211	58690 \pm 2673	55052 \pm 2226	35609 \pm 1878

Tabla 14. Resolución de los diferentes compuestos tiólicos separados mediante electroforesis capilar usando como solución electrolítica tampón fosfato 150 mM, pH 1.60 a la que se añadió diferentes concentraciones de trifluoroetanol, acetonitrilo o metanol. Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la tabla 10. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 6 réplicas de las diferentes soluciones electrolíticas.

	Cys	γ-Glu-Cys	GSH	(γ-EC)₂G	(γ-EC)₃G	(γ-EC)₄G	(γ-EC)₅G
trifluoroetanol	2.5 %	2.77 \pm 0.39	1.15 \pm 0.12	1.29 \pm 0.36	1.48 \pm 0.47	1.89 \pm 0.35	4.20 \pm 0.86
	5 %	2.53 \pm 0.65	1.32 \pm 0.07	1.10 \pm 0.08	1.52 \pm 0.06	1.61 \pm 0.11	4.45 \pm 1.31
	10 %	1.56 \pm 0.09	2.82 \pm 0.43	2.18 \pm 0.08	12.55 \pm 4.76	1.77 \pm 0.31	2.38 \pm 0.87
acetoneitrilo	2.5 %	1.64 \pm 0.07	1.70 \pm 0.21	1.21 \pm 0.06	1.45 \pm 0.12	1.81 \pm 0.27	2.39 \pm 0.51
	5 %	2.93 \pm 0.21	-	5.08 \pm 1.21	1.56 \pm 0.23	2.15 \pm 0.27	2.65 \pm 0.03
	10 %	1.81 \pm 0.011	1.98 \pm 0.45	3.46 \pm 0.87	15.57 \pm 2.55	2.38 \pm 0.39	3.45 \pm 0.47
metanol	2.5 %	2.93 \pm 1.01	1.02 \pm 0.05	1.16 \pm 0.03	1.25 \pm 0.23	1.27 \pm 0.04	1.14 \pm 0.05
	5 %	2.88 \pm 0.30	1.13 \pm 0.21	1.30 \pm 0.16	1.32 \pm 0.08	1.51 \pm 0.06	1.94 \pm 0.31
	10 %	2.20 \pm 0.38	1.00 \pm 0.02	1.01 \pm 0.04	1.31 \pm 0.07	2.16 \pm 0.22	3.22 \pm 0.77

Determinación del voltaje adecuado

La ley de Ohm se utilizó para la determinación del máximo voltaje que puede ser usado con este electrolito para una adecuada separación. La linealidad en la representación gráfica conductividad vs. voltaje aplicado se perdió al aplicar un voltaje de 14 kV a la solución electrolítica (figura 15). Por lo tanto, el voltaje que se aplicó durante el análisis de las muestras fue de 13 kV, consiguiendo mejorar tanto la resolución de los picos como el tiempo de migración.

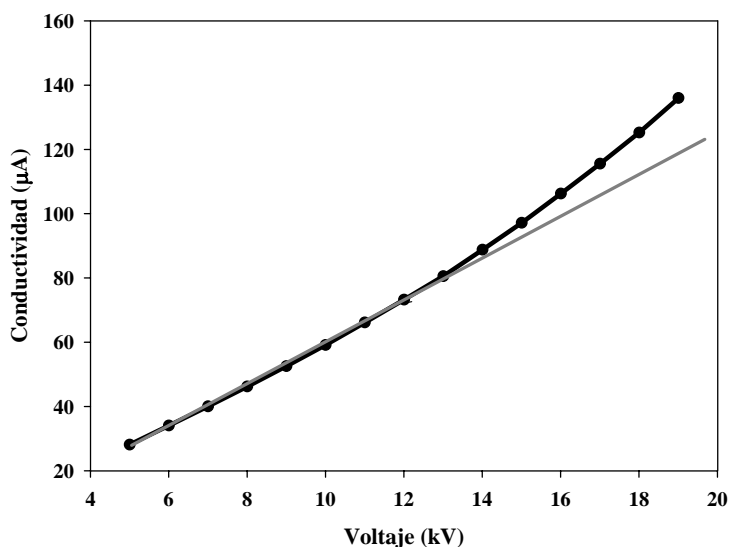


Figura 15. Representación gráfica conductividad vs. voltaje obtenida al aplicar un voltaje entre 5 y 19 kV a una solución electrolítica formada por tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 µm de diámetro interno (longitud total de 38 cm).

Longitud del capilar adecuado

El uso de un capilar más corto supone un tiempo de análisis también más corto. Las separaciones iniciales tuvieron lugar en un capilar de longitud efectiva (desde el punto de inyección de la muestra al detector) de 30 cm. Cuando se acortó el capilar, estableciendo una longitud efectiva de 25 cm, el tiempo de migración disminuyó, como se esperaba, pero el número de platos teóricos empeoró considerablemente,

incluso con un voltaje de 12 kV. Por lo tanto, se mantuvo la longitud del capilar de 30 cm.

Inyección de la muestra

Para conseguir obtener una mayor sensibilidad, sin perder eficiencia en el método desarrollado, se ensayaron diferentes volúmenes de inyección. La inyección de la muestra se llevó a cabo a una presión de 50 mbar analizando diferentes tiempos de inyección: 15, 17, 20, 25, y 30 segundos. La introducción de muestra en el capilar durante 20 segundos o más de inyección provocó una pérdida de resolución que aumentó con los tiempos de inyección superiores. Por otro lado, con un tiempo de inyección de 15 segundos, la sensibilidad de detección de los picos disminuyó y los picos pertenecientes a $(\gamma\text{-EC})_6\text{G}$, presentes en una baja concentración, no se detectaron. Dado que con los tiempos más altos de inyección no se detectaron nuevos picos que podrían estar en concentraciones más bajas y como supuso una pérdida de la resolución, la inyección de las muestras se realizó a una presión de 50 mbar durante 17 segundos.

Optimización del método de extracción y derivatización con mBrB de los compuestos tiólicos presentes en células microalgales.

Se han ensayado diferentes tampones para la extracción y derivatización con mBrB de los compuestos tiólicos para conseguir una adecuada separación electroforética con el electrolito optimizado (tampón fosfato 150 mM, pH 1.60, y metanol al 2.5 % (v/v)), sin perder la eficiencia del mismo. Se aplicó un voltaje de 13 kV y se utilizó un capilar de 30 cm de longitud efectiva. La inyección de la muestra se llevó a cabo mediante presión de 50 mbar durante 17 segundos.

Extracción ácida de los compuestos tiólicos

En lo que se refiere a la extracción ácida de los compuestos tiólicos realizada con las diferentes concentraciones de ácido sulfosalicílico (0.05, 0.1 y 0.2 M), se observó

que este ácido afectaba drásticamente a la separación con CZE (figura 16: a, b y c). Con concentraciones de ácido sulfosalicílico de 0.1 M y 0.2 M, los picos correspondientes a la cisteína, el γ -Glu-Cys y el GSH no se separaron y aunque se distinguieron los picos de $(\gamma\text{-EC})_{2,5}\text{G}$, la sensibilidad fue baja, los picos muy anchos y comigraron con las fitoquelatinas desgliciladas (figura 16a y 16b respectivamente). Con una concentración de ácido sulfosalicílico 0.05 M, cisteína, γ -Glu-Cys y GSH se distinguieron como tres picos separados y bien definidos, mejorando considerablemente la resolución y el número de platos teóricos respecto a las concentraciones más altas de este ácido (figura 16c). Sin embargo, los picos pertenecientes a las fitoquelatinas fueron muy anchos y las fitoquelatinas desgliciladas migran pegadas a las fitoquelatinas.

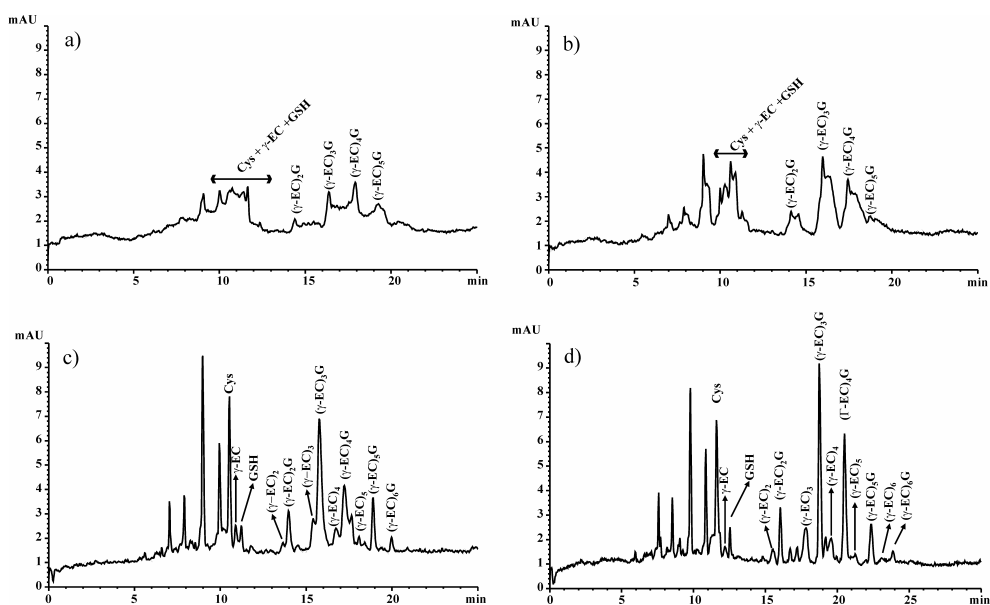


Figura 16. Electroferogramas en los que se muestra el efecto del ácido sulfosalicílico y del HCl en la extracción de los compuestos tiólicos. Ácido sulfosalicílico: a) 0.2 M; b) 0.1 M; c) 0.05 M. HCl d) 0.1 M. Solución electrolítica: H_3PO_4 150 mM, pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm); las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 13 kV; la detección se desarrolló a una longitud de onda de 390 nm. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar.

No obstante, el HCl produjo picos claramente separados y diferenciados, obteniéndose además una resolución y sensibilidad que supera significativamente a la obtenida con ácido sulfosalicílico (figura 16d). Por tanto, el HCl fue el ácido elegido para la extracción de los compuestos tiólicos de las células de *T. suecica* en los ensayos posteriores.

Selección del agente reductor usado durante el proceso de derivatización

Una vez seleccionado el ácido adecuado para realizar la extracción, es importante seleccionar un agente reductor óptimo, así como una concentración del mismo, que evite la oxidación de los grupos -SH durante el proceso de derivatización con mBrB pero que no afecte a la separación mediante electroforesis capilar. Para ello se probaron diferentes concentraciones de NaBH₄ (0.5, 1.5 y 5 mg/ml) y 2-mercaptoetanol (1, 5 y 10 mM) (figura 17). Se utilizó como referencia una muestra derivatizada sin agente reductor (figura 17a).

Los resultados obtenidos indicaron que el mercaptoetanol interfería en el análisis, empeorando considerablemente la sensibilidad, de tal manera que tanto el γ -EC y el GSH como las fitoquelatinas de diferente longitud detectadas, (γ -EC)₂₋₄G, fueron solo ligeramente más altas que la línea de base. Debido a esta pobre sensibilidad las fitoquelatinas desgliciladas, no llegaron a detectarse (figura 17: c1, c2 y c3).

Al contrario que con mercaptoetanol, al utilizar NaBH₄ todos los componentes tiólicos de la muestra fueron claramente detectados (figura 17: b1, b2 y b3). Sin embargo, la sensibilidad, resolución y número de platos teóricos dependió de la concentración del reactivo. La concentración más alta de NaBH₄ (5 mg/ml) afectó a la separación de los picos tanto de γ -Glu-Cys como a los (γ -EC)_n pues comigraban con otros picos; asimismo, el uso de esta alta concentración de NaBH₄ supuso una disminución en el número de platos teóricos (figura 17, b1).

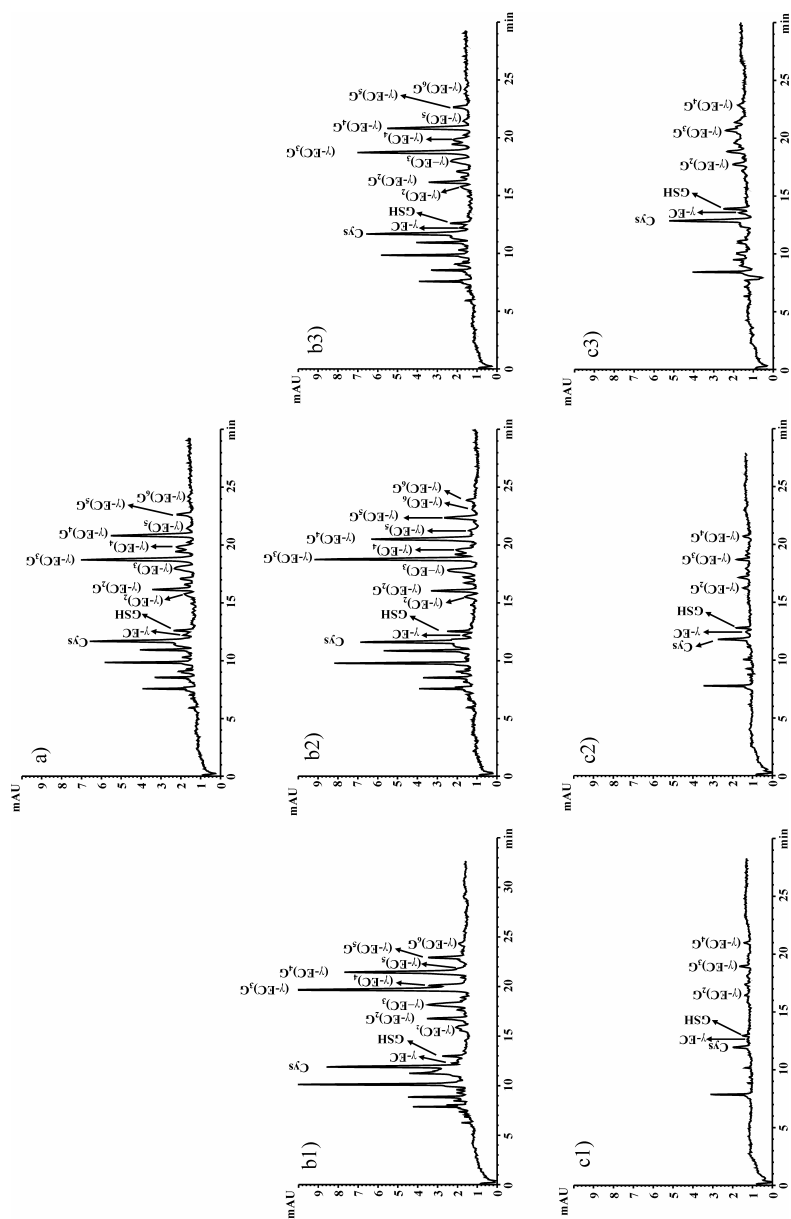


Figura 17. Electroferogramas en los que se muestra el efecto de los diferentes agentes reductores (2-mercaptoetanol y NaBH₄) y sus concentraciones en el proceso de derivatización y en el proceso de análisis con CZE de los compuestos tiólicos. a) muestra derivatizada sin agente reductor. NaBH₄: b1) 5 mg/ml; b2) 1.5 mg/ml; b3) 0.5 mg/ml. 2-mercaptoetanol: c1) 10 mM; c2) 5 mM; c3) 1 mM. La solución electrolítica y las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 16. Los picos sin asignación son compuestos tiólicos sin identificar.

En la concentración más baja de NaBH₄ ensayada (0.05 mg/ml) (figura 17, b3) y en el control (figura 17a), al que no se añadió agente reductor, se observó una notable disminución en el tamaño de los picos. Los mejores resultados se obtuvieron al añadir al tampón de derivatización una concentración de NaBH₄ de 1.5 mg/L (figura 17, b2).

Características del método desarrollado

La linealidad y el límite de detección del método se comprobó analizando diferentes concentraciones de una solución patrón de glutatión (0.5 μM a 100 μM), después del proceso de derivatización y análisis mediante CZE. La gráfica que representa el área de los picos frente a la concentración fue lineal ($R^2 = 0.997$) en este rango de concentraciones. La concentración más pequeña detectada del patrón de GSH fue de 2.5 μM.

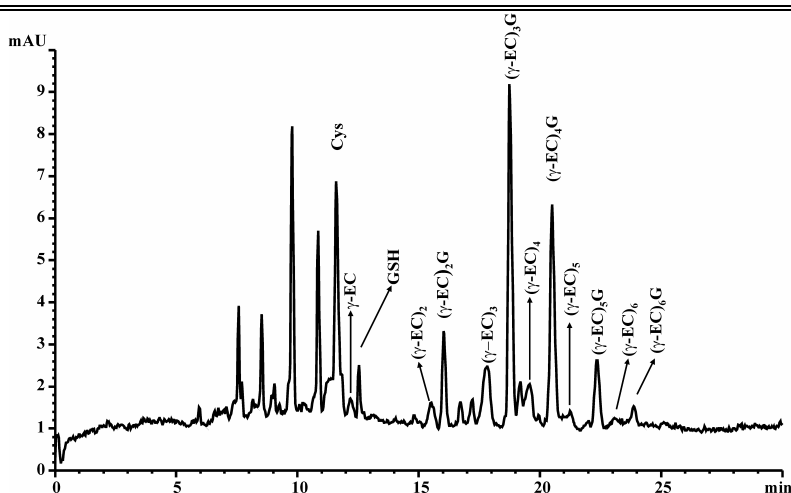


Figura 18. Electroferogramas de los compuestos tiólicos presentes en una muestra de la microalga marina *Tetraselmis suecica* expuesta durante 7 días a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L. Solución electrolítica: H₃PO₄ 150 mM, pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v). Condiciones de la CZE: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17 s; voltaje aplicado: 13 kV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 390 nm. Procedimiento de extracción: HCl 0.1 M. Agente reductor: 1.5 mg/ml de NaBH₄.

La figura 18 muestra un electroferograma obtenido de los diferentes compuestos tiólicos extraídos de una muestra de *T. suecica* expuesta durante 7 días a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L con el método desarrollado. La tabla 15 muestra el número de platos teóricos y la resolución obtenida con este método.

Tabla 15. Número de platos teóricos y resolución de los compuestos tiólicos identificados en el electroferograma del método desarrollado. La solución electrolítica y las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mismas que en la figura 18.

	Número de platos teóricos	Resolución
Cys	26422±1587	3.03±0.15
γ -Glu-Cys	15266±2758	1.70±0.03
GSH	61181±2436	1.19±0.07
γ -EC) ₂ G	55655±2287	14.72±0.32
γ -EC) ₃ G	62096±3421	2.07±0.15
γ -EC) ₄ G	58944±2654	1.83±0.11
γ -EC) ₅ G	56536±3655	5.19±0.21
γ -EC) ₆ G	90654±4445	4.38±0.27

Composición y producción a lo largo del tiempo de diferentes compuestos tiólicos en la microalga marina *Tetraselmis suecica* expuesta a cadmio.

Tras haber optimizado el método de extracción y derivatización de los compuestos tiólicos, así como su análisis mediante CZE, se estudió la evolución a lo largo del tiempo de los diferentes compuestos tiólicos identificados en las células de *T. suecica* expuesta a diferentes concentraciones de cadmio (3, 7.9, 15, 30 mg/L).

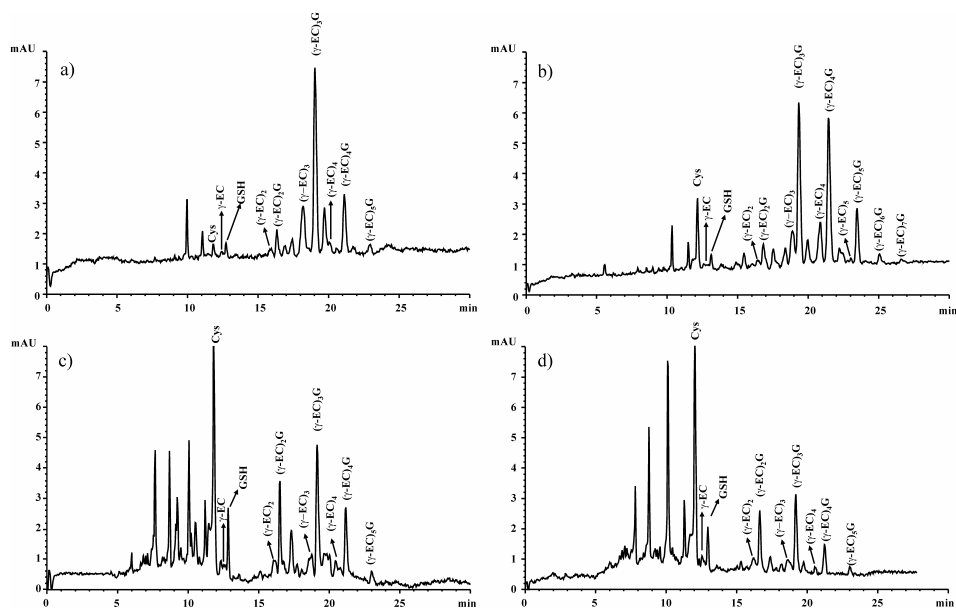


Figura 19. Electroferogramas obtenidos por CZE de extractos celulares de los cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L.

Los compuestos tiólicos identificados y analizados fueron glutatión, γ -Glu-Cys, el aminoácido cisteína y fitoquelatinas de diferente longitud (de 2 a 7 subunidades). Asimismo, se consiguieron detectar fitoquelatinas desgliciladas de 2 a 6 subunidades. En la figura 19 se muestra un ejemplo de los electroferogramas obtenidos por CZE de

los compuestos tiólicos presentes en los extractos celulares de los cultivos de *T. suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio durante 8 días.

Producción a lo largo del tiempo de glutatión, γ -Glu-Cys y del aminoácido cisteína

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la concentración de estos tioles de bajo peso molecular y que son precursores de las fitoquelatinas dependió de la concentración de cadmio añadido al medio (figura 20).

Las células de *T. suecica* tratadas con cadmio mostraron una disminución en el contenido de GSH en todos los cultivos tratados con cadmio durante el primer día de exposición al metal, aumentando en los días posteriores de ensayo. En los cultivos expuestos a 3 y 7.9 mg/L, la concentración de GSH aumentó hasta alcanzar una concentración similar a la concentración inicial (día 0) y se mantuvo sin cambios significativos ($p < 0.05$) hasta los últimos días de cultivo (figura 20, b y c). En las células expuestas a ambas concentraciones de cadmio (3 y 7.9 mg/L) la cantidad de GSH alcanzada no superó la máxima concentración sintetizada por las células del cultivo control (242.04 ± 3.58 amol -SH/cél), siendo 202.48 ± 41.87 y 240.98 ± 18.56 amol -SH/cél respectivamente, la mayor cantidad de GSH medida en estos cultivos. Según la prueba de Duncan la concentración de GSH no mostró diferencias significativas entre los cultivos control y los expuestos a 3 y 7.9 mg Cd/L.

En los cultivos expuestos a 15 y 30 mg Cd/L (figura 20, d y e) la cantidad de GSH sobrepasó, desde el segundo día, la concentración presente al inicio del cultivo y aumentó su concentración sustancialmente respecto a los cultivos tratados con las concentraciones más bajas de cadmio (3 y 7.9 mg Cd/L).

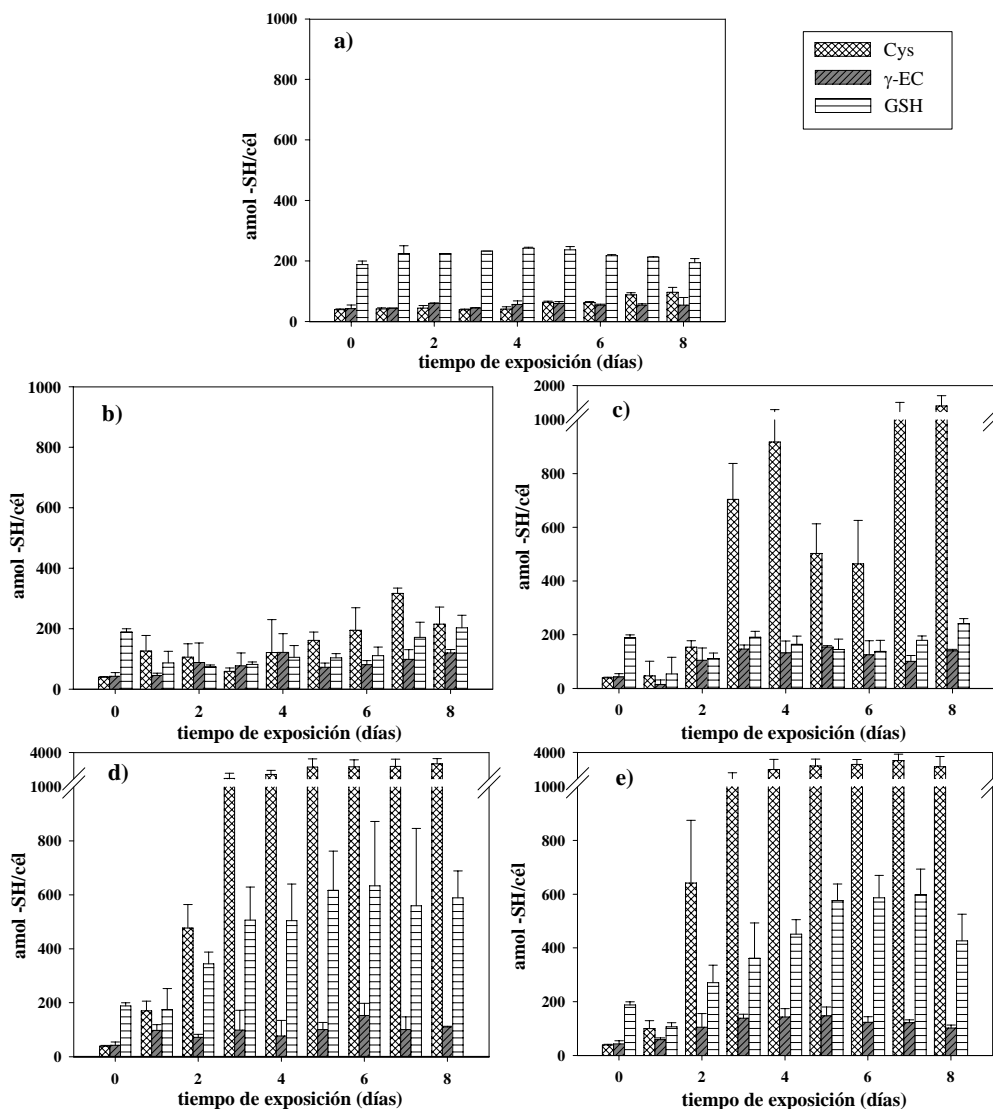


Figura 20. Evolución de la concentración de GSH, γ -Glu-Cys (γ -EC) y del aminoácido cisteína en células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) control, b) 3 mg/L, c) 7.9 mg/L, d) 15 mg/L y e) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas \pm desviación típica.

La mayor concentración de GSH se midió en las células tratadas con 15 mg Cd/L después de seis días de cultivo (633.06 ± 238.82 amol -SH/cél), siendo 3.3 veces mayor que el día 0. En los cultivos expuestos a la mayor cantidad de cadmio (30 mg

Cd/L), la concentración de GSH superó 3.1 veces la cantidad inicial, después de 7 días de cultivo. Las mayores concentraciones de GSH medidas en los cultivos expuestos a estas altas concentraciones del metal (15 y 30 mg/L) sobrepasaron en 2.9 y 2.8 veces respectivamente la cantidad presente en el control. Por tanto, los niveles de GSH en las células expuestas a 15 y 30 mg Cd/L excedieron considerablemente la cantidad medida en el control (figura 20a).

Sin embargo, el aminoácido cisteína sobrepasó, en todos los cultivos expuestos a cadmio, las concentraciones alcanzadas en el cultivo control, siendo la cantidad alcanzada por este aminoácido mayor cuanto mayor es la cantidad de metal a la que se expusieron las células. En los cultivos expuestos a 3 mg Cd/L, la concentración de este aminoácido empezó a incrementarse el cuarto día de cultivo, alcanzando una cantidad de 316.38 ± 17.39 amol -SH/cél después de 7 días (figura 20b). En los cultivos expuestos a 7.9, 15 y 30 mg Cd/L la cantidad de cisteína aumentó sustancialmente respecto a la cantidad inicial y al control, excediendo, los días en que se alcanzaron las mayores concentraciones, 35.1, 74.7 y 86.1 veces respectivamente la cantidad medida el día 0 (figura 20: c, d y e). Las máximas concentraciones de GSH medidas en los cultivos expuestos a 15 y 30 mg Cd/L fueron 2915.02 ± 487.12 amol -SH/cél tras 6 días y 3359.54 ± 499.15 amol -SH/cél tras siete días respectivamente, estos valores superaron 30.1 y 38.2 veces las cantidades alcanzadas en el control en esos mismos días. La concentración de cisteína exhibió diferencias significativas comparado con las concentraciones alcanzadas por γ -Glu-Cys y GSH en los cultivos expuestos a 7.9, 15 y 30 mg Cd/L ($p > 0.05$).

El γ -Glu-Cys fue el péptido que mostró menos variación en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Después del segundo día de cultivo, las células expuestas a 3 y 7.9 mg Cd/L permanecieron sin diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo la mayor concentración medida de este péptido 152.63 ± 45.01 amol -SH/cél, en los cultivos expuestos a 7.9 mg Cd/L. De la misma manera, la concentración de γ -Glu-Cys en los cultivos expuestos a 15 y 30 mg Cd/L se mantuvo sin apenas variaciones.

Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas

El análisis a lo largo del tiempo de la concentración de fitoquelatinas, mostró que tanto su concentración como su longitud (número de subunidades) dependían de la cantidad de cadmio añadida al medio (figura 21). En los cultivos control no se detectó la síntesis de fitoquelatinas con la técnica empleada.

En todos los cultivos se detectaron fitoquelatinas de 2 a 5 subunidades ((γ -EC)₂G a (γ -EC)₅G). En los cultivos expuestos a 7.9, 15 y 30 mg Cd/L también se detectaron pequeñas concentraciones de (γ -EC)₆G. Asimismo, se detectó una pequeña cantidad de (γ -EC)₇G al final del cultivo en las células expuestas a 7.9 mg Cd/L. La tasa de acumulación de (γ -EC)₃G fue significativamente superior ($p > 0.05$) a la de otros tipos de fitoquelatinas en los cultivos expuestos a 3, 15 y 30 mg Cd/L. En estos cultivos las mayores concentraciones de (γ -EC)₃G alcanzadas fueron 3859.60 ± 553.11 , 3123.71 ± 1210.354 y 3299.87 ± 438.17 amol -SH/cél respectivamente. Sin embargo, en los cultivos expuestos a 7.9 mg Cd/L la cantidad de (γ -EC)₄G sobrepasó 1.08 veces a la de (γ -EC)₃G el último día de cultivo, alcanzando una concentración de 4540.19 ± 1042.13 amol -SH/cél.

En la figura 21 se observa que la síntesis de fitoquelatinas mostró una evolución similar en los cultivos expuestos a 3 y 7.9 mg Cd/L (figura 21: a y b). Los niveles de los diferentes tipos de fitoquelatinas aumentaron progresivamente en ambos cultivos durante todo el tiempo de duración del ensayo, alcanzándose los valores más altos el último día. Sin embargo, en los cultivos expuestos a las concentraciones más altas del metal (15 y 30 mg Cd/L) la concentración de los diferentes tipos de fitoquelatinas aumentó progresivamente durante los primeros días, disminuyendo posteriormente (figura 21: c y d). Así, las células expuestas a 15 mg Cd/L mostraron un incremento en la cantidad de fitoquelatinas durante 4 días comenzando a disminuir progresivamente desde el quinto día; mientras que en los cultivos expuestos a 30 mg Cd/L, se observó que la disminución de fitoquelatinas ya comienza el cuarto día de cultivo. Esta

disminución en la cantidad de fitoquelatinas coincidió con un drástico incremento en la cantidad de GSH y sobretodo del aminoácido cisteína.

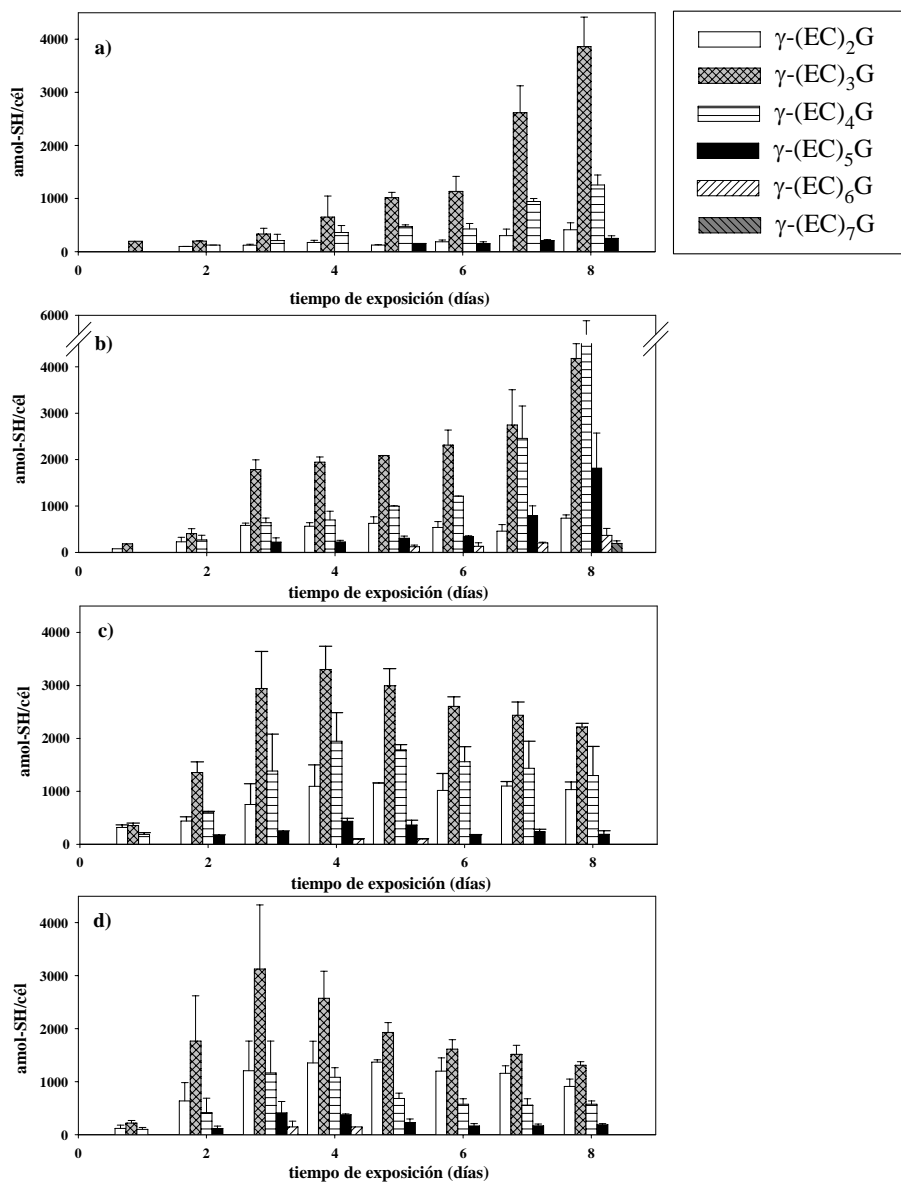


Figura 21. Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas \pm desviación típica.

Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas desgliciladas.

La técnica de electroforesis capilar usada para cuantificar y caracterizar los diferentes compuestos tiólicos presentes en las células también permitió la identificación y separación de las fitoquelatinas desgliciladas.

Este tipo de fitoquelatinas no fueron detectadas los dos primeros días de cultivo en las células expuestas a 3 y 7.9 mg Cd/L, mientras que en los cultivos expuestos a 30 mg Cd/L, estos péptidos aparecen ya el segundo día de cultivo. En las células expuestas a 15 mg Cd/L se detectaron fitoquelatinas desgliciladas desde el primer día de cultivo.

Estos péptidos mostraron un patrón de evolución a lo largo del tiempo similar al de las fitoquelatinas (figura 22). La concentración de las fitoquelatinas desgliciladas en los cultivos expuestos a 3 y 7.9 mg Cd/L aumentó gradualmente a lo largo del ensayo (figura 22 a y b). Sin embargo, en los cultivos expuestos a 15 y 30 mg Cd/L, los diferentes tipos de fitoquelatinas desgliciladas, después de aumentar los primeros días de cultivo, disminuyeron posteriormente desde el cuarto y tercer día respectivamente (figura 22: c y d).

En todos los cultivos se detectaron fitoquelatinas desgliciladas de 2 a 5 subunidades ((γ -EC)₂ a (γ -EC)₅), detectándose además una pequeña cantidad de (γ -EC)₆ en los cultivos expuestos a 7.9 mg Cd/L. La concentración de (γ -EC)₃ excedió significativamente ($p > 0.05$) a los restantes tipos de fitoquelatinas desgliciladas en todas las concentraciones de cadmio ensayadas, siendo 1102.04 ± 369.16 , 1014.32 ± 13.80 , 939.44 ± 192.26 , 582.93 ± 179.35 amol -SH/cél la mayor cantidad de (γ -EC)₃ alcanzado en los cultivos tratados con 3, 7.9, 15 y 30 mg Cd/L respectivamente.

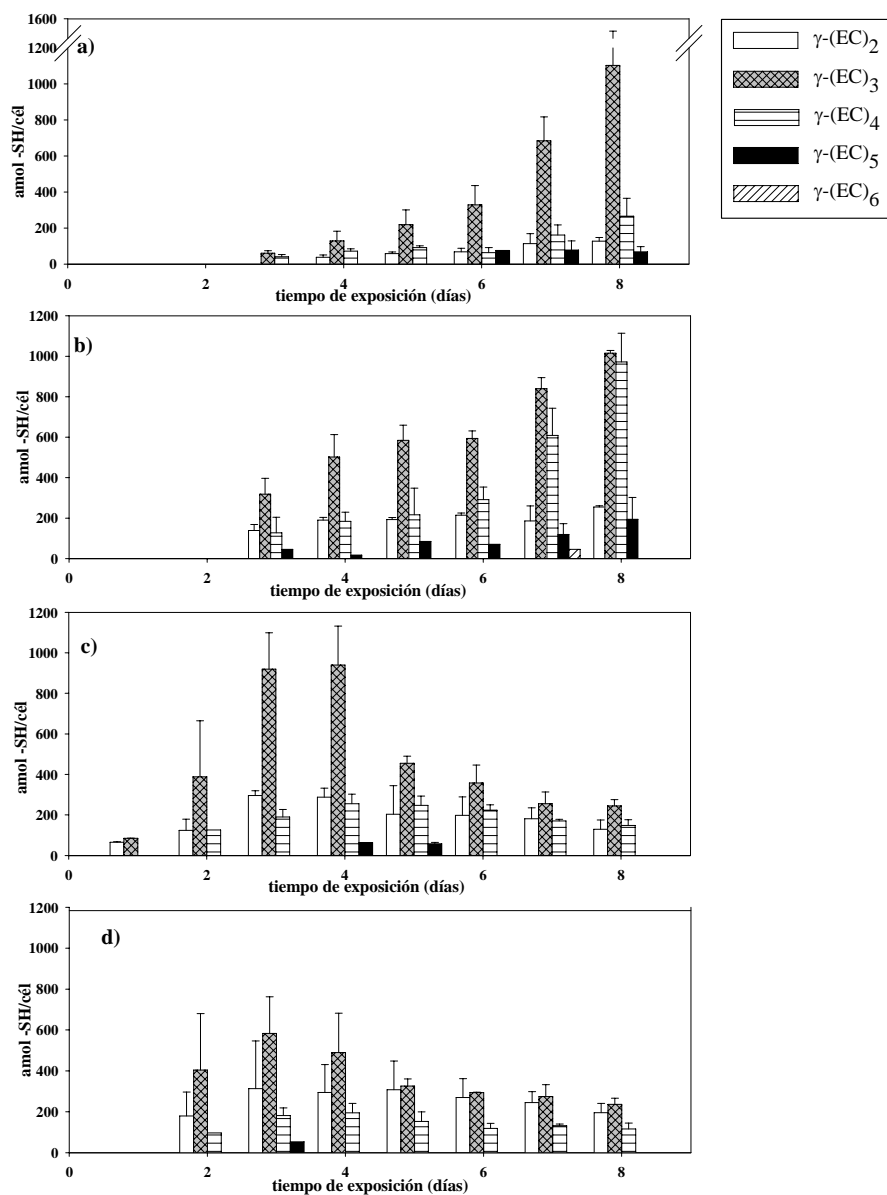


Figura 22. Producción a lo largo del tiempo de fitoquelatinas desgliciladas en las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio: a) 3 mg/L, b) 7.9 mg/L, c) 15 mg/L y d) 30 mg/L. Las barras representan las medias de tres réplicas \pm desviación típica.

Estabilidad de los compuestos tiólicos después de ser transferidos a un medio sin cadmio

Las células de *T. suecica* expuestas a 7.9 mg Cd/L durante siete días se transfirieron a un medio libre de metal. Las fitoquelatinas, las fitoquelatinas desgliciladas, el GSH, el γ -Glu-Cys, el aminoácido cisteína y el cadmio intracelular se monitorizaron durante las 10 horas siguientes a la transferencia. Se observó que las fitoquelatinas, las fitoquelatinas desgliciladas, y el aminoácido cisteína disminuyeron gradualmente a lo largo del tiempo (figura 23).

En lo que se refiere a las fitoquelatinas, esta reducción afectó a la concentración de las mismas pero no al número de subunidades, detectándose fitoquelatinas de 2 a 6 subunidades a lo largo de todo el ensayo (figura 23b). La reducción en la concentración afectó principalmente a los péptidos $(\gamma\text{-EC})_3\text{G}$ y $(\gamma\text{-EC})_4\text{G}$, que eran los tipos de fitoquelatinas más abundantes al principio del ensayo. Estos dos tipos de fitoquelatinas disminuyeron hasta alcanzar valores 3 y 2 veces, respectivamente, inferiores que al inicio del cultivo. Las fitoquelatinas con 5 y 6 subunidades, sufrieron una menor disminución alcanzando valores 1.4 y 1.3 veces menores respectivamente que al inicio del cultivo.

La disminución de las fitoquelatinas desgliciladas también afectó principalmente a los péptidos que presentaban 3 y 4 subunidades alcanzando valores 4.2 y 2.3 veces, respectivamente, inferiores que al inicio del cultivo (figura 23c).

La disminución en la concentración de fitoquelatinas y fitoquelatinas desgliciladas coincidió con un aumento en GSH y γ -Glu-Cys. Estos pequeños péptidos excedieron 1.6 y 2.1 veces respectivamente la concentración al inicio del ensayo; aunque la concentración de γ -Glu-Cys fue 2.6 veces menor que la de GSH (figura 23a).

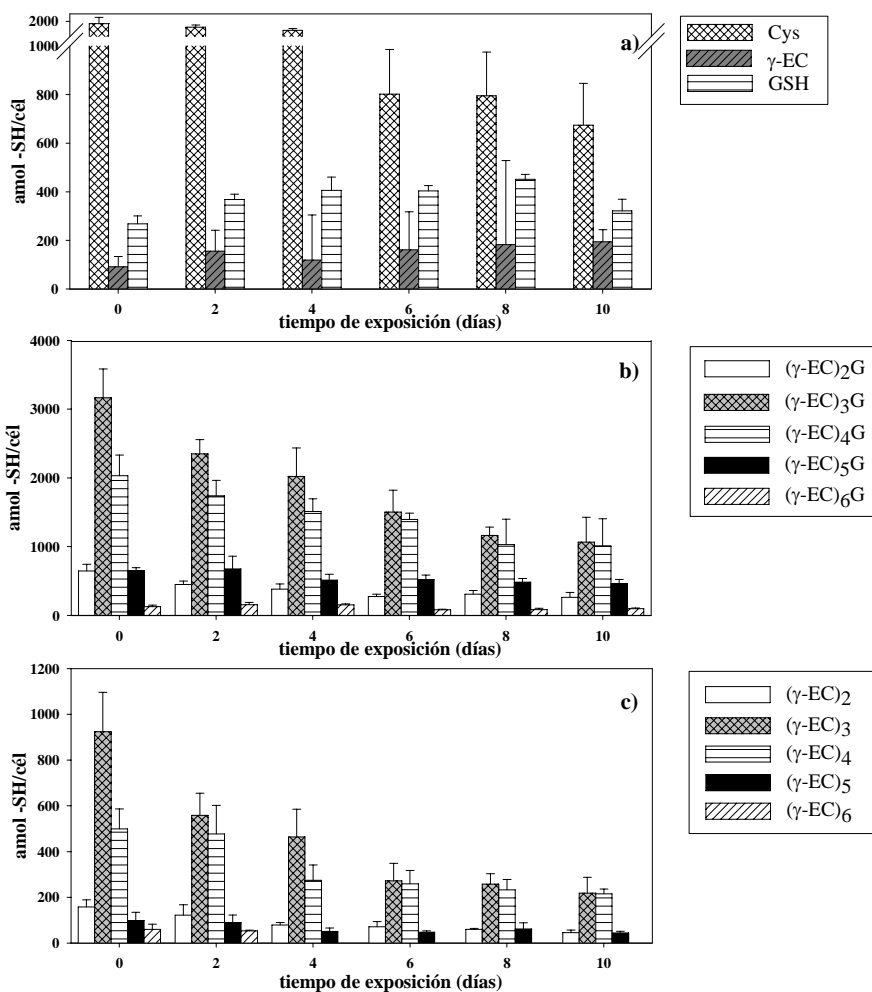


Figura 23. Evolución a lo largo del tiempo de los compuestos tiólicos después de transferir las células en un medio sin metal (las células fueron previamente expuestas a 7.9 mg Cd/L durante 7 días). a) evolución del aminoácido cisteína y de los precursores de las fitoquelatinas, GSH y γ -Glu-Cys (γ -EC), b) evolución de las fitoquelatinas y c) evolución de las fitoquelatinas desgliciladas. Las barras representan las medias de tres réplicas \pm desviación típica.

Por lo tanto, al transferir células expuestas a cadmio a un medio sin metal, se produce una disminución de compuestos tiólicos pero no del cadmio acumulado intracelularmente.

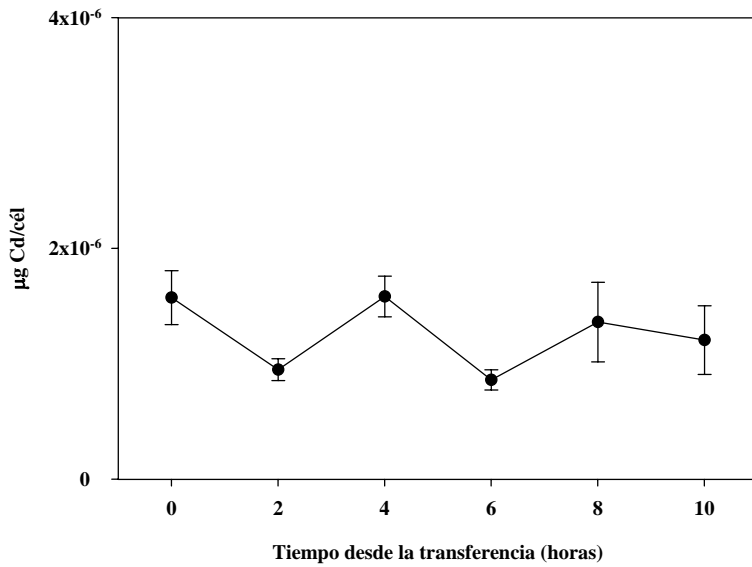


Figura 24. Evolución del cadmio intracelular después de transferir células de *Tetraselmis suecica* expuestas a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L a un medio sin metal.

Retirada de cadmio por la microalga *Tetraselmis suecica*

Dentro del rango de concentraciones de cadmio analizadas (0.6-45 mg/L), la retirada de este metal por las células de *T. suecica* dependió de la cantidad del metal en el medio. La mayor cantidad de metal retirado por célula, tuvo lugar en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L alcanzando una concentración de 16.05×10^{-6} $\mu\text{g Cd/cél}$ el quinto día de cultivo. En los cultivos con la concentración más baja ensayada (0.6 mg/L) se observa retirada de metal desde el primer día, siendo la máxima cantidad de cadmio retirada de 0.39×10^{-6} $\mu\text{g/cél}$ el tercer día de cultivo (figura 25). En los restantes cultivos expuestos a una concentración de 3, 6, 15 y 30 mg/L, la cantidad de cadmio retirada del medio fue de 1.76×10^{-6} , 3.49×10^{-6} , 6.78×10^{-6} , y 10.65×10^{-6} $\mu\text{g/cél}$ respectivamente.

Parte del cadmio total retirado por las células se acumula intracelularmente y otra parte es adsorbida sobre la superficie celular.

La cantidad de cadmio acumulado intracelularmente aumentó con la concentración del metal y con el tiempo de exposición (figura 25). Después de un período de rápido almacenamiento, la concentración de cadmio bioacumulado se estabilizó en los cultivos tratados con 0.6, 3 y 6 mg Cd/L, mientras que en los cultivos expuestos a las mayores concentraciones de cadmio (15, 30 y 45 mg/L) la concentración del metal intracelular aumentó durante los 6 días de cultivo. La máxima cantidad de cadmio intracelular fue detectada en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L después de 6 días de cultivo, alcanzando una concentración de 6.26×10^{-6} $\mu\text{g/cél}$. Así, en los cultivos expuestos a 0.6 mg Cd/L las células acumularon una cantidad de cadmio 28 veces inferior (0.21×10^{-6} $\mu\text{g/cél}$). En el resto de cultivos expuestos a las restantes concentraciones de cadmio, (3, 6, 15 y 30 mg/L), la máxima cantidad de metal almacenado por las células de *T. suecica* fue de 0.83×10^{-6} , 1.88×10^{-6} , 4.23×10^{-6} y 4.88×10^{-6} $\mu\text{g/cél}$ respectivamente.

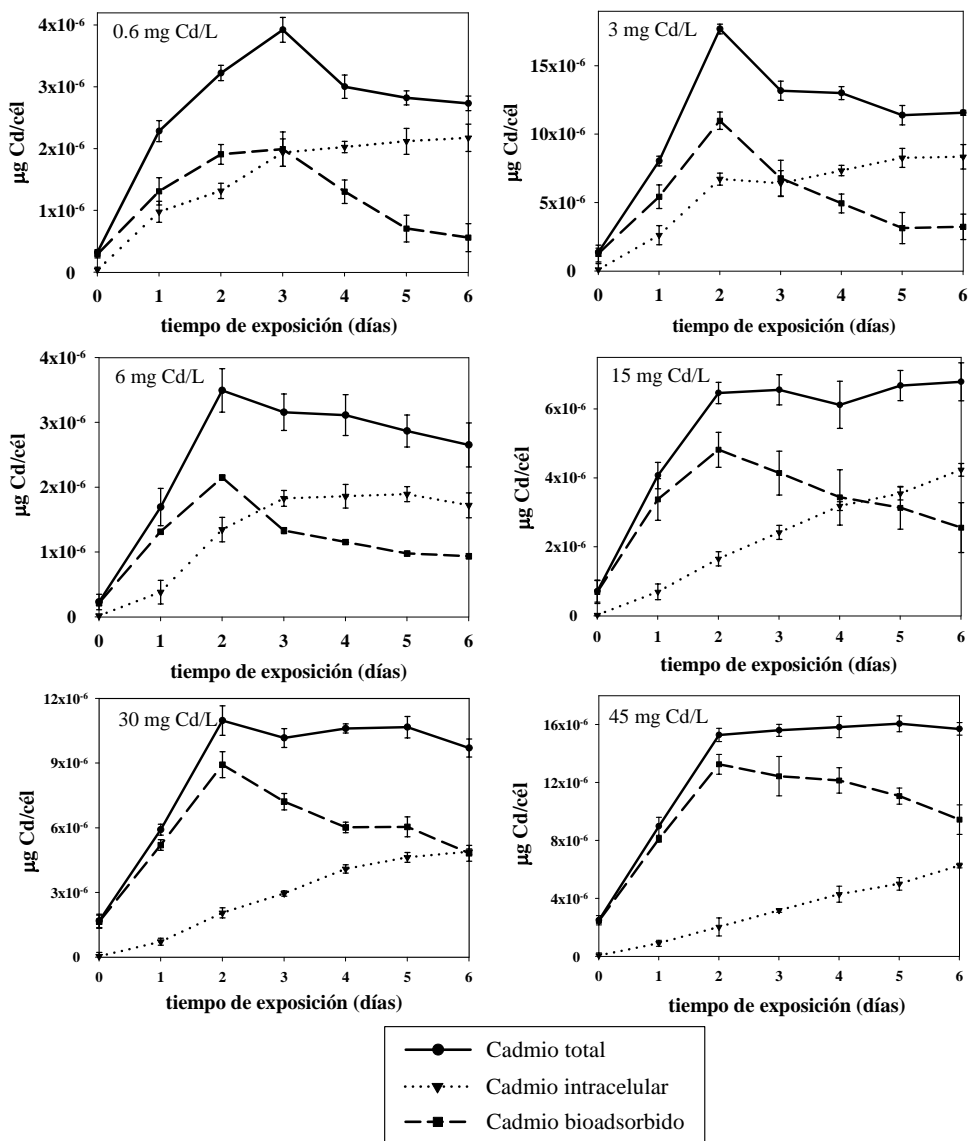


Figura 25. Evolución del cadmio extraído por las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L). Los resultados representan la media \pm desviación típica de tres réplicas.

Desde el momento en el que el cadmio se añade al medio, este metal aparece unido a la superficie celular. La cantidad de cadmio bioadsorbido aumentó en todos los cultivos durante los dos primeros días de tratamiento con el metal, disminuyendo

posteriormente. Como ocurre con el cadmio que se acumula intracelularmente, la cantidad del metal adsorbido a la superficie celular aumenta con la concentración de metal en el medio. Por tanto, es en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L donde se midió la mayor cantidad de cadmio adsorbido por las células, alcanzándose una concentración de 13.25×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{cél}$ el segundo día de cultivo que superó 66.6 veces la cantidad medida en los cultivos expuestos a 0.6 mg Cd/L. Estos cultivos expuestos a la concentración más baja del metal ensayada (0.6 mg Cd/L) presentaron una concentración máxima de 0.19×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{cél}$ después de tres días de cultivo. En el resto de los cultivos (3, 6, 15 y 30 mg/L) la máxima cantidad adsorbida por las células fue de 1.09×10^{-6} , 2.14×10^{-6} , 4.81×10^{-6} y 8.91×10^{-6} $\mu\text{g Cd}/\text{cél}$ respectivamente, después de dos días de cultivo.

Tabla 16. Porcentaje de cadmio extraído por las células de la microalga *Tetraselmis suecica* expuesta a diferentes concentraciones de cadmio (0.6-45 mg/L) en relación con la cantidad de cadmio inicial añadido al medio.

Concentración inicial de cadmio en el medio (mg/L)	Cadmio total extraído (%)	Cadmio intracelular (%)	Cadmio bioadsorbido (%)
Control	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.6	98.1 ± 3.0	79.6 ± 2.9	20.4 ± 1.1
3	78.2 ± 2.4	80.8 ± 2.5	19.2 ± 1.2
6	59.6 ± 1.1	64.8 ± 2.1	35.2 ± 1.4
15	17.8 ± 0.8	62.4 ± 2.3	37.6 ± 1.3
30	11.2 ± 0.1	50.4 ± 1.9	49.6 ± 1.8
45	7.7 ± 0.0	39.9 ± 1.3	60.1 ± 2.3

± desviación típica (n=3)

En la figura 25 se muestra la evolución del cadmio extraído por las células de *Tetraselmis suecica* en las diferentes concentraciones de cadmio ensayadas (0.6-45 mg/L). Se observa que la cantidad de cadmio acumulado intracelularmente superó al cadmio bioadsorbido, excepto en los cultivos tratados con la mayor cantidad de cadmio (45 mg Cd/L). A medida que aumenta la concentración de metal en el medio, más tiempo tarda la concentración de cadmio intracelular en sobrepasar a la cantidad

de cadmio adsorbido. Así, en los cultivos expuestos a 0.6, 3 y 6 mg Cd/L el cadmio bioadsorbido por las células excedió al cadmio intracelular hasta el tercer día de cultivo, después del cual, el cadmio bioadsorbido disminuyó alcanzando una concentración inferior a la cantidad de cadmio intracelular. En los cultivos con 15 mg Cd/L, la concentración de cadmio intracelular excedió a la cantidad de metal bioadsorbido entre el cuarto y el quinto día de cultivo y el último día de duración del ensayo en los cultivos expuestos a 30 mg Cd/L. Sin embargo, en las células expuestas a 45 mg Cd/L la concentración de cadmio bioadsorbido superó la concentración de metal intracelular durante todo el tiempo de duración del ensayo.

El porcentaje de cadmio extraído por las células al final del ensayo en relación al cadmio añadido al medio se muestra en la tabla 16. El porcentaje de cadmio retirado por las células decreció a medida que la cantidad de metal aumentaba en el medio. Sin embargo, la concentración de metal (mg/L) extraído del medio por las células es mayor en los cultivos expuestos a mayores concentraciones de cadmio (tabla 17). La máxima cantidad de metal fue extraído en los cultivos expuestos a 6 mg Cd/L con una concentración total de 3.57 ± 0.41 mg/L. En estos cultivos la mayor parte del cadmio se acumuló en el interior de las células alcanzándose una concentración de 2.31 ± 0.40 mg/L. En los cultivos con una concentración de 0.6 mg Cd /L, prácticamente todo el metal añadido al medio fue extraído por las células de la microalga, alcanzando un porcentaje del 98.1 % mientras que en los cultivos expuestos a la concentración más alta del metal (45 mg Cd/L) tan solo el 7.7 % del cadmio inicial fue retirada. Sin embargo, el 7.7 % representa una concentración total de 3.46 ± 0.23 mg/L; por lo tanto, en estos cultivos las células retiraron una cantidad 6 veces mayor que en los cultivos expuestos a 0.6 mg Cd/L.

La proporción de cadmio intracelular presente en las células de la microalga fue superior a la del cadmio adsorbido excepto en los cultivos expuestos a la concentración más alta del metal (45 mg Cd/L) (tabla 16). El porcentaje de cadmio intracelular disminuyó a medida que aumentaba la concentración del metal en el medio y se incrementaba el porcentaje de cadmio adsorbido a las células. Así, la cantidad

final de cadmio acumulada en el interior celular en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L fue de 1.38 ± 0.20 mg/L, mientras que en la superficie celular el cadmio alcanzó una concentración de 2.08 ± 0.40 mg/L (tabla 17).

Tabla 17. Cadmio retirado por las células de *Tetraselmis suecica* (mg/L) tratadas con diferentes concentraciones de cadmio después de seis días de cultivo. Los valores representan las medias \pm desviación típica de los datos obtenidos para 3 réplicas de las diferentes concentraciones de cadmio ensayadas.

Concentración inicial de cadmio en el medio (mg/L)	Cadmio total extraído (mg/L)	Cadmio intracelular (mg/L)	Cadmio bioadsorbido (mg/L)
Control	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.6	0.58 ± 0.01	0.46 ± 0.09	0.12 ± 0.01
3	2.30 ± 0.12	1.89 ± 0.40	0.45 ± 0.02
6	3.57 ± 0.41	2.31 ± 0.40	1.25 ± 0.11
15	2.67 ± 0.30	1.66 ± 0.38	1.00 ± 0.18
30	3.35 ± 0.12	1.68 ± 0.30	1.66 ± 0.37
45	3.46 ± 0.23	1.38 ± 0.20	2.08 ± 0.40

\pm desviación típica (n=3)

Relación cadmio intracelular – grupos tiol

La figura 26 muestra la relación entre el cadmio intracelular y los grupos tiol después de seis días de cultivo. Esta figura indica que la correlación entre el cadmio intracelular y el contenido de los grupos -SH fue altamente significativa ($R^2 = 0.996$, $p \leq 0.001$). La pendiente de la línea de regresión fue de 2.16, lo que indica que la relación entre los grupos tiol y el cadmio es 2, que es lo esperado en este tipo de interacción.

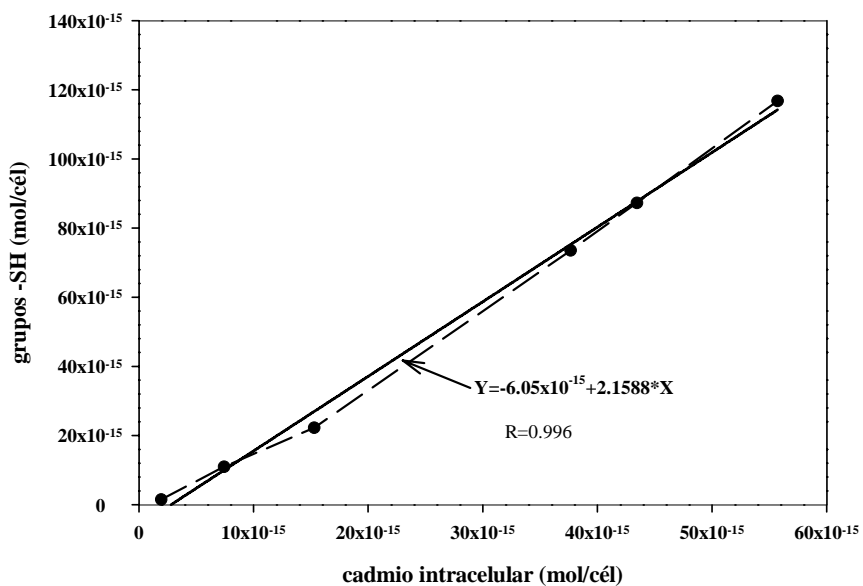


Figura 26. Relación de los grupos tiol y el cadmio intracelular en *Tetraselmis suecica* después de seis días de cultivo.

Discusión

El cadmio se encuentra a muy baja concentración en las superficies oceánicas, pero su creciente utilización en procesos industriales ha supuesto un considerable aumento en zonas cercanas a centros urbanos e industriales asociados a aguas residuales (Pinto *et al.*, 2003). El efecto tóxico de metales en el fitoplancton tiene especial relevancia debido a que estos organismos constituyen la base de la cadena alimentaria marina. Sus efectos tóxicos en organismos acuáticos han sido ampliamente estudiados (Kaplan *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1996). La base de la toxicidad del cadmio es su influencia negativa en los sistemas enzimáticos de las células debido a la sustitución de otros iones metálicos en metaloenzimas (principalmente Zn, Cu y Ca) y su fuerte afinidad por estructuras biológicas que contienen grupos –SH, como proteínas y enzimas dando como resultado la inhibición del crecimiento, la fotosíntesis, la tasa de respiración y otros procesos celulares (Vymazal, 1987).

Las pruebas de biotoxicidad son especialmente importantes para evaluar el potencial impacto de un contaminante en los sistemas acuáticos, con el objetivo de prevenir posibles daños en la biota, estableciendo los niveles máximos tolerables de los tóxicos. El uso de algas como organismos test es necesario para evaluar la toxicidad de una sustancia tóxica en los organismos fotosintéticos y en los ecosistemas. El uso de microalgas está bien documentado y estandarizado, la evaluación del crecimiento microalgal es el tipo de prueba más utilizado pues refleja el metabolismo de la célula (Organisation for Economic Cooperation and Development, 1998). Numerosos estudios han utilizado este tipo de prueba para evaluar el efecto del cadmio sobre diversas células microalgales (Wikfors y Ukeles, 1982; Poskuta, 1991; Guanzon *et al.*, 1994; Moreno-Garrido *et al.*, 2000; Mucha *et al.*, 2003), mostrando que el efecto de este metal sobre el crecimiento depende no solo de su concentración en el medio, sino también de la especie microalgal.

Hay numerosas formas de analizar los datos en una prueba de inhibición del crecimiento algal. El análisis de los datos de la curva dosis –respuesta es un problema de regresión lineal-curva que puede ser resuelto seleccionando un modelo matemático adecuado. El crecimiento de la población no solo depende del tamaño de la población,

sino también de factores limitantes como el espacio y alimento disponible. En términos generales, el crecimiento de una población microalgal en condiciones estáticas, se caracteriza por ajustarse a una función logística (Odum, 1971; Schanz y Zahler, 1981). El crecimiento logístico, se caracteriza por un rápido crecimiento, similar al crecimiento exponencial al inicio del cultivo que va disminuyendo cuando la población se aproxima a su capacidad de carga. La capacidad de carga es el tamaño máximo de población que un hábitat puede soportar.

Después de realizar una prueba de ajuste a una función logística de los datos de crecimiento obtenidos para todos los cultivos, se comprobó que las gráficas de los cultivos control, 0.6, 3 y 6 mg Cd/L se ajustaron a una función logística (tabla 7). Se observa que la capacidad de carga del medio (K) es un parámetro dependiente de la concentración de cadmio, experimentando una disminución a medida que aumenta la concentración de dicho metal.

El efecto inhibitorio del cadmio sobre el crecimiento microalgal ha sido descrito por numerosos autores. La exposición de la microalga marina *Olisthodiscus luteus* a 10, 50 y 500 μg Cd/L provocó una reducción en densidad celular respecto al control entre el 71 % y el 81 % tras 8 días de cultivo (Fernández-Leborans y Novillo, 1996). Los valores de la EC50 calculados para *Tetraselmis gracilis* fueron 3.2 y 1.8 mg Cd/L a las 48 y 96 horas respectivamente (Okamoto *et al.*, 1996). La EC50 para *Isochrysis galbana* tras 5 días de exposición a diversas concentraciones de cadmio fue de 0.74 mg/L (Yap *et al.*, 2004). La microalga marina *Tetraselmis suecica* ha mostrado una gran tolerancia al cadmio. El valor de la EC50 calculada para esta microalga, después de seis días de cultivo, fue de 7.9 mg Cd/L. Por lo tanto, *Tetraselmis suecica* puede ser incluida entre las especies más tolerantes a cadmio. Sin embargo, comparaciones directas de valores como la EC50 no son totalmente adecuadas debido a las diferencias en las condiciones de cultivo de las células que pueden variar en la iluminación, la temperatura y la composición del medio de cultivo. Todos ellos parámetros que pueden influir en la respuesta de las células.

La toxicidad del cadmio está claramente demostrada; sin embargo, este metal, que está considerado como nocivo para los organismos vivos provocó un efecto estimulante en los cultivos de *T. suecica* expuestos a 0.6 y 3 mg Cd/L. Este efecto, que se conoce como hormesis, se caracteriza por producir un efecto estimulante en pequeñas dosis de un determinado agente e inhibición con dosis altas del mismo agente. Este efecto se considera relativamente común, sin embargo está poco documentado. Esto puede ser debido al diseño de los estudios que buscan establecer las concentraciones tóxicas que suponen un riesgo. Así, pocos estudios o pruebas de toxicidad del cadmio muestran esta respuesta estimulante de este metal en microalgas. Uno de los pocos estudios de toxicidad de cadmio que mostraron un efecto de hormesis se llevó a cabo con *Selenastrum capricornutum*. Esta microalga mostró un efecto estimulante del crecimiento en las primeras horas de exposición a cadmio (Thompson y Couture, 1991). Una posible explicación a este fenómeno es aportada por Lane *et al.* (Lane y Morel, 2000; Lane *et al.*, 2005). Estos autores proporcionaron evidencias de una función biológica del Cd en la diatomea marina *Thalassiosira weissfloggi*. La adición de cadmio a cultivos limitados por el zinc provocó un aumento en la tasa de crecimiento. Estos autores observaron que esta microalga expresa una anhidrasa carbónica específica para Cd que sustituiría a la TWCA1 (“*Thalassiosira weissfloggi* carbonic anhydrase”), la anhidrasa carbónica intracelular más abundante y que necesita zinc para su funcionamiento.

La diferencia en sensibilidad de las distintas especies al cadmio puede ser debida a diferencias en los mecanismos de tolerancia que los organismos desarrollan frente a la toxicidad de este metal. Las microalgas han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia como adsorción de iones metálicos a componentes de la pared de la célula, excreción de compuestos orgánicos para formar complejos extracelulares con los iones metálicos y la producción de quelantes a nivel intracelular.

Uno de los mecanismos de tolerancia a metales es la unión del metal de forma inocua a ligandos intracelulares, como son las metalotioneínas de clase III. Las metalotioneínas de clase III son polipéptidos que quelan metales a través de la

coordinación con el grupo tiol de la cisteína y son considerados como un sistema general de detoxificación en muchos microorganismos. Actúan como ligandos intracelulares en levaduras, plantas superiores y algas eucariotas (Prasad, 1995; Zenk, 1996). Estas moléculas son responsables de la inmediata complejación e inactivación de los metales después de la entrada de estos en la célula, lo que impide la unión de los metales a las distintas dianas celulares evitando su acción tóxica. Se ha observado que la adición de metalotioneínas de clase III a un medio con metales disminuye la inhibición de enzimas como la nitrato reductasa, alcohol deshidrogenasa, etc. (Kneer y Zenk, 1992).

La forma más común de estos péptidos son las fitoquelatinas, que presentan la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (Knauer *et al.*, 1998; Rijstenbil y Gerringa, 2002; Tsuji *et al.*, 2003). Aunque las fitoquelatinas son las metalotioneínas de clase III más típicas, se conocen otras formas de metalotioneínas de clase III que se diferencian en su aminoácido terminal. Así, se conocen metalotioneínas de clase III que tienen como aminoácido terminal Glu (Meuwly *et al.*, 1993), Ser (Klapheck *et al.*, 1994) y $\beta\text{-Ala}$ (Gupta *et al.*, 2004) en lugar del común Gly. Asimismo, se han encontrado metalotioneínas de clase III sin aminoácido terminal denominadas fitoquelatinas desgluciladas (Maitani *et al.*, 1996).

Diversos metales han mostrado inducir la síntesis de fitoquelatinas, aunque la magnitud de la respuesta depende del metal particular y de la especie estudiada. Sin embargo, distintos estudios muestran que el cadmio es el mejor inductor de la síntesis de estos péptidos.

En macroalgas se documentó la aparición de fitoquelatinas debido a la exposición a diversos metales. *Enteromorpha prolifera* produjo polipéptidos con dos y tres subunidades de $\gamma\text{-Glu-Cys}$ al ser expuestas a cobre (Rijstenbil *et al.*, 1993). *Hydrilla verticillata* después de ser expuesta a plomo y cadmio también produjo fitoquelatinas de dos y tres subunidades de $\gamma\text{-Glu-Cys}$, aunque la cantidad de

fitoquelatinas producidas con cadmio fue mayor (Gupta *et al.*, 1995; Tripathi *et al.*, 1996).

También se ha comprobado en diferentes especies de microalgas, que las fitoquelatinas actúan como mecanismo de detoxificación; siendo sintetizadas después de la exposición de las células a diversos metales (Robinson, 1989; Ahner *et al.*, 1994; Ahner y Morel, 1995). Así, se observó en *Ditylum brightwelli* y *Thalassiosira pseudonana* la aparición de compuestos con grupos tiol después de la exposición de las células a varios metales (cadmio, cobre y zinc). Al igual que en macroalgas, en las microalgas se ha observado una mayor síntesis de fitoquelatinas en las células expuestas a cadmio (Rijstenbil *et al.*, 1994). Un ejemplo lo encontramos en los estudios realizados por Ahner y Morel (1995) que observaron que la concentración de fitoquelatinas en *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis maculata* y *Emiliania huxleyi* aumentó tras la exposición de las células a diferentes metales (Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Co, Ag y Hg) siendo el cadmio el mayor inductor de fitoquelatinas en las tres microalgas.

La función de las fitoquelatinas en la detoxificación queda de manifiesto en trabajos como los de Wikfors *et al.* (1991). Estos investigadores seleccionaron cepas de *Phaeodactylum tricorutum* con tolerancia a cadmio inducida en el laboratorio. Estas cepas crecieron en concentraciones de cadmio que eran extremadamente tóxicas para las cepas originales de *P. tricorutum*. Las cepas tolerantes produjeron una mayor concentración de fitoquelatinas. Otro ejemplo fue documentado por Kaplan *et al.* (1995) en la microalga *Chlorella sp.* Observaron que la cantidad de fitoquelatinas presentes en la cepa resistente, que presentaba una EC50 de 3.92 mg Cd/L, era mayor que en las cepas sensibles (EC50 de 0.336 mg Cd/L). Asimismo, Torres *et al.* (1995) encontraron que el 60 % del cadmio en *Phaeodactylum tricorutum* estaba unido a complejos tiólicos, formados principalmente por fitoquelatinas.

Por tanto, estos parecen indicar que las fitoquelatinas actúan como mecanismo de detoxificación para diversos metales, siendo el cadmio el mejor inductor de la síntesis de estas moléculas.

En las células de *Tetraselmis suecica* expuestas a cadmio se observó un considerable incremento en la cantidad de compuestos tiólicos, este incremento dependió de la concentración de cadmio (figura 9). Después de su purificación mediante cromatografía de exclusión molecular y análisis de aminoácidos, estos compuestos tiólicos fueron identificados como fitoquelatinas, la forma más típica de metalotioneínas de clase III. El análisis de las diferentes fracciones mostró que aproximadamente el 91.43 % del cadmio acumulado en el interior celular estaba unido a las fitoquelatinas. Así pues, estos polipéptidos estarían actuando como moléculas quelantes del cadmio, y por lo tanto, como un mecanismo de tolerancia a esta metal.

Para caracterizar las fitoquelatinas (nº de subunidades) sintetizadas por *T. suecica* en respuesta al cadmio, se llevó a cabo un análisis mediante electroforesis capilar de las fracciones purificadas. El método usado fue similar al descrito por Torres *et al.* para caracterizar fitoquelatinas en la microalga *Phaeodactylum tricornutum* (Torres *et al.*, 1997b). Esta técnica permitió detectar y determinar la longitud de las fitoquelatinas pero no otros componentes tiólicos como el aminoácido cisteína o el péptido γ -Glu-Cys. En las muestras purificadas a partir de cultivos microalgales de *T. suecica* expuestos durante siete días a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L, esta técnica permitió identificar fitoquelatinas de dos a seis subunidades de γ -Glu-Cys (figura 11).

El aislamiento y la selección de las cepas microalgales que sean más tolerantes a los efectos de los metales, como el cadmio, es importante puesto que estas microalgas pueden ser usadas en la retirada de metales de aguas contaminadas obteniendo una mayor eficacia. Conocer el mecanismo que contribuye a la tolerancia al metal puede ayudar a mejorar esta eficiencia en la retirada de metales.

Para entender con claridad el papel de las fitoquelatinas en el metabolismo y en la destoxicación de los metales, es necesario poder analizarlas de manera rápida y eficiente. La técnica clásica para el análisis de fitoquelatinas es mediante HPLC de fase reversa. La detección de los péptidos mediante la medida de la absorción a una

longitud de onda en la región del UV entre 200-220 nm proporciona un método universal de detección, pero se caracteriza por una marcada falta de selectividad.

Sin embargo, el marcaje de estas moléculas con un compuesto cromogénico o fluorogénico proporciona una mejor selectividad en el proceso de detección. En el caso de las fitoquelatinas, la derivatización con monobromobimane (mBrB) previa separación con HPLC (Doring *et al.*, 2000; Cazale y Clemens, 2001; Maier *et al.*, 2003) o derivatización post-columna con el reactivo de Ellman (Maita y Kawaguchi, 1989; Sneller *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001), proporciona la selectividad deseada para el análisis de estas moléculas. Estos reactivos se unen específicamente con los grupos tiol lo que permite su detección a una longitud de onda específica o por medio de fluorescencia.

La derivatización con mBrB y posterior análisis mediante HPLC fue usado en los primeros trabajos de caracterización de las fitoquelatinas y todavía está en uso para la detección y cuantificación de estos compuestos (Newton *et al.*, 1981; Kosower y Kosower, 1995; Fukushima *et al.*, 2003).

La electroforesis capilar en zona (CZE) es la técnica de electroseparación más frecuentemente usada para el análisis cuantitativo y cualitativo de los péptidos (Hearn, 2001; Righetti, 2001; Kasicka, 2003). La CZE ofrece varias ventajas frente al HPLC, incluyendo instrumentalización simple, requiere el uso de pequeñas cantidades de reactivos, la posibilidad de procesar volúmenes muy pequeños de muestra, y tiempos de análisis cortos. Por esta razón, esta técnica es una alternativa útil para el análisis de péptidos que contienen grupos tiol.

El primer trabajo que describe el análisis de fitoquelatinas mediante CZE fue publicado por Torres *et al.* (1997a). En este trabajo los péptidos tóxicos eran purificados mediante cromatografía de exclusión molecular y su identificación se realizó mediante CZE midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 200 nm. Como se describe en la sección Material y Métodos, se utilizó esta misma técnica para

separar e identificar las fitoquelatinas en la microalga *Tetraselmis suecica*. Sin embargo, esta técnica no permitió detectar otros compuestos tiólicos como la cisteína, el γ -Glu-Cys o las fitoquelatinas desgliciladas. Asimismo, el paso de purificación previa, supone un considerable alargamiento del tiempo de análisis.

Mounicou *et al.* (2001) desarrollaron una técnica alternativa para la determinación de fitoquelatinas mediante electroforesis capilar sin derivatización previa y sin necesidad de purificaciones. En el trabajo de estos autores, la electroforesis capilar estaba acoplada con un espectrofotómetro de masas, lo cual permitió la caracterización estructural de estas moléculas. Sin embargo, para este tipo de análisis es necesario un equipo de un elevado coste.

Sin embargo, varios trabajos describen la derivatización de los compuestos tiólicos en los que se utilizaron diferentes reactivos específicos siendo a continuación separados mediante CZE, sin pasos previos de purificación. Sutter *et al.* (1999) utilizó la derivatización en línea con N-etilmaleimida de los péptidos tiólicos, el método sirvió para la determinación simultánea de fitoquelatinas y sus moléculas precursoras mediante CZE, aumentando la sensibilidad comparada con tioles sin derivatizar. Para desarrollar el método analítico utilizaron patrones, pero una vez el método fue aplicado a muestras biológicas las diferencias entre estas muestras y los electroferogramas de los patrones fue considerable pues los picos de las fitoquelatinas en las muestras biológicas eran más anchos y los tiempos de migración aumentaban. Con este procedimiento tampoco se detectaron las fitoquelatinas desgliciladas. Kubota *et al.* (1998) usó el 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole para marcar las fitoquelatinas antes de la separación de estas moléculas por CZE. Con este método las fitoquelatinas desgliciladas son detectadas y el tiempo de análisis fue corto. Sin embargo, el 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole se considera un reactivo poco específico para marcar los grupos tiol.

El mBrB es uno de los compuestos más usados para marcar las fitoquelatinas y otros compuestos tiólicos debido a su especificidad (Sneller *et al.*, 2000), sin embargo

hasta la fecha no hay trabajos publicados que reflejen la separación mediante CZE del complejo mBrB-péptidos tiólicos, siendo llevada a cabo esta separación mediante HPLC. Debido a la especificidad del mBrB con los grupos tiol y la alta selectividad y eficiencia que se puede obtener con la electroforesis capilar, estos dos elementos se pueden combinar para desarrollar un procedimiento que permita un análisis rápido y adecuado de los compuestos tiólicos.

El método presentado en este trabajo permite la separación mediante CZE, a partir de extractos brutos de una microalga marina de fitoquelatinas y otros péptidos tiólicos derivatizados con monobromobimane. Este método es una buena alternativa a los métodos descritos anteriormente.

Para optimizar un procedimiento o método de electroforesis capilar se deben tener en cuenta factores como las propiedades físico-químicas del electrolito, el potencial eléctrico, la temperatura del capilar, la longitud y diámetro del capilar, la matriz o forma de preparación de la muestra, etc. La modificación de los parámetros de la solución electrolítica es la forma más directa para la optimización de la separación (Ban *et al.*, 2001). Esta modificación puede ser llevada a cabo usando diferentes tipos de tampones (fosfato, borato, citrato...), modificando la fuerza iónica, añadiendo aditivos como solventes orgánicos o sales inorgánicas y modificando el pH.

La carga y el tamaño de los péptidos juegan un papel esencial en la determinación de la electromovilidad de los péptidos. El pH es el factor selectivo más importante en las separaciones electroforéticas de anfolitos, como los péptidos, debido a que la carga neta de los iones es dependiente del pH. En tampones de pH bajo la diferencia de electromovilidad entre péptidos vendrá determinado por el número total de residuos básicos protonados en la cadena. La carga de los péptidos cambia fácilmente alterando el pH del electrolito de separación.

Publicaciones previas han demostrado las ventajas del uso de un electrolito ácido. Un pH ácido suprime la disociación de los grupos silanol de la superficie capilar

y permite la separación de péptidos con una interacción mínima con la pared (Oda y Landers, 1994). Además, se obtiene un flujo electroosmótico muy pequeño incrementando la resolución para los péptidos catiónicos, a cambio, los tiempos de análisis son más largos al permanecer más tiempo los analitos en el interior del capilar.

Para obtener soluciones electrolíticas de bajo pH se usan frecuentemente tampones constituidos por fosfato o citrato, sin embargo con el fosfato se obtienen mejores resultados en la separación de péptidos, siendo utilizados valores de pH muy bajos. Encontramos diversos ejemplos en los trabajos presentados por Ban *et al.* (2001), Sutter *et al.* (1999) o Torres *et al.* (1997a). Torres *et al.* (1997a) describieron la separación mediante CZE de fitoquelatinas en un extracto bruto de microalgas marinas usando como electrolito tampón fosfato 150 mM a pH 3.5, sin embargo otros péptidos tiólicos como la cisteína o las fitoquelatinas desgliciladas no fueron detectados con dicho procedimiento. Ban *et al.* (2001) estudiaron las condiciones óptimas para separar una mezcla de cuatro neuropéptidos usando diferentes concentraciones de citrato y fosfato a pH 2 como solución electrolítica; con sodio fosfato 100 mM obtuvieron una sensibilidad 5 veces mayor que con citrato 100 mM. En un trabajo posterior, Yang *et al.* (2003) usaron diferentes concentraciones y pHs de tampón fosfato para separar péptidos sintéticos estructuralmente similares; los péptidos ensayados se separaron con tampón fosfato 25 mM pH 2.

Como se observa en la figura 12, las pequeñas variaciones de pH ensayadas (1.50 - 1.75) en un electrolito formado por ácido fosfórico 150 mM tuvieron una influencia drástica en la resolución de los componentes de la muestra. Con un pH de 1.60 se consiguió separar las fitoquelatinas de sus respectivas fitoquelatinas desgliciladas en una muestra biológica derivatizada con mBrB. Asimismo, con un pH de 1.60 se consiguió una adecuada selectividad del GSH, γ -Glu-Cys y del aminoácido cisteína.

En las técnicas de electroforesis capilar, la concentración del electrolito debe ser ajustada para afinar la resolución de los picos del electroferograma. La alta conductividad (calor Joule) producida por electrolitos de elevada concentración puede

sobrepasar la capacidad termorreguladora del capilar del sistema, lo que produce efectos no deseables en la resolución y estabilidad del analito. Las concentraciones superiores a 150 mM de tampón fosfato (170 y 200 mM) produjeron peores resultados en la resolución de los componentes de la muestra. Este efecto se debe a que el denominado “calor Joule” no se disipó eficientemente lo que provocó un incremento en la conductividad y en el flujo electroosmótico. El uso de electrolitos de elevada fuerza iónica requiere un adecuado control de la temperatura del capilar o el uso de un bajo potencial eléctrico lo que supondría un aumento del tiempo de análisis. Concentraciones inferiores de 150 mM del tampón fosfato produjeron tiempos de análisis más cortos, pero se obtuvo una deficiente resolución con picos demasiado anchos y tiores importantes comigraban como un solo pico.

Una vez que se establecieron el pH y la concentración del electrolito, se ensayaron diferentes modificadores orgánicos con el objeto de mejorar el tiempo de análisis y la resolución. La adición de modificadores al electrolito tiene diferentes efectos dependiendo de la naturaleza del aditivo. Estos cosolventes pueden mejorar la solubilidad del electrolito, la sensibilidad del detector, la resolución (eficiencia y selectividad) y pueden ayudar a controlar el flujo electroosmótico. En general, el efecto de los solventes orgánicos en la movilidad electroforética es difícil de predecir. En este trabajo solo uno de los solventes ensayados, el metanol al 2.5 % (v/v), mejoró las características del método (figura 14, tabla 14). Con este solvente, la diferencia en movilidad (selectividad) de los péptidos marcados con mBrB aumentó y por lo tanto mejoró la resolución.

Por lo tanto, una disolución compuesta por tampón fosfato 150 mM pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v) fue seleccionado como el electrolito óptimo para el análisis.

Una de las estrategias más simples usada para disminuir el tiempo de análisis sin modificar la longitud del capilar es aumentar el voltaje, puesto que voltajes más altos dan tiempos de análisis más cortos y picos más estrechos. Sin embargo, la fuerza iónica del electrolito restringe el voltaje máximo que puede ser utilizado, pues el

voltaje no debe ser tan alto que el calor producido en el capilar no pueda ser eficientemente disipado (Oda y Landers, 1994). Por esta razón, la ley de Ohm fue usada para la determinación del máximo voltaje que puede ser utilizado con el electrolito optimizado (tampón fosfato 150 mM pH 1.60 y metanol al 2.5 % (v/v)). De la gráfica conductividad vs. voltaje (figura 15) se deduce que el máximo voltaje aplicable para una adecuada disipación del calor fue de 13 kV.

Otro de los puntos críticos en un análisis cuantitativo es la inyección de la muestra. Seleccionar el volumen adecuado para inyectar en un equipo de electroforesis capilar es difícil puesto que volúmenes pequeños de muestra da como resultado picos con una alta eficiencia (un alto número de platos teóricos) pero produce pequeñas señales en el detector. El volumen de muestra que debe ser inyectado es una solución de compromiso entre la eficiencia y la sensibilidad (Baker, 1995). Para una máxima eficiencia del método desarrollado, el volumen más pequeño que permitió medir cantidades detectables de los solutos fue inyectado durante 17 segundos a una presión de 50 mbar.

Otro factor a tener en cuenta en la separación de los componentes de una muestra mediante CZE es el procesado de la misma. Aunque la muestra constituye una porción muy pequeña del volumen total en el capilar una vez inyectada, la matriz de la muestra tiene profundos efectos en la separación mediante CZE (Sutter *et al.*, 1999; Ban *et al.*, 2001; Krivánková *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la composición de la muestra influyó tanto en la resolución como en el tiempo de migración. Para obtener una adecuada resolución y sensibilidad mediante electroforesis capilar con el electrolito perfeccionado fueron ensayados diferentes tampones de extracción y de derivatización con mBrB de los compuestos tiólicos de la muestra.

La extracción ácida de los compuestos tiólicos es necesaria para evitar la oxidación de los grupos -SH y conseguir la precipitación de las proteínas y otras moléculas indeseables que pudieran interferir en la reacción de derivatización y en el

análisis mediante CZE. La extracción de tioles no proteicos (fitoquelatinas, fitoquelatinas desgliciladas, glutatión, cisteína...) es llevada a cabo con diferentes ácidos como: tricloroacético, sulfosalicílico, trifluoroacético y clorhídrico. Las algas y los tejidos de plantas son generalmente homogeneizados en ácido sulfosalicílico 0.2 M o HCl 0.1 M para la extracción de fitoquelatinas (Mehra *et al.*, 1996; Tripathi *et al.*, 1996; Rijstenbil y Gerringa, 2002; Pawlik-Skowronska, 2003). Se analizó el efecto de estos ácidos en el análisis mediante CZE. Los resultados mostraron que la homogeneización de la muestra microalgal con el ácido sulfosalicílico afectó negativamente a la separación de los compuestos tiólicos mediante CZE (figura 16) por lo que el HCl fue elegido como el ácido adecuado para la extracción.

Después de la extracción se llevó a cabo el marcaje de los compuestos tiólicos con mBrB. La reacción del monobromobimane con los grupos tiol es dependiente del pH, siendo necesario un tampón alcalino para obtener una adecuada derivatización (Kosower y Kosower, 1995). En estas condiciones alcalinas, es necesario añadir un agente reductor para evitar la oxidación de los grupos -SH. El NaBH₄ es el agente reductor más común usado en el análisis de fitoquelatinas, aunque el 2-mercaptoetanol también es usado en algunos trabajos (Pistocchi *et al.*, 2000). Sin embargo, como se observa en la figura 17, el 2-mercaptoetanol interfirió claramente en el análisis, disminuyendo la sensibilidad del mismo. Esto es debido a que la mayoría del mBrB se unió al grupo -SH del 2-mercaptoetanol, impidiendo la derivatización de los compuestos tiólicos presentes en la muestra. Para evitar este problema es necesario añadir una mayor concentración de mBrB o una menor concentración de 2-mercaptoetanol. Esto implica una innecesaria pérdida de reactivo o un alto riesgo de oxidación de los tioles. Por otra parte, los ensayos con NaBH₄ no produjeron este problema de pérdida de sensibilidad, por lo que fue seleccionado como el más adecuado agente reductor a una concentración de 1.5 mg/L, ya que con ella se obtuvo una mejor eficiencia en la derivatización sin oxidación de los compuestos tiólicos.

Uno de los inconvenientes de la electroforesis capilar es el volumen de muestra introducido en el capilar. La introducción de volúmenes de muestra mayores del 5 %

del total del volumen del capilar puede disminuir la resolución. Esto limitaría el uso de la CZE a muestras que tienen altas concentraciones del analito de interés. Es por esto que se han desarrollado métodos de concentración de la muestra en el interior del capilar. Uno de los métodos más simples para la preconcentración de la muestra es inducir el denominado “stacking” (acumulación) de los componentes de la muestra. Este efecto se consigue explotando las diferencias entre la fuerza iónica o el pH de la matriz de la muestra y la solución electrolítica. Cuando la matriz de la muestra tiene una fuerza iónica menor que la solución electrolítica, los componentes de la muestra se “acumulan” en la interfase o zona de conexión entre la muestra y el electrolito (Oda y Landers, 1994). El proceso de derivatización es generalmente parado mediante la adición de ácido metanosulfónico. En este trabajo este paso fue evitado, dejando la muestra en condiciones alcalinas. Este aspecto es importante, puesto que al usar un electrolito ácido y dejar la muestra en medio alcalino se produce un efecto de “stacking”. Este proceso permite un incremento de la sensibilidad y la resolución.

Con la técnica desarrollada se detectó una concentración de patrón de GSH de 2.5 μM . La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 390 nm, que es la longitud de onda en la cual el mBrB alcanza su máxima absorbancia, no siendo detectados otros componentes no tiólicos que no interesa medir y que pueden estar presentes en la muestra. La sensibilidad de esta técnica puede incrementarse en varios órdenes de magnitud con un equipo de electroforesis capilar equipado con un detector de fluorescencia puesto que el mBrB también es un compuesto fluorescente. Hart *et al.* (2002) desarrollaron un método capaz de detectar 1 fmol de GSH derivatizado con 5-bromometilfluoresceína (5-BMF) usando un equipo HPCE-LIF (fluorescencia inducida por láser). Mounicou *et al.* (2001) desarrollaron una técnica de espectrometría de masas permitiendo una mayor sensibilidad del proceso de detección de fitoquelatinas. Sin embargo, este tipo de detección precisa de un equipo con un elevado coste. El método descrito en este trabajo, que emplea un equipo de electroforesis capilar disponible comercialmente con un detector de fotodiodos, es una buena alternativa para analizar compuestos tiólicos en un procedimiento rápido, sensible y de bajo coste en extractos brutos de una muestra biológica.

La técnica desarrollada permitió separar e identificar en *T. suecica* otro tipo de metalotioneínas de clase III diferentes a las fitoquelatinas, las fitoquelatinas desgluciladas. Por tanto, en un mismo análisis se pueden identificar y cuantificar glutatión, γ -Glu-Cys, el aminoácido cisteína, fitoquelatinas y fitoquelatinas desgluciladas. Asimismo, con la técnica de electroforesis capilar desarrollada los volúmenes de biomasa necesarios para el análisis son considerablemente inferiores. Esto permitió el seguimiento de estos diferentes compuestos tiólicos en cultivos de la microalga *T. suecica* expuestos a diferentes concentraciones de cadmio durante varios días.

Los resultados obtenidos con *Tetraselmis suecica* mostraron que la síntesis de fitoquelatinas es un mecanismo de defensa efectiva en la respuesta a cadmio pero solo con concentraciones del metal por debajo de los valores de la EC50. En los cultivos de *T. suecica* expuestos a las mayores concentraciones de cadmio (15 y 30 mg Cd/L) se observó una disminución de los niveles de fitoquelatinas después de varios días de cultivo (figura 21), sin embargo, la concentración de grupos tiol no disminuyó. Aunque el crecimiento fue totalmente inhibido en los cultivos expuestos a la mayor concentración de cadmio ensayada (30 mg/L), el aumento del aminoácido cisteína fue considerable (y en menor proporción el GSH) alcanzando una concentración 86 veces mayor que el día 0 después de siete días de cultivo (figura 20). Asimismo, las células tratadas con 15 mg/L de cadmio también mostraron un sustancial incremento del aminoácido cisteína (74.7 veces mayor que el día 0) aunque el crecimiento es prácticamente nulo. A estas altas concentraciones, este aminoácido puede estar actuando como quelante para el cadmio debido a que la concentración del metal es tan alta que la síntesis de fitoquelatinas está restringida.

El papel de la cisteína en la destoxificación del metal fue estudiado en diversas plantas y algas. La exposición a cobalto del hiperacumulador *Crotalaria cobalticola* provocó un incremento en los niveles de citrato y cisteína, no observándose síntesis de fitoquelatinas (Oven *et al.*, 2002). La síntesis de cisteína en una cepa tolerante de *Scenedesmus acutus* aumentó con la concentración de cadmio ensayada, alcanzando

una concentración 5 veces mayor que la cepa salvaje en los cultivos con mayor concentración de cadmio (27 μM); también, se observó una disminución en la concentración de fitoquelatinas tanto en las cepas salvajes como en las tolerantes al aumentar la concentración de cadmio (Torricelli *et al.*, 2004). Ahner *et al.* (2002) observaron que el aminoácido cisteína aumentaba en varias microalgas con la concentración de cadmio, superando el nivel de GSH en las concentraciones más altas del metal ensayadas. Plantas transgénicas de *Arabidopsis* con los niveles de GSH alterados e incapaces de sintetizar fitoquelatinas aumentaron la concentración de cisteína 2 veces en respuesta a la exposición a cadmio (Xiang *et al.*, 2001). Por lo tanto, cuando la concentración de cadmio sobrepasa cierto valor (posiblemente el valor de EC50 para el crecimiento celular) el efecto tóxico del cadmio bloquea la síntesis de fitoquelatinas, siendo la cisteína el principal agente quelante. Sin embargo, la cisteína presenta una capacidad baja de quelación del metal; es debido a esto por lo que este aminoácido no evitaría la toxicidad con concentraciones altas de cadmio en el medio.

Por lo tanto, en los cultivos de *T. suecica* expuestos a 15 y 30 mg Cd/L, las altas concentraciones de cisteína no evitan la inhibición del crecimiento (figura 8). Los datos obtenidos indican que el cese en la síntesis de fitoquelatinas en los cultivos expuestos a las mayores concentraciones de cadmio es debido a la inhibición de la fitoquelatín sintasa, puesto que la síntesis de cisteína y GSH no se detiene y la concentración de estas dos moléculas aumenta considerablemente respecto al control. Una explicación de estos resultados se deduce de las características catalíticas de la fitoquelatín sintasa (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Esta enzima requiere GSH libre (no unido a metal) para la reacción catalítica. En los cultivos con las mayores concentraciones de cadmio, la unión de este metal a los grupos -SH disponibles, bloquea todo el GSH. Esto lleva a un incremento en la síntesis de GSH para compensar el que está bloqueado por la unión del metal, pero esta síntesis es insuficiente para generar GSH libre, y por lo tanto, no hay síntesis de fitoquelatinas. Esto provoca que el cadmio permanezca libre y produzca un efecto tóxico que inhibe el crecimiento.

Tetraselmis suecica mostró una disminución en la concentración de GSH el primer día de cultivo respecto al día 0 en todos los cultivos expuestos a cadmio. Esta misma respuesta se observó en la mayoría de algas y plantas (Hu *et al.*, 2001). De hecho, una respuesta general de las células de plantas es una simultánea desaparición de GSH y la aparición de fitoquelatinas (Briat y Lebrun, 1999). Esta disminución de GSH se explica debido a la demanda de GSH por la fitoquelatín sintasa. Sin embargo, los niveles de glutatión en los cultivos expuestos a una concentración de cadmio inferior al valor de la EC50 se recuperaron con el tiempo de cultivo, alcanzando valores similares (o ligeramente mayores) a los del control (figura 20). Se deduce de estos resultados que la capacidad de síntesis de GSH es suficiente para compensar la pérdida debido a la síntesis de fitoquelatinas y el que ha sido bloqueado por la complejación de cadmio. Por lo tanto, se mantienen los niveles de GSH necesarios para otras funciones como la prevención de la oxidación (Pinto *et al.*, 2003), evitando la inhibición del crecimiento por el metal, aunque no totalmente, por lo que la tasa de crecimiento es inferior al control.

Es necesario enfatizar que, al contrario de lo que sucede con la síntesis de fitoquelatinas, la síntesis de cisteína es muy alta en los cultivos con una alta concentración de cadmio, indicando que las enzimas responsables de la síntesis de esta molécula están muy activas. Un ejemplo lo encontramos en *Arabidopsis thaliana*, en la que se observó una alta expresión de los genes de la enzima citosólica *O*-acetil-serina (tiol) liasa en plantas expuestas a cadmio (Dominguez-Solis *et al.*, 2001). Por lo tanto, en las células de *T. suecica*, a pesar de la alta concentración de cadmio en el medio de cultivo, el metabolismo del azufre (ruta de asimilación) no se detiene.

Se debe destacar que el nivel de γ -Glu-Cys permaneció sin cambios significativos en todos los cultivos, incluso en los cultivos con las concentraciones más elevadas del metal, en los que GSH y Cys presentaron un fuerte incremento (figura 20). Estos resultados parecen indicar que la actividad de la enzima γ -glutamilcisteina sintetasa no disminuyó debido a la acción del cadmio en las células de *T. suecica*. Este mismo efecto se observó en plantas de *Brassica juncea* en las que los niveles de

transcripción de este gen no disminuyeron significativamente tras la exposición de la planta a cadmio (Schafer *et al.*, 1997) Existe la posibilidad de que aunque el cadmio no induce mayor expresión del gen de esta enzima, la actividad de la enzima se incrementa por la acción del metal; sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que no ocurre de esta manera. Estos resultados confirman que la enzima γ -glutamilcisteín sintetasa es el paso limitante en la biosíntesis de GSH (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998) y por lo tanto en la síntesis de fitoquelatinas, puesto que como se observa en los datos, la síntesis de cisteína no es un paso limitante en la producción de GSH en condiciones de toxicidad por cadmio. Por lo tanto, tanto las fitoquelatinas como la cisteína son importantes componentes celulares implicados en mecanismos de tolerancia al cadmio, siendo su concentración regulada por la concentración de cadmio en el medio.

De acuerdo con todo lo expuesto, en la figura 27 se muestra una representación esquemática en la que se resume la interacción del cadmio con las diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de las fitoquelatinas en la microalga *Tetraselmis suecica*.

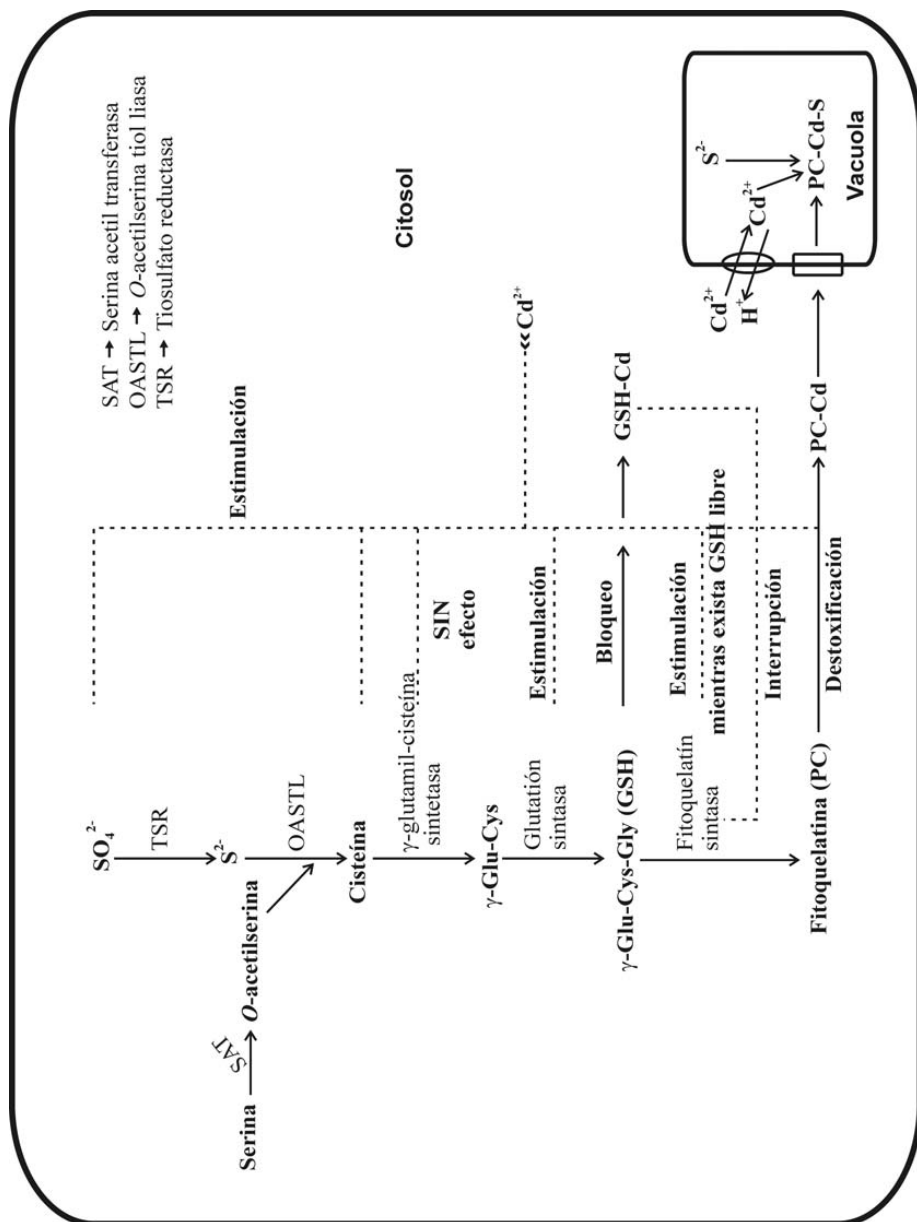


Figura 27. Representación esquemática de la interacción de la interacción del cadmio con las diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de fitoquelatinas.

La longitud de las fitoquelatinas es uno de los parámetros de mayor interés al considerar la capacidad de unión de metales de las fitoquelatinas. Kaplan *et al.* (1995) encontraron que las diferencias entre la cepa sensible (EC50 de 0.336 mg Cd/L) y la tolerante (EC50 de 3.92 mg Cd/L) de *Chlorella* sp. era un incremento en la concentración de fitoquelatinas y la aparición de fitoquelatinas de cadena más larga en las cepas tolerantes. Asimismo, en las células de la diatomea *P. tricornutum* se encontraron fitoquelatinas de 4 a 9 subunidades de γ -Glu-Cys, siendo (γ -Glu-Cys)₅-Gly el polipéptido más abundante. En esta diatomea la EC50 fue de 22 mg/L (Torres *et al.*, 1997b). Por lo tanto, las microalgas capaces de sintetizar fitoquelatinas con una mayor longitud de cadena son más tolerantes a metales debido a que las fitoquelatinas de cadena más larga son más eficientes en la unión de metales. En todos los cultivos de *T. suecica* se detectaron fitoquelatinas de 2 a 5 subunidades (figura 21). En los cultivos expuestos a las mayores concentraciones de cadmio (7.9, 15 y 30 mg Cd/L) también se detectaron pequeñas concentraciones de (γ -EC)₆G y en los cultivos de *T. suecica* expuestos a 7.9 mg Cd/L se detectaron fitoquelatinas de hasta 7 subunidades de γ -Glu-Cys. *Tetraselmis suecica* estaría entre las microalgas más tolerantes a cadmio (EC50 de 7.9 mg Cd/L) debido a que la síntesis de complejos de cadena larga (hasta 7 subunidades de γ -Glu-Cys) podría contribuir a una mayor tolerancia a cadmio debido a un secuestro más efectivo del metal. Por lo tanto, la tolerancia al cadmio puede ser debida, no solo, a un incremento en la concentración de las fitoquelatinas, sino también a la longitud de estos polipéptidos.

Una segunda familia de péptidos tiólicos fue caracterizada en *T. suecica*, las fitoquelatinas desgliciladas, con la estructura general de (γ -Glu-Cys)_n. Las fitoquelatinas desgliciladas fueron previamente descritas en levaduras (Mehra y Winge, 1988) y plantas (Meuwly *et al.*, 1995; Maitani *et al.*, 1996). Meuwly *et al.* (1995) describieron tres familias de péptidos tiólicos en maíz tratado con cadmio: (γ -Glu-Cys)_n, (γ -Glu-Cys)_nGly y (γ -Glu-Cys)_nGlu. Asimismo, plantas de *Rubia tinctorum* expuestas a diferentes metales sintetizaron (γ -Glu-Cys)_nGly y (γ -Glu-Cys)_n (Kubota *et al.*, 1995). Las fitoquelatinas desgliciladas aparecen tras la exposición a metales, por lo tanto, podrían estar actuando en la detoxificación de metales. Hoy en día existen

dudas sobre el origen biosintético de estas moléculas. Un posible origen podría ser un proceso de degradación de las fitoquelatinas debido a la acción de la carboxipeptidasa (Klapheck *et al.*, 1994). Sin embargo, los datos obtenidos en *T. suecica* indican un modelo de síntesis similar de las fitoquelatinas desgliciladas y las fitoquelatinas, aunque la concentración de los péptidos desglicilados es sustancialmente menor, lo que podría indicar que estos péptidos desglicilados serían una actividad residual de la fitoquelatina sintasa, que podría polimerizar subunidades de γ -Glu-Cys. Esto parece confirmarse por el hecho de que en los cultivos expuestos a 15 y 30 mg Cd/L al disminuir la actividad de la fitoquelatina sintasa y disminuir las fitoquelatinas, también las fitoquelatinas desgliciladas disminuyen siguiendo un modelo similar (figura 22).

En las células microalgales transferidas a un medio sin cadmio, tras su exposición a una concentración de cadmio de 7.9 mg/L (EC50), se produjo una rápida disminución de las fitoquelatinas (figura 23). La cantidad de cisteína también disminuyó pero el GSH y el γ -Glu-Cys aumentaron. En cultivos de *Thalassiosira weissflogii* y *Phaeodactylum tricornutum* previamente expuestos a cadmio y plomo respectivamente, también se observó una disminución en la concentración de fitoquelatinas al ser transferidos a un medio sin metal (Ahner y Morel, 1995; Morelli y Scarano, 2001). La disminución en los niveles de fitoquelatinas indica un proceso de excreción o degradación. Sin embargo, no se observó excreción de los metales durante el ensayo (10 h). Una vez formados los complejos fitoquelatinas-Cd, estos son secuestrados o acumulados en las vacuolas (Nassiri *et al.*, 1997a; Nassiri *et al.*, 1997b). Los datos obtenidos parecen indicar que una vez el metal está en la vacuola, las fitoquelatinas serían degradadas, disminuyendo su concentración debido a que la actividad de la fitoquelatín sintasa sería también menor, pero el metal permanecería en el interior de la vacuola.

La alta tolerancia de *T. suecica* a cadmio, así como su capacidad de retención de este metal en el interior celular sugieren la posibilidad de usar esta microalga en los procesos de biorremediación de agua de mar contaminada con cadmio.

Existen una gran variedad de procesos de tratamiento para aguas contaminadas por metales, la mayor parte de ellos involucrando procesos físico-químicos tales como oxidación y reducción, precipitación química, filtración, etc. La limitada relación coste-efectividad de estos procesos, la gran cantidad de reactivos necesarios y la impredecibilidad de la capacidad de retirada de iones metálicos son algunas de sus desventajas. Por otro lado, diversos reactivos contaminantes son usados en los procesos de separación de los metales del adsorbente dando como resultado un fango tóxico y una contaminación ambiental secundaria.

Los métodos biológicos han mostrado su efectividad en la retirada de metales, especialmente en rangos de concentraciones menores de 1 hasta 20 mg/L. El uso de métodos biológicos evitaría los efectos negativos que los procesos físico-químicos han mostrado. Este hecho ha llevado al estudio de diversos microorganismos, entre ellos las microalgas, como posibles extractores de metales. La elevada tolerancia a la toxicidad producida por los metales y su elevada capacidad de incorporación de los mismos hacen de las microalgas excelentes candidatas para el tratamiento de aguas contaminadas por metales (Cai *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios realizados con diferentes especies microalgales muestran que la eficacia en la retirada del metal depende no solo de la especie algal, si no que también depende del metal. Un estudio realizado con 8 especies algales para comparar su habilidad en la retirada de 5 metales tóxicos reveló que *Cyanidium caldarium* y *Scenedesmus quadricauda* retiraron más del 90 % de la concentración inicial de Cd^{+2} , mientras que *Mastigocladus laminosus* resultó la más eficaz en la retirada de Al^{+3} (>90 %). *Cyanidium caldarium* también fue la especie que presentó mayor acumulación de Hg^{+2} y Zn^{+2} . La concentración inicial de los diferentes metales ensayados fue de 1 mg/L (Radway *et al.*, 2001). Por lo tanto, la selección de una cepa adecuada puede incrementar potencialmente la retirada de un metal específico de aguas contaminadas.

La comparación de diferentes especies microalgales como posibles bioacumuladores de cadmio revela que *Tetraselmis suecica* tiene buenas propiedades para este propósito. Matsunaga *et al.* (1999) examinaron 22 cepas microalgales para

comprobar su habilidad en la retirada de cadmio, obteniendo los mejores resultados con *Chlorella* sp. NKG16014. Esta especie microalgal fue expuesta a una concentración de cadmio de 50 μM (5.62 mg/L), partiendo de una densidad celular de 5×10^7 cél/ml; después de dos semanas, el porcentaje de cadmio retirado del medio fue del 48.7 %. Sin embargo, *T. suecica* retiró el 59.6 % del cadmio, tras solo seis días de cultivo, de un medio que presentaba una concentración inicial de 6 mg/L y partiendo de una densidad de 25×10^4 cél/ml. En los cultivos expuestos a concentraciones de cadmio más bajas, el porcentaje de cadmio retirado por las células de *T. suecica* fue mayor (tabla 16).

La pared celular supone una primera barrera a la entrada del metal y juega un papel importante en la resistencia a toxicidad de metales (Macfie y Welbourn, 2000). Muchos estudios han demostrado la alta afinidad de metales por los componentes de la pared de las células algales. Esta estructura celular presenta en la superficie carbohidratos y proteínas con grupos carboxilo y sulfato a los que se puede unir el metal. Por lo tanto, la pared de la célula es el sitio inicial de acción de los metales. Basándose en este principio, el estudio y comparación de la capacidad de adsorción de diferentes tipos de biomasa microbiana muerta constituye una importante manera de identificar posibles biomateriales acumuladores de metales. La principal ventaja de este tipo de material biosorbente es la posible recuperación del metal extraído de la fase líquida y la posterior regeneración del biosorbente (Volesky, 2001). Klimmek *et al.* (2001) utilizaron biomasa liofilizada de 30 especies algales (la mayoría microalgas) para examinar su capacidad de retirada de Cd, Ni, Pb y Zn del medio (la concentración inicial de Cd, Ni y Zn fue de 100 mg/L y la de Pb fue de 400 mg/L). Las cianobacterias fueron las más eficientes en la retirada de los 4 metales, obteniendo los mejores resultados con biomasa liofilizada de *Lyngbya talorii* que retiró un 97 % de Pb, un 81 % de Cd, un 56 % de Ni y un 50 % de Zn. En comparación, *Dunaliella bioculata* retiró tan solo un 3 % de Pb, un 11 % de Cd, un 7 % de Ni y un 6 % de Zn. Estos porcentajes variaron considerablemente en función del alga y del metal. En nuestro estudio con *T. suecica* observamos que desde el momento de la adición de cadmio a los cultivos, este metal aparece unido a la superficie celular. Sin embargo, el

porcentaje de cadmio bioadsorbido solo supera el 50 % del total retirado en los cultivos expuestos a la mayor concentración de cadmio (45 mg/L).

La retirada de cadmio mediante incorporación a las células es primordialmente un proceso dependiente de energía. Diferentes publicaciones han mostrado que los mecanismos de exclusión y de adsorción a la superficie celular no son los principales mecanismos de tolerancia a cadmio. *Euglena gracilis* queló y acumuló la mayor cantidad de cadmio en el interior celular (Albergoni *et al.*, 1980). Asimismo, Carr *et al.* (1998) observaron que *Chlorella vulgaris* acumulaba la mayor proporción de cadmio intracelularmente. La toxicidad provocada por el cadmio en el metabolismo celular causa una reducción en la cantidad de cadmio acumulado intracelularmente por las células de *T. suecica*, aumentando el porcentaje de cadmio adsorbido a la superficie celular en los cultivos con la mayor concentración de metal, así, en los cultivos expuestos a 45 mg/L de cadmio, el 60.1 % del total de cadmio retirado estaba adsorbido a la superficie celular. Sin embargo, incluso en los cultivos expuestos a 45 mg Cd/L un alto porcentaje del metal estaba bioacumulado intracelularmente (39.9 %). Como se ha comentado previamente, el principal mecanismo de defensa de las células frente a la toxicidad del cadmio es la unión de este metal a los grupos –SH presentes en las fitoquelatinas. El aumento del cadmio intracelular mostró una clara relación con los grupos tiol puesto que el radio entre la cantidad de grupos –SH y el cadmio intracelular es prácticamente 2 en todas las concentraciones de cadmio ensayadas (figura 26). En nuestros ensayos, la concentración de grupos tiol aumentó cuando la concentración de cadmio aumentó en el medio, incluso en las mayores concentraciones de cadmio, la concentración de grupos tiol aumentó durante todo el tiempo de duración del ensayo (figura 9). Esto indica que incluso a estas altas concentraciones las células están vivas, por lo que aunque la toxicidad inhibe el crecimiento, las células siguen sintetizando compuestos tiólicos que permiten una cierta tolerancia de los efectos tóxicos del metal. En estas condiciones las células pueden continuar acumulando cadmio intracelularmente en todos los cultivos, incluso en aquellos expuestos a las mayores concentraciones de cadmio.

Por esta razón, la viabilidad de la biomasa o el estado fisiológico durante la exposición de metal es un parámetro importante a considerar. Diferentes estudios demuestran una considerable diferencia entre la cantidad de metal extraído por biomasa microalgal viva y biomasa muerta. La biomasa no-viva tiene la ventaja de que puede ser regenerada para usos múltiples, pero el metal no es incorporado en el interior celular, por lo que solo una pequeña parte de la capacidad de bioacumulación es explotada. Esto puede ser una desventaja debido a que diferentes publicaciones (Matsunaga *et al.*, 1999), así como nuestro trabajo con *Tetraselmis suecica* señalan que los niveles intracelulares de cadmio son más altos que los de cadmio bioadsorbido cuando la concentración del metal no es demasiado elevada. Estos datos indican que la biomasa viva de las células microalgales sería más efectiva para la retirada del cadmio que la biomasa no viva.

Otro factor importante a considerar es la cantidad de biomasa a utilizar en el proceso de retirada de metales. La cantidad de cadmio total e intracelular retirado por litro de medio en los cultivos expuestos durante seis días a 6 mg/L fue superior al resto de cultivos. Esta concentración está por debajo del valor de la EC50 por lo que, a pesar del efecto tóxico del cadmio aún se observó un crecimiento celular significativo permitiendo la retirada de mayor cantidad de metal por litro de cultivo. Cuanto mayor es la concentración de cadmio en el medio, mayor es la cantidad de metal retirado por célula, sin embargo, el porcentaje total de metal retirado del medio disminuye al disminuir la densidad celular. Por tanto, una solución para retirar más metal del medio sería incrementar la biomasa celular. Hamdy (2000) estudió el efecto del peso de la biomasa en la incorporación de diferentes metales, observando que la cantidad de cadmio retirado aumentó al incrementar la biomasa de *Laurencia obtusa*.

Por tanto, la elevada resistencia de *T. suecica* a cadmio debido a su capacidad de síntesis de fitoquelatinas que unen el metal de forma inocua, así como su habilidad de acumulación de altas concentraciones de cadmio y su capacidad de retención del metal en el interior celular, hacen de esta microalga una buena candidata para poder ser utilizada en los procesos de extracción de metales de aguas marinas contaminadas.

Conclusiones

1. El cadmio inhibe el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Este efecto es proporcional a la concentración de este metal, siendo su EC50 después de 6 días de exposición a cadmio de 7.9 mg Cd/L. Sin embargo, se debe destacar un efecto estimulante del cadmio cuando las células son expuestas a bajas concentraciones del mismo (0.6 y 3 mg Cd/L) en los primeros días de cultivo, este efecto se conoce como “hormesis”.

2. *Tetraselmis suecica* sintetiza compuestos que presentan grupos tiol como consecuencia de la exposición de las células al cadmio, uniéndose la mayor parte del metal intracelular a estos compuestos. Parte de estos compuestos se han identificado como fitoquelatinas actuando como mecanismo de protección de esta microalga frente a la toxicidad del cadmio.

3. La nueva técnica de electroforesis capilar desarrollada permite mejorar el análisis de compuestos tiólicos derivatizados con mBrB en muestras biológicas complejas. Las condiciones electroforéticas usadas para optimizar la separación fueron:

- Electrolito: 150 mM H₃PO₄ pH 1.60 y 2.5 % metanol (v/v).

- Condiciones de la electroforesis capilar: 13 kV, capilar de 30 cm de longitud efectiva (38 cm de longitud total) con 50 µm de diámetro interno x 375 µm de diámetro externo. La inyección se realizó mediante presión de 50 mbar ejercida durante 17 s. La detección se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 390 nm.

Las condiciones establecidas en este trabajo permiten un análisis rápido, reproducible y sensible de compuestos tiólicos (incluidas fitoquelatinas) en extractos brutos de muestras biológicas usando un detector UV.

4. La síntesis de fitoquelatinas es un mecanismo de defensa efectiva en la respuesta a cadmio pero solo con concentraciones del metal por debajo de los valores de la EC50. Cuando la concentración de cadmio sobrepasa este valor el efecto tóxico del cadmio bloquea la síntesis de fitoquelatinas, siendo el aminoácido cisteína el principal agente quelante. Sin embargo, la cisteína presenta una capacidad baja de quelación del metal por lo que este aminoácido no evitaría la toxicidad provocada por concentraciones altas de cadmio en el medio.

5. Una segunda familia de péptidos tiólicos se caracterizó en *Tetraselmis suecica*, las fitoquelatinas desgliciladas con la estructura general de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$. Al igual que las fitoquelatinas, las fitoquelatinas desgliciladas aparecen tras la exposición a cadmio, por lo tanto, también podrían estar actuando en la destoxificación de este metal.

6. Las células de *Tetraselmis suecica* son capaces de bioacumular y bioadsorber cadmio permitiendo su retirada del medio. Esta microalga ha mostrado una gran capacidad de extracción del cadmio, siendo esta extracción significativa desde el primer día. La gran resistencia de *Tetraselmis suecica* al cadmio debido a su capacidad de síntesis de fitoquelatinas que unen el metal de forma inocua, y su capacidad de acumulación de este metal, hacen de esta microalga una buena candidata para poder ser utilizada en los procesos de extracción de cadmio de aguas contaminadas.

Bibliografía

Ahner, B.A. y Morel, F.M.M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 658-665.

Ahner, B.A., Price, N.M. y Morel, F.M.M. (1994) Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8433-8436.

Ahner, B.A., Kong, S. y Morel, F.M.M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 649-657.

Ahner, B.A., Wei, L., Oleson, J.R. y Nori, O. (2002) Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **232**: 93-103.

Albergoni, V., Piccini, E. y Coppelotti, O. (1980) Response to heavy metals in organisms-I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metals in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **67C**: 121-127.

Al-Lahham, A., Rohde, V., Heim, P., Leuchter, R., Veeck, J., Wunderlich, C. *et al.* (1999) Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15**: 385-396.

Alloway, B.J. y Ayres, D.C. (1993) *Chemical principles of environmental pollution*. Oxford.: Chapman & Hall.

Azcue, J.M. (1993) Contaminación por efecto de la actividad humana. In *Metales en sistemas biológicos*. Barcelona: Promociones y Publicaciones Universitarias, pp. 275-296.

Bae, W., Chen, W., Mulchandani, A. y Mehra, R.K. (2000) Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 518-524.

Baker, D.R. (1995) *Capillary electrophoresis*. New York.: John Wiley & Sons, Inc.

Ban, E., Choi, O.K., Chung, W.Y., Park, C.S., Yoo, E.A., Chung, B.C. y Yoo, Y.S. (2001) Influence of buffer composition and sample pretreatment on efficiency separation for monitoring neuropeptides in plasma using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**: 2173-2178.

Barkholt, V. y Jensen, A.L. (1989) Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* **177**: 318-322.

Bold, H. y Wynne, M. (1985) *Introduction to the Algae*. New Jersey: Prentice-Hall.

Briat, J.F. y Lebrun, M. (1999) Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci III Sci. Vie* **322**: 43-54.

Brzówska, M.M. y Moniuszko-Jakoniuk, J. (2001) Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* **39**: 967-980.

Cai, X.H., Traina, S.J., Logan, T.J., Gustafson, T. y Sayre, R.T. (1995) Applications of eucaryotic algae for the removal of heavy metals from water. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **4**: 338-344.

Carr, H.P., Cariño, F.A., Yang, M.S. y Wong, M.H. (1998) Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 433-440.

Carrier, P., Baryla, A. y Havaux, M. (2003) Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* **216**: 939-950.

Cazale, A.C. y Clemens, S. (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* **507**: 215-219.

Clemens, S., Schroeder, J.I. y Degenkolb, T. (2001) *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3640-3643.

Cobbett, C. y Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **53**: 159-182.

Collins, R.N., Merrington, G., McLaughlin, M.J. y Morel, J.L. (2003) Organic Ligand and pH Effects on Isotopically Exchangeable Cadmium in Polluted Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **67**: 112-121.

Chen, J., Zhou, J. y Goldsbrough, P.B. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* **101**: 162-172.

Chrétiennot-Dinnet, M.J. (1990) *Atlas du phytoplankton marin*. Paris: Edition du CNRS.

Christensen, T. (1962) Alger. In *Systematisk Botanik*. Böcher, T.W., Lange, M. y Sorensen, T. (eds). Copenhagen.

De Filippis, L.F. y Ziegler, H. (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J. Plant Physiol.* **142**: 167-172.

Organisation for Economic Cooperation and Development, (1998) *Report of the OECD Workshop on Statical Analysis of Aquatic Toxicity Data, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment*. Paris: OECD.

Dominguez-Solis, J.R., Gutierrez-Alcala, G., Vega, J.M., Romero, L.C. y Gotor, C. (2001) The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* **276**: 9297-9302.

Doring, S., Korhammer, S., Oetken, M. y Markert, B. (2000) Analysis of phytochelatins in plant matrices by pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**: 316-318.

Ederli, L., Reale, L., Ferranti, F. y Pasqualini, S. (2004) Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol. Plant.* **121**: 66-74.

Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Veiga, M. (1984) Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* **42**: 207-215.

Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B. y Patiño, M. (1995) *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture* **143**: 197-204.

Fernández-Leborans, G. y Novillo, A. (1996) Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae). *Wat. Res.* **30**: 57-62.

Finney, D.J. (1964) *Probit Analysis*. London, U.K.: Cambridge Univ. Press.

Fisher, S.N. y Jones, G.J. (1981) Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulfhydryl binding. *J. Phycol.* **17**: 108-111.

Foster, P.L. y Morel, F.M.M. (1982) Reversal of cadmium toxicity in a diatom: an interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 745-752.

Francis, B.M. (1994) *Toxic substances in the environment*. New York: John Wiley & Sons.

Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P. y Petocz, P. (2002) Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. and Chemistry* **21**: 2412-2422.

Fukushima, T., Usui, N., Santa, T. y Imai, K. (2003) Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 1655-1687.

Garnham, G.W., Codd, G.A. y Gadd, G.M. (1992) Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 270-276.

Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L. y Zenk, M.H. (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* **150**: 197-202.

Grill, E., Winnacker, E.L. y Zenk, M.H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 574-576.

Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. y Zenk, M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6838-6842.

Guanzon, N.G., Nakahara, H. y Yoshida, Y. (1994) Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish. Sci.* **60**: 379-384.

Gupta, D.K., Tohoyama, H., Joho, M. y Inouhe, M. (2004) Changes in the levels of phytochelatins and related metal-binding peptides in chickpea seedlings exposed to arsenic and different heavy metal ions. *J. Plant Res.* **117**: 253-256.

Gupta, M., Rai, U.N., Tripathi, R.D. y Chandra, P. (1995) Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l. f.) Royle. *Chemosphere* **30**: 2011-2020.

Hamdy, A.A. (2000) Biosorption of heavy metals by marine algae. *Curr. Microbiol.* **41**: 232-238.

Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A. y Kochian, L.V. (2002) Measurement of thiol-containing amino acids and phytochelatin (PC2) via capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **23**: 81-87.

Hearn, M.T.W. (2001) Peptide analysis by rapid, orthogonal technologies with high separation selectivities and sensitivities. *Biologicals* **29**: 159-178.

Hill, M.K. (2004) *Understanding Environmental Pollution. A primer.* Cambridge: Cambridge University Press.

Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H. *et al.* (2001) Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 24-29.

Holan, Z.R. y Volesky, B. (1995) Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**: 133-146.

Hu, S. y Wu, M. (1998) Cadmium sequestration in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezzi*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **7**: 97-104.

Hu, S., Tang, C.H. y Wu, M. (1996) Cadmium accumulation by several seaweeds. *Sci. Tot. Env.* **187**: 65-71.

Hu, S., Lau, K.W.K. y Wu, M. (2001) Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **161**: 987-996.

Husaini, Y. y Rai, L.C. (1991) Studies on nitrogen and phosphorus metabolism and the photosynthetic transport system of *Nostoc linckia* under cadmium stress. *J. Plant Physiol.* **138**: 429-435.

Ilangovan, K., Salazar, M., Dash, S., Monroy, O.H. y Ramos, C.A. (1992) Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Environ. Technol.* **13**: 195-199.

Inouhe, M., Sumiyoshi, M., Tohoyama, H. y Joho, M. (1996) Resistance to cadmium ions and formation of a cadmium-binding complex in various wild-type yeasts. *Plant Cell Physiol.* **37**: 341-346.

Jackson, T.A., West, M.M. y Leppard, G.G. (1999) Accumulation of heavy metals by individually analyzed bacterial cells and associated nonliving material in polluted lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 3795-3801.

Jeanne, N., Dazy, A.C. y Moreau, A. (1993) Cadmium interactions with ATPase activity in the euryhaline alga *Dunaliella bioculata*. *Hydrobiol.* **252**: 245-256.

Kagi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger, P.D., Bethune, J.L. y Vallee, B.L. (1974) Equine Hepatic and renal metallothioneins. *J. Biol. Chem.* **249**: 3537-3542.

Kaplan, D. (2004) Water pollution and bioremediation by microalgae. Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Richmond, A. (ed). Iowa: Blackwell Science Ltd., pp. 439-447.

Kaplan, D., Heimer, Y.M., Abeliovich, A. y Goldsbrough, P.B. (1995) Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Sci.* **109**: 129-137.

Kasicka, V. (2003) Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **24**: 4013-4046.

Kennish, M.J. (1997) *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. Boca Raton: CRC Press.

Klaine, S.J. y Lewis, M.A. (1995a) Algal and plant toxicity testing. In *Handbook of ecotoxicology*. Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. y Cairns, J. (eds). Boca Raton: Lewis Publisher, p. 755.

Klaine, S.J. y Lewis, M.A. (1995b) Ecotoxicology of mercury and cadmium. In *Handbook of ecotoxicology*. Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. y Cairns, J. (eds). Boca Raton: Lewis Publisher, p. 755.

Klapheck, S., Fliegner, W. y Zimmer, I. (1994) Hydroxymethyl-phytochelatin (γ -Glutamylcysteine)_n-serine are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol.* **104**: 1325-1332.

Klapheck, S., Schlunz, S. y Bergmann, L. (1995) Synthesis of Phytochelatin and Homo-Phytochelatin in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* **107**: 515-521.

Klerks, P.L. y Bartholomew, P.R. (1991) Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* **19**: 97.

Klimmek, S., Stan, H.J., Wilke, A., Bunke, G. y Buchholz, R. (2001) Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 4283-4288.

Knauer, K., Ahner, B., Bin Xue, H. y Sigg, L. (1998) Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Env. Toxicol. Chem.* **17**: 2444-2452.

Kneer, R. y Zenk, M.H. (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metals poisoning. *Phytochemistry* **31**: 2663-2667.

Kosower, E.M. y Kosower, N.S. (1995) Bromobimane probes for thiols. *Method Enzymol.* **251**: 133-148.

Krivánková, L., Pantucková, P., Gebauer, P., Bocek, P., Caslavská, J. y Thormann, W. (2003) Chloride present in biological samples as a tool for enhancement of sensitivity in capillary zone electrophoretic analysis of anionic trace analytes. *Electrophoresis* **24**: 505-517.

Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. y Maitani, T. (1995) Phytochelatins (class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L. *Plant Sci.* **106**: 157-166.

Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. y Maitani, T. (1998) Separation of respective species of phytochelatins and their desglycyl peptides (class III metallothioneins) and the precursors glutathione and γ -glutamylcysteine with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **803**: 315-320.

Kwoh, Y.T., Okubo, A., Hirano, H., Kagawa, H., Yamazaki, S. y Toda, S. (1988) Primary structure of striped dolphin renal metallothionein. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 837.

Lane, T.W. y Morel, F.M.M. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4627-4631.

Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C. y Morel, F.M.M. (2005) A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**: 42-42.

Larison, J.R., Likens, G.E., Fitzpatrick, J.W. y Crock, J.G. (2000) Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature* **406**.

Macfie, S.M. y Welbourn, P.M. (2000) The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**: 413-419.

Maier, E.A., Matthews, R.D., McDowell, J.A., Walden, R.R. y Ahner, B.A. (2003) Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. *J. Environ. Qual.* **32**: 1356-1364.

Maita, Y. y Kawaguchi, S. (1989) Amino acid composition of cadmium-binding protein induced in a marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 394-401.

Maitani, T., Kubota, H., Sato, K. y Yamada, T. (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* **110**: 1145-1150.

Malik, A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* **30**: 261-278.

Mason, A.Z. y Jenkins, K.D. (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. A., T. y R., T.D. (eds). California: John Wiley & Sons Ltd., pp. 479-608.

Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. y Yamazawa, A. (1999) Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *J. Biotechnol.* **70**: 33-38.

May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M.V. y Inzé, D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* **49**: 649-667.

McLusky, D.S., Bryant, V. y Campbell, R. (1986) The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **24**: 481.

Mehra, R.K. y Winge, D.R. (1988) Cu (I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* g-glutamyl peptides varying in chain length. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**: 381-389.

Mehra, R.K., Tran, K., Scott, G.W., Mulchandani, P. y Saini, S.S. (1996) Ag(I)-Binding to phytochelatin. *J. Inorg. Biochem.* **61**: 125-142.

Meuwly, P., Thibault, P. y Rauser, W.E. (1993) γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.* **336**: 472-476.

Meuwly, P., Thibault, P., Schwan, A.L. y Rauser, W.E. (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* **7**: 391-400.

Moore, J.N. y Luoma, S.N. (1990) Hazardous wastes from large-scale metal extraction. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1278-1285.

Morelli, E. y Scarano, G. (2001) Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Marine Env. Res.* **52**: 383-395.

Moreno-Garrido, I., Lubián, L.M. y Soares, A.M.V.M. (2000) Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **47**: 112-116.

Mounicou, S., Vacchina, V., Szpunar, J., Potin-Gautier, M. y Lobinski, R. (2001) Determination of phytochelatin by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* **126**: 624-632.

Mucha, A.P., Leal, M.F., Bordalo, A.A. y Vasconcelos, M.T. (2003) Comparison of the response of three microalgae species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 576-585.

Nassiri, Y., Wéry, J., Mansot, J.L. y Ginsburger-Vogel, T. (1997a) Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: an electron energy loss spectroscopy (EELS) study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 156-191.

Nassiri, Y., Mansot, J.L., Wéry, J., Ginsburger-Vogel, T. y Amiard, J.C. (1997b) Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanism of Cd and Cu in the marine diatom *Skletonema costatum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 147-155.

Neuhoff, H.G. (1983) Synergistic physiological effects of low copper and various oxygen concentrations on *Macoma balthica*. *Mar. Biol.* **77**: 39.

Newton, G.L., Dorian, R. y Fahey, R.C. (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobiamane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **114**: 383-387.

Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.L., Rennenberg, H. y Foyer, C.H. (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* **49**: 623-647.

Nygaard, T., Lie, E., Rov, N. y Steinnes, E. (2001) Metal dynamics in an antarctic food chain. *Marine Poll. Bull.* **42**: 598-602.

Ochiai, E.I. (1987) *General Principles of Biochemistry of the Elements*. New York: Plenum Press.

Oda, R.P. y Landers, J.P. (1994) Introduction to Capillary Electrophoresis. In *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Landers, J.P. (ed). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., pp. 9-42.

Odum, E.P. (1971) *Fundamentals of ecology*. Philadelphia.: Saunders College Publishing.

Okamoto, O.K., Asana, C.S., Aidar, E. y Colepicolo, P. (1996) Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *J. Phycol.* **32**: 74-79.

Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G. y Ow, D.W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal* **11**: 3491-3499.

Oven, M., Grill, E., Golan-Goldhirsh, A., Kutchan, T.M. y Zenk, M.H. (2002) Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* **60**: 467-474.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. y Vega, M. (2003) Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**: 26-32.

Pawlik-Skowronska, B. (2003) When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga *Stigeoclonium tenue* produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides. *Aquat.Toxicol.* **62**: 155-163.

Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D. y Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**: 1008-1018.

Pistocchi, R., Mormile, M.A., Guerrini, F., Isani, G. y Boni, L. (2000) Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.* **12**: 469-477.

Poskuta, J.W. (1991) Toxicity of heavy metals to growth, photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa* cells grown either in air or 1 % CO₂. *Photosynthetica* **25**: 181-188.

Prasad, M.N.V. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Env. Exp. Bot.* **35**: 525-545.

Prego, R. y Cobelo-García, A. (2003) Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environ. Pollut.* **121**: 425-452.

Radix, P., Léonard, M., Papantoniou, C., Roman, G., Saouter, E., Gallotti-Schmitt, S. *et al.* (2000) Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **47**: 186-194.

Radway, J.C., Wilde, E.W., Whitaker, M.J. y Weissman, J.C. (2001) Screening of algal strains for metal removal capabilities. *J. Appl. Phycol.* **13**: 451-455.

Ramo, J., Torreblanca, A. y Díaz Mayans, J. (1993) Toxicidad de los metales. In *Metales en sistemas biológicos*. Barcelona: Promociones y Publicaciones Universitarias, pp. 143-162.

Rea, P.A., Li, Z., Lu, Y., Drozdowicz, Y.M. y Martinoia, E. (1998) From vacuolar GS-X pumps to multiespecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **49**: 727-760.

Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Iowa: Blackwell Science Ltd.

Righetti, P.G. (2001) Capillary electrophoretic analysis of proteins and peptides of biomedical and pharmacological interest. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**: 337-351.

Rijstenbil, J.W. y Gerringa, L.J. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.* **56**: 115-131.

Rijstenbil, J.W., Sandee, A., van Drie, J. y Wijnholds, J.A. (1994) Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 387-396.

Rijstenbil, J.W., Dehairs, F., Ehrlich, R. y Wijnholds, J.A. (1998) Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-binding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquat. Toxic.* **42**: 187-209.

Rijstenbil, J.W., Haritonidis, S., van Drie, J., Malea, P. y Wijnholds, J.A. (1993) Interactions of copper with trace metals and thiols in the macro-algae *Enteromorpha prolifera* (O.F. Müll) J. Ag., grown in water of the Scheldt Estuary (Belgium and S. W. Netherlands). *Sci. Tot. Env. Supplement*: 539-549.

Robert, R., Parisi, J., Rodolfi, L., Poli, B.M. y Tredici, M.R. (2001) Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* **192**: 333-346.

Robinson, N.J. (1989) Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *J. Phycol.* **1**: 5-18.

Roesijadi, G., Vestling, M.M., Murphy, C.M., Klerks, P.L. y Fenselau, C.C. (1991) Structure and time dependent behavior of acetylated and non-acetylated forms of a molluscan metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**: 230.

Sanita di Toppi, L. y Gabrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**: 105-130.

Scarano, G. y Morelli, E. (2002) Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometales* **15**: 145-151.

Schafer, H.J., Greiner, S., Rausch, T. y Haag-Kerwer, A. (1997) In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amounts for gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-ECS) and metallothionein (MT2). *FEBS Lett.* **404**: 216-220.

Schanz, F. y Zahler, U. (1981) Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz. Z. Hydrol.* **43**: 103-113.

Seiler, H.G., Sigel, H. y Sigel, A. (1988) *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Sneller, F.E.C., Noordover, E.C.M., Bookum, W.M.T., Schat, H., Bedaux, J.J.M. y Verkleij, J.A.C. (1999) Quantitative relationship between phytochelatin accumulation and growth inhibition during prolonged exposure to cadmium in *Silene vulgaris*. *Ecotoxicology* **8**: 167-175.

Sneller, F.E.C., van Heerwaarden, L.M., Koevoets, P.L.M., Vooijs, R., Schat, H. y Verkleij, J.A.C. (2000) Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 4014-4019.

Sponza, D. y Karaoglu, N. (2002) Environmental geochemistry and pollution studies of Aliaga metal industry district. *Environ. Int.* **27**: 541-553.

Stauber, J.L. y Florence, T.M. (1985) The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.* **6**: 297-305.

Sunda, G.W. y Huntsman, S.A. (1996) Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 373-387.

Sunda, W.G. y Gessner, R.V. (1989) The production of extracellular copper-complexing ligands by marine and estuarine fungi. *Chem. Speciation Bioavail.* **1**: 65.

Sutter, K., Friebe, S. y Krauss, G.J. (1999) Capillary zone electrophoresis of phytochelatins and their precursors using on-line derivatization with n-ethylmaleimide. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **74**: 167-178.

Szalai, G., Janda, T., Golan-Goldhirsh, A. y Páldi, E. (2002) Effect of cadmium treatment on phytochelatin synthesis in maize. *Acta Biol. Szeg.* **46**: 121-122.

Thompson, P.-A. y Couture, P. (1991) Short-and long-term changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* **21**: 135-144.

Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P. y Abalde, J. (1997a) Rapid assay for the analysis of class III metallothioneins by capillary zone electrophoresis in crude extracts of microalgal cells exposed to cadmium. *J. Chromatogr. A* **775**: 339-347.

Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. y Abalde, J. (1995) Tolerance and detoxification mechanisms in marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* exposed to cadmium. *J. Mar. Biotechnol.* **3**: 176-178.

Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. y Abalde, J. (1997b) Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* **39**: 231-246.

Torricelli, E., Gorbi, G., Pawlik-Skowronska, B., Di Toppi, L.S. y Corradi, M.G. (2004) Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquat. Toxicol.* **68**: 315-323.

Travieso, L., Cañizares, R.O., Borja, R., Benitez, F., Domínguez, A.R., Dupeyron, R. y Valiente, V. (1999) Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**: 144-151.

Travieso, L., Pellon, A., Benitez, F., Sanchez, E., Borja, R., O'Farrill, N. y Weiland, P. (2002) BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochem. Eng. J.* **12**: 87-91.

Tripathi, R.D., Rai, U.N., Gupta, M. y Chandra, P. (1996) Induction of Phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (l. f.) Royle under cadmium stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**: 505-512.

Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S. *et al.* (2003) Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* **62**: 453-459.

Usero, J., Izquierdo, C., Morillo, J. y Gracia, I. (2003) Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environ. Int.* **29**: 949-956.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y. y Rea, P.A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 31451-31459.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. y Melillo, J.M. (1997) Human domination on Earth's ecosystem. *Science* **277**: 494-499.

Volesky, B. (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* **59**: 203-216.

Vymazal, J. (1987) Toxicity and accumulation of cadmium with respect of algae and cyanobacteria: a review. *Tox. Assess.* **2**: 387-415.

Waiwood, B.A., Zitko, V., Haya, K., Burridge, L.E. y McLeese, D.W. (1987) Uptake and excretion of zinc by several tissues of the lobster (*Homarus americanus*). *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 27-32.

Wikfors, G.H. y Ukeles, R. (1982) Growth and adaptation of estuarine unicellular algae in media with excess copper, cadmium or zinc, and effects of metal-contaminated algal food on *Crassostrea virginica* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **7**: 191-206.

Wikfors, G.H., Neeman, A. y Jackson, P.J. (1991) Cadmium-binding polypeptides in microalgal strains with laboratory-induced cadmium tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **79**: 163-170.

Wójcik, M., Vangronsveld, J. y Tukiendorf, A. (2005) Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* **53**: 151-161.

Xiang, C., Werner, B.L., Christensen, E.M. y Oliver, D.J. (2001) The biological functions of glutathione revisited in arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* **126**: 564-574.

Yang, Y., Boysen, R.I., Chen, J.I., Keah, H.H. y Hearn, M.T. (2003) Separation of structurally related synthetic peptides by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1009**: 3-14.

Yap, C.K., Ismail, A., Omar, H. y Tan, S.G. (2004) Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environ. Int.* **29**: 1097-1104.

Yin, L., Zhou, Y., Fan, X. y Lu, R. (2002) Induction of phytochelatins in *Lemna aequinoctialis* in response to cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* **68**: 561-568.

Zenk, M.H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**: 21-30.

Anexo

CLASS III METALLOTHIONEINS IN RESPONSE TO CADMIUM TOXICITY IN THE MARINE MICROALGA *TETRASELMIS SUECICA* (KYLIN) BUTCH

MÓNICA PÉREZ-RAMA, CONCEPCIÓN HERRERO LÓPEZ, JULIO ABALDE ALONSO, and ENRIQUE TORRES VAAMONDE*

Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n. 15071, La Coruña, España

(Received 30 May 2000; Accepted 1 February 2001)

Abstract—Microalgae are one of the most important organisms in our ecosystems being seriously affected by metal pollution. However, the microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylín) Butch is tolerant to cadmium; the concentration of this metal that reduces the population growth to 50% of the control growth level is 5.8 mg/L after 96 h of exposure. In this study, class III metallothioneins were investigated for their involvement as a possible tolerance mechanism in this microalga when exposed to cadmium. A set of these molecules was purified from these microalgal cells after exposure to the metal. These polypeptides were analyzed by capillary zone electrophoresis, which is a technique that allows the length of the metallothioneins synthesized by this microalga to be known. The *T. suecica* cells were able to synthesize class III metallothioneins of three to six subunits of (γ -Glu-Cys). The most abundant polypeptide possessed four subunits, and (γ -Glu-Cys)₄-Gly was the largest polypeptide synthesized by this microalga and detected by this technique. Tolerance to cadmium as a function of increasing polypeptide length is also discussed.

Keywords—Cadmium Microalga Toxicity Tolerance Class III metallothioneins

INTRODUCTION

Nonessential metal ions can inhibit a variety of metabolic activities and be detrimental to cellular processes. This also happens when essential metal ions are present at high concentrations above a specific threshold.

As a consequence of the industrial revolution, demand for metals is enormous and increasing, which leads to high anthropogenic emission of these elements in the environment. Metals in aquatic environments persist, because in contrast to herbicides, pesticides, and other potential pollutants, they do not break down and, instead, persist in sediments, being slowly released into the water and becoming available to the organisms [1].

Cadmium is a common industrial pollutant, the concentration of which has increased in various environments during the last decades. Cadmium is a nonessential metal that produces serious hazards to aquatic organisms, including microalgae [2,3]. The toxic effect of cadmium on microalgae is relevant, because these organisms constitute the base of the marine food chain.

Microalgae, like other organisms, have developed different protective mechanisms to tolerate exposure to metal poisoning. One of the most studied mechanisms during the last few years is the synthesis of metallothioneins. In response to excessive uptake of metals, microalgae induce metal-binding peptides, which are referred to as class III metallothioneins. Several studies have confirmed the ubiquity of class III metallothionein synthesis in response to cadmium in microalgae [4–7]. These molecules have attracted considerable interest regarding their biochemical and environmental aspects [8], not because of their role in the detoxification of metals but also because they could be involved in metal ion homeostasis as essential metal

ion reservoirs [9]. In plant cells, class III metallothioneins could play a role in sulfur metabolism as well [10].

Class III metallothioneins are polypeptides with the amino acid structure (γ -Glu-Cys)_n-Gly, where *n* ranges from 2 to 11. An enzyme, γ -glutamylcysteine transpeptidase, which is isolated from a higher plant, catalyzes class III metallothionein formation [11]. The enzyme transfers the γ -glutamylcysteine dipeptide from one glutathione molecule to another glutathione as an acceptor molecule. This reaction can thus proceed sequentially to yield progressively larger peptides.

This enzyme has been given the trivial name phytochelatin synthase, because it was first purified from plant cells [11]. Class III metallothionein synthase (i.e., phytochelatin synthase) is present constitutively in cells. Studies of the enzyme in vitro have demonstrated that cadmium is the most effective activator, followed (generally) by Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg, and Au [11,12], depending on the species of test organism used in the study.

Class III metallothioneins chelate metals through coordination with the sulfhydryl group in cysteine, forming thiolate-metal complexes. After the metal enters the cytosol of the cell, it is immediately complexed and inactivated. This action avoids the inhibitory effect of metal on active catalytic sites or on structural proteins [13]. Class III metallothioneins may be a component of a shuttle system for the transfer of metals from the cytoplasm to the vacuoles [14,15].

Class III metallothioneins are widespread among microalgae. In this study, the ability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylín) Butch to synthesize class III metallothioneins in response to cadmium was assayed. Moreover, the class III metallothioneins synthesized by this microalga were characterized using a capillary electrophoresis technique, which was used to separate and identify the class III metallothioneins.

* To whom correspondence may be addressed (torres@udc.es).

MATERIALS AND METHODS

Effect of cadmium toxicity on growth

The *T. suecica* cells were grown in batch conditions in natural, organic-free seawater to determine the effect of cadmium on growth. The seawater was passed through a 0.45- μ m Millipore filter (Milli-Q Corp., Bedford, MA, USA) and a charcoal column to eliminate organic chelating substances and, subsequently, sterilized at 121°C for 20 min. The assay was carried out in this natural, unenriched seawater, with no inorganic nutrients added. The salinity of the seawater was 35‰, and the initial pH of the culture was 8.

Stock solution of cadmium was prepared by dilution of CdCl₂ in Milli-Q water to a final concentration of 10 g/L of cadmium. For the experiment, appropriate volumes of the stock solution were added to the natural seawater to obtain cadmium concentrations of 0.6, 3, 6, 15, 30, 45, and 60 mg/L. Control cultures without cadmium were also included.

Cultures were carried out in triplicate in Kimax test tubes (Kimble Glass, Vineland, NJ, USA) containing 40 ml of this natural seawater. The tubes were previously rinsed with nitric acid as well as several times with Milli-Q water. Cultures were maintained at 18 ± 1°C and 68 μ E/m²/s, with a 12:12 photoperiod for 4 d. Initial cell density was 25 × 10⁴ cells/ml. Cultures were gently shaken every day to ensure homogeneous exposure to the metal. Growth of microalgal cultures was measured daily by counting culture aliquots in a Neubauer (Blau-Brand, Brand, Germany) hemocytometer chamber after fixation with Lugol (Central Scientific, Franklin Park, IL, USA).

The concentration of cadmium that reduces the population growth to 50% of the control growth level (EC50) was calculated by probit analysis [16].

Class III metallothionein synthesis

Culture conditions. The metallothionein induction assay was carried out in seawater enriched with inorganic nutrients [17] but without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and Tris. Cultures were grown in triplicate in glass bottles (Pyrex®, Corning, New York, NY, USA) with natural, sterile air at a flow rate of 10 L/min. Cultures were maintained at 18 ± 1°C and 68 μ E/m²/s, with a 12:12 photoperiod. Initial cell density was 25 × 10⁴ cells/ml. These culture conditions were necessary for achieving better growth. Cultures were maintained until sufficient cells were obtained, because larger amounts of biomass are required to detect and purify metallothioneins.

The cadmium concentration used for metallothionein induction experiments was 6 mg/L. Cultures without cadmium were also included as controls.

Nonprotein thiol-rich compound extraction and detection in crude extracts. Nonprotein thiol-rich compounds were determined in acid crude extracts according to the method described by Ellman [18]. Cells from cultures not exposed to cadmium and from cultures exposed to 6 mg/L of cadmium were collected by centrifugation (12,000 g for 10 min) and washed with metal-free seawater. The cell pellet was then resuspended in 0.1 M HCl, and the cells were homogenized with an ultrasonic cell disrupter for 3 min at 14 μ m. Unbroken cells and cellular debris were removed by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4°C.

An aliquot of 400 μ l of the acid extract was mixed with 700 μ l of a solution containing 10 mM dithiobis-nitrobenzoic acid, Ellman reagent, and 1 mM EDTA in 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5). After 2 min of reaction, the absorption

was recorded at 412 nm. Values were corrected for the absorbance of the reagents and of the extracts.

Glutathione was used as a suitable calibrating substance for quantitating the thiols.

Purification of metallothionein complexes. Cadmium metallothioneins were purified by gel-filtration chromatography. Alkaline extracts were prepared from cells exposed to 6 mg/L of cadmium for 8 d and from cells not exposed to cadmium. Cells were collected by centrifugation (12,000 g for 10 min) and washed with metal-free seawater. The cell pellet was resuspended in 75 mM sodium borate buffer (pH 8.6), and the cells were disrupted and clarified as in the acid extracts.

One milliliter of these alkaline extracts was applied to a Biogel P-60 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) gel-filtration column (2.5 × 60 cm) equilibrated with 75 mM sodium borate buffer (pH 8.6). The extracts were eluted in the same buffer at a flow rate of 0.4 ml/min and at room temperature (23 ± 2°C). The absorption of the eluates was monitored at 254 nm, and fractions of 4 ml were collected.

The metallothionein-containing fractions in the cellular extracts were located by cadmium analysis and by measurement of the thiol content of an aliquot of each fraction. An aliquot of each fraction was acidified with nitric acid, and then cadmium was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry using a VG Elemental Plasma Quad 2 ICP-MS System (VG Elemental, Offenbach, Germany). Thiol groups were detected and measured in all fractions according to the method described by Ellman [18].

Analysis of metallothioneins

Determination of amino acid content. The purified fraction containing the highest concentration of cadmium and thiol groups was analyzed to determine the amino acid composition. Amino acid composition was determined after cysteine stabilization with 3,3'-dithiodipropionic acid (DTDPA) by high-performance liquid chromatography (HPLC) [19] using a HP 1046A HPLC system equipped with an HP 1050 fluorescence detector (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

Aliquots from the purified fraction were mixed with a solution containing 10% (w/v) DTDPA dissolved in borate buffer (0.4 N, pH 10.4). After 1 h, the hydrolysis was produced by addition of HCl and phenol at final concentrations of 6 N and 0.1% (w/v), respectively. The tube containing the mixture was sealed and hydrolyzed for 24 h at 110°C. The tube was then cooled, and the sample was evaporated to dryness. Finally, the sample was reconstituted in the borate buffer and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C.

The amino acids were analyzed by HPLC after derivatization with *o*-phthalaldehyde for primary amino acids and with 9-fluorenylmethylchloro-formate for secondary amino acids using a C₁₈ ODS Hypersil, 5- μ m column (250 × 4 mm) equipped with a guard column Lichrospher 100RP-18 (5 μ m, 4 × 4 mm; Merck, Darmstadt, Germany). The chromatographic procedure was the same as that described by Godel et al. [20]. Chromatograms were recorded and analyzed with the Chemstation HPLC^{3D} data processing software (Hewlett-Packard).

Capillary electrophoresis. The fraction containing the highest concentrations of thiol groups and cadmium was analyzed by capillary electrophoresis. The electrophoretic analysis was performed on a HP^{3D}CE Capillary Electrophoresis System (Hewlett-Packard) using an uncoated, fused silica capillary

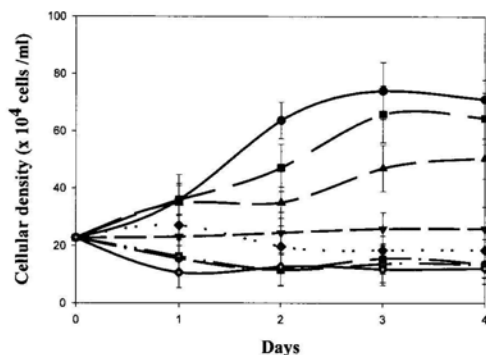


Fig. 1. Growth of *Tetraselmis suecica* cells with the different cadmium concentrations assayed. ● = Control, ■ = 0.6 mg/L, ▲ = 3 mg/L, ▼ = 6 mg/L, ◆ = 15 mg/L, ○ = 30 mg/L, □ = 45 mg/L, ◇ = 60 mg/L. Data are means \pm SD ($n = 3$).

(inner diameter, 50 μ m; total length, 37.5 cm). Ultraviolet detection was fixed at a wavelength of 200 nm.

Before the runs, the capillary was rinsed with 1 M sodium hydroxide solution, distilled water, and 1 M HCl and then conditioned for 3 min with the running buffer. The running buffer was 150 mM phosphoric acid with 2% (v/v) acetonitrile as an organic modifier. Between each injection, the capillary was consecutively washed for 2 min with 0.1 M HCl and Milli-Q water to remove surface-adhered material and to maintain separation reproducibility. Finally, the capillary was filled with running buffer. Injection of the sample into the capillary was at the anode by pressure at 50 mbar. Electrophoresis was carried out by applying +12 kV in a constant-voltage mode at room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

RESULTS

Growth

Figure 1 shows a significant effect (analysis of variance, $p < 0.001$) of cadmium on growth of *T. suecica* after 96 h of exposure. Exposure of *T. suecica* cells to increasing cadmium concentrations resulted in progressive inhibition of growth. As cadmium concentration increased in the medium, growth decreased. Control cultures and cultures exposed to 0.6 and 3 mg/L of cadmium reached the stationary phase in 3 d, whereas in the cultures exposed to 6 mg/L, only a small increase in cell density occurred. Cultures exposed to the highest cadmium concentrations (15, 30, 45, and 60 mg/L) did not grow at all.

The statistical analysis using Duncan's multiple range test showed that the toxic effect of the different cadmium concentrations assayed on *T. suecica* growth could be expressed as

$$\text{Control} = 0.6 < 3 < 6 < 15 = 30 = 45 = 60$$

Therefore, in these culture conditions, a cadmium concentration of 0.6 mg/L or less had no detectable effect on growth of microalgal cells, but at higher cadmium levels, growth rates decreased.

The median effective concentration (EC50) for this microalga was estimated at 5.8 mg/L of cadmium after 96 h of exposure.

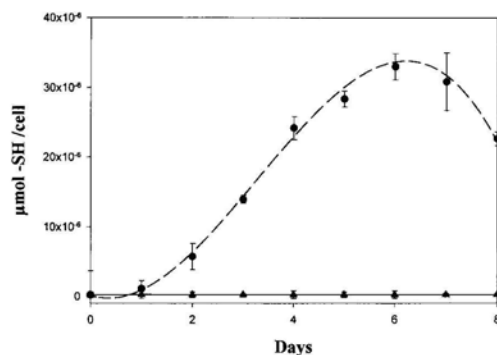


Fig. 2. Time course of thiol groups in *Tetraselmis suecica* cultures exposed to 6 mg/L of cadmium during 8 d (●) and in control cultures (▲). Data are means \pm SD ($n = 3$).

Analysis of metallothioneins

Initial screening for cadmium-binding polypeptides was the measure of thiol group evolution in cultures exposed to cadmium.

An increase in the concentration of thiol groups was observed over time in *T. suecica* cells exposed to cadmium (Fig. 2), whereas thiol content in the cells not exposed to cadmium did not change during the experiment. In cells exposed to cadmium, thiol concentration fitted a sigmoidal curve, with $R^2 = 0.99$. A rapid increase occurred in thiol groups, reaching the highest concentration in 6 d, with $30.8 \times 10^{-6} \mu\text{M-SH/cell}$. The presence of thiol-rich compounds in the microalgae was considered to be the first presumptive evidence of metal-binding polypeptides in these cells. Therefore, *T. suecica* cells exposed to cadmium are able to synthesize and accumulate compounds with thiol groups.

Purification of these molecules induced by cadmium was performed by gel-filtration chromatography. Crude, cell-free extracts of untreated cells and of treated cells cultured for 6 d with 6 mg/L of cadmium were examined. Typical separations of these extracts are shown in Figure 3. Absorbance was measured at 254 nm, with a new peak appearing in the chromatogram of cadmium-exposed cells (Fig. 3b). This peak did not appear in the chromatogram of control cells (Fig. 3a). The higher concentration of thiol groups corresponded to this new peak in the chromatogram of cells exposed to cadmium (Fig. 3b). Similarly, metal analysis showed that the fractions of this peak (fractions 21–33) had the highest cadmium concentration, with 86.71% of the cadmium present in the initial extract applied to the gel-filtration column. The appearance of cadmium-enriched thiol fractions indicates the presence of thiolate-metal complexes.

When the cadmium-enriched thiol fractions separated by gel permeation chromatography were subjected to amino acid analysis, only three amino acids were detected: glycine, glutamic acid, and cysteine. Glutamic acid and cysteine were the most abundant amino acids. Therefore, from these data, the new peak fractions clearly correspond to class III metallothioneins. These molecules were induced in response to cadmium exposure and characterized by the presence of thiolate-metal complexes, and the amino acid composition was the same as that for class III metallothioneins.

Thiol groups were identified as class III metallothionein. The level of these cadmium-binding polypeptides in *T. suecica*

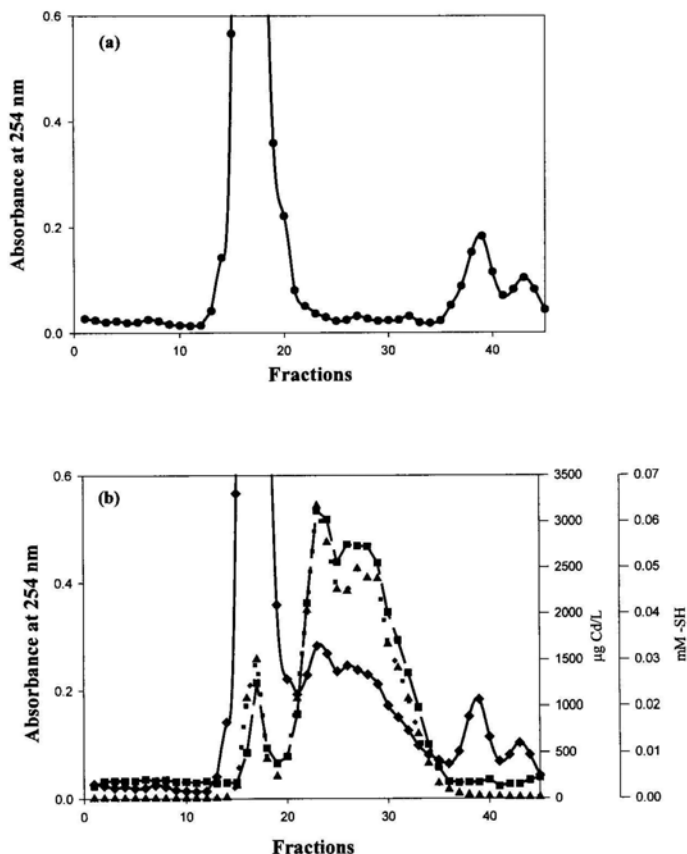


Fig. 3. Typical chromatograms obtained by gel-filtration chromatography from *Tetraselmis suecica* cells not exposed (a) and exposed to 6 mg/L of cadmium for 6 d (b). ● = Absorbance at 254 nm, ■ = -SH groups, ▲ = cadmium.

cells also increased with time of exposure to cadmium (Fig. 2). Capillary electrophoresis was used to characterize these cadmium-binding polypeptides synthesized in response to cadmium [21]. Running buffer was added with 2% (v/v) acetonitrile (organic modifier) that allowed class III metallothioneins peaks to be sharper and the resolution to be increased.

The electropherogram (Fig. 4) of the class III metallothioneins purified from *T. suecica* cells distinguished four peaks,

each corresponding to a metallothionein with a different number of subunits. The presence of various peaks in the fraction containing metallothioneins indicates that these molecules form a complex of metallothioneins with different chain lengths.

This electrophoretic technique allowed determination of the length of these polypeptides [21]. The *T. suecica* cells exposed to cadmium were able to synthesize metallothioneins of three to six subunits of (γ-Glu-Cys). The most abundant polypeptide was (γ-Glu-Cys)₄-Gly, and the largest polypeptide detected by this technique contained six subunits.

DISCUSSION

Microalgae are one of the most important organisms in our ecosystem, because they are the main primary producers and the base of the food chain. Microalgae are characterized by their rapid growth rates and ubiquitous distribution in natural environments, and they show greater sensitivity to environmental variation (e.g., nutrients and pollutants). This is why the use of microalgae as test organisms is gaining support. Furthermore, algal toxicity tests are quick, inexpensive, and can be used effectively to assess those toxic substances that are found in concentrations too low for effective detection by higher trophic organisms [22].

Cadmium is one of the most toxic metals, with no described

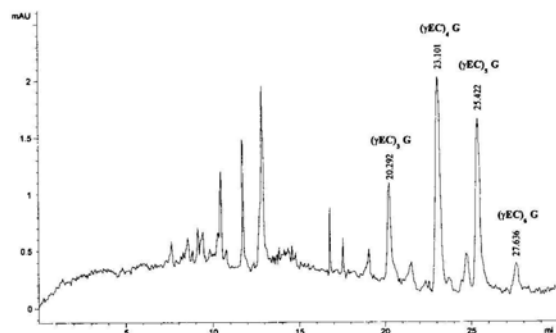


Fig. 4. Electropherogram obtained by capillary electrophoresis of the fraction containing the highest concentration of class III metallothioneins [(γEC)_nG].

biological function. Due to a great affinity to sulfhydryl groups, cadmium can inactivate many important enzymes, resulting in the inhibition of growth, photosynthesis, respiratory rate, and other cell processes [3]. Several studies have been reported concerning the effect of cadmium on growth of microalgal cells [23]. Growth is a good indicator for the toxic action of cadmium in microorganisms, and it reflects the metabolism of the cell.

The effect of cadmium on growth depends on the microalgal species. *Tetraselmis suecica* tolerates high concentrations of cadmium. In this study, a concentration of 3 mg/L or higher affected the growth of *T. suecica* cells (Fig. 1). The EC50 calculated for this microalga after 96 h of exposure to this metal was 5.8 mg/L.

Interspecies differences in microalgal cadmium tolerance have been reported. *Microcystis aeruginosa*, *Scenedesmus quadricauda*, *Aulacoseira granulata*, *Anabaena variabilis*, *Chlorella vulgaris*, and *Haematococcus capensis* are among the microalgae most sensitive to cadmium, with their growth being inhibited at 5.6×10^{-4} , 1.87×10^{-3} , 2.13×10^{-3} , 0.01, 0.1, and 0.1 mg/L of cadmium, respectively [2,24]. *Scenedesmus obliquus*, *Ankistrodemon falcatus*, *Chlorococcum* sp., *Navicula incerta*, and *T. gracilis* are more tolerant to cadmium, with their growth being inhibited at 2.5, 2.5, 3, 3.01, and 3.2 mg/L [24]. Therefore, *T. suecica* can be included in the group of microalgal species most tolerant of cadmium.

Many metals induce production of class III metallothioneins, although the magnitude of the response depends on the particular metal [25]. Production of these peptides is believed to be a general detoxification system in many cells. Thus, Wikfors et al. [6] selected microalgal strains with laboratory-induced cadmium tolerance. They found that *Phaeodactylum tricornutum* strains grew in concentrations that were acutely toxic to the original *P. tricornutum* strain from which they were derived, and that these tolerant strains produced more $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ than the original strain. In the same way, a cadmium-resistant line of *Chlorella* sp., with an EC50 of 3.92 mg/L, was found to produce more metallothioneins than the sensitive line with an EC50 of 0.336 mg/L [26]. Also, Rijst-enbil et al. [27] observed in the diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana* the appearance of compounds with thiol groups after exposure to several metals (cadmium, copper, and zinc); these compounds were identified as class III metallothioneins.

Cadmium is the most studied metal regarding class III metallothioneins, because this metal is one of the best inducers of these polypeptides [28]. Ahner and Morel [25] found that the concentration of intracellular class III metallothioneins in *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis maculata*, and *Emiliana huxleyi* increased after the addition of cadmium. These microalgae were exposed to Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Co, Ag, and Hg. Cadmium was the most effective inducer of class III metallothioneins in these three marine microalgae.

In this study, the ability of *T. suecica* cells to synthesize class III metallothioneins as a mechanism of tolerance to cadmium was demonstrated. These microalgal cells produced net quantities of thiols when they were exposed to cadmium (Fig. 2), and these thiols were identified as class III metallothioneins (Fig. 4).

As in those of other microalgae, class III metallothionein concentration increased in *T. suecica* cells with metal exposure. In this study, metal analysis showed that approximately 87% of the cadmium that accumulated in *T. suecica* was bound

by class III metallothioneins. Torres et al. [21] found that *Phaeodactylum tricornutum* cells bound 60% of cellular cadmium as cadmium-binding complexes. These polypeptides would be acting as chelating molecules of cadmium and, therefore, cooperating in a possible mechanism of tolerance to this metal.

Capillary electrophoresis was performed to characterize the thiol-containing molecules that accumulated in response to cadmium in the microalga *T. suecica*. The traditional technique for an analysis of this kind of molecules is HPLC [11]. Recently, capillary electrophoresis has been used for the separation of class I and class III metallothioneins, showing that this technique is a very efficient tool with a high separation efficiency [29,30]. This technique also allows the length of the metallothioneins to be determined [21]. A similar method described by Torres et al. [21] was employed in this separation, but with the modification that 2% (v/v) acetonitrile was added to the running buffer. The addition of organic modifier resulted in sharper class III metallothionein peaks and increased resolution.

The length of the class III metallothioneins synthesized is of great interest. The *T. suecica* cells exposed to 6 mg/L of cadmium for 6 d are able to synthesize metallothioneins with three to six subunits of $(\gamma\text{-Glu-Cys})$ (Fig. 4). The most abundant polypeptide detected by this technique was $(\gamma\text{-Glu-Cys})_4\text{-Gly}$, and the largest detected had six subunits.

One of the roles of class III metallothioneins is to protect against the toxic effects of metals, because immobilized metals are less toxic than free ions. Microalgae that are able to synthesize metallothioneins with higher chain lengths are more tolerant of metals, because long-chain metallothioneins are more efficient at binding metals. Thus, Kaplan et al. [26] found that the differences between resistant and sensitive strains of *Chlorella* sp. were an increase in class III metallothionein concentration and the appearance of longer metallothioneins in the tolerant cells. The EC50 was 3.92 mg/L of cadmium in the resistant line and 0.336 mg/L of cadmium in the sensitive line.

The class III metallothioneins found in *P. tricornutum* cells have from four to nine subunits of $(\gamma\text{-Glu-Cys})$. The most abundant polypeptide had five subunits, and the largest polypeptide was $(\gamma\text{-Glu-Cys})_6\text{-Gly}$ [21]. In this diatom, growth was inhibited at 10 mg/L of cadmium, and the EC50 was 22 mg/L. Therefore, *T. suecica* would be among the microalgae most tolerant of cadmium, because it is able to synthesize longer class III metallothioneins than other microalgae. Production of these long-chain complexes could contribute to higher cadmium tolerance by more effective metal sequestration. Thus, tolerance to cadmium could be due not only to an increase in the concentration of these cadmium-binding polypeptides but, also, to the length of these polypeptides.

Isolation or selection of microalgal strains that are more tolerant to the toxic effects of metals, such as cadmium, is important, because these microalgae can be utilized in removing metals from polluted water. Knowing the mechanisms that contribute to metal tolerance may help to improve the efficiency of removing these metals.

Acknowledgement—The authors thank Servicios Generales de Apoyo a la Investigación from Universidad de La Coruña for inductively coupled plasma analyses, especially to Alicia Cantarero, who performed them, for generously providing this information.

REFERENCES

- Bryan GW, Langston WJ. 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: A review. *Environ Pollut* 76:89–131.
- Rai LC, Gaur JP, Kumar HD. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol Rev* 56:99–151.
- Vymazal J. 1987. Toxicity and accumulation of cadmium with respect of algae and cyanobacteria: A review. *Toxicol Assess* 2: 387–415.
- Gekeler W, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch Microbiol* 150:197–202.
- Robinson NJ. 1989. Algal metallothioneins: Secondary metabolites and proteins. *J Phycol* 1:5–18.
- Wikfors GH, Neeman A, Jackson PJ. 1991. Cadmium-binding polypeptides in microalgal strains with laboratory-induced cadmium tolerance. *Mar Ecol Prog Ser* 79:163–170.
- Ahner BA, Kong S, Morel FMM. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol Oceanogr* 40:649–657.
- Kneer R, Zenk MH. 1992. Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metals poisoning. *Phytochemistry* 31:2663–2667.
- Thumann J, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. 1991. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett* 284:66–69.
- Robinson NJ. 1990. Metal-binding polypeptides in plants. In Shaw AJ, ed, *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 195–214.
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH. 1989. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6838–6842.
- Rauser WE. 1995. Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol* 109:1141–1149.
- Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants—A review. *Gene* 179:21–30.
- 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 J* 11:3491–3499.
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ. 1990. Subcellular localization of cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol* 92: 1086–1093.
- Finney DJ. 1964. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, London, UK.
- Fábregas J, Herrero C, Cabezas B, Abalde J. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture* 53:101–113.
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77.
- Barkholt V, Jensen AL. 1989. Amino acid analysis: Determination of cysteine plus half-cysteine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal Biochem* 177:318–322.
- Godel H, Seitz P, Verhoef M. 1991. Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-CI precolumn derivatization. *LC-GC Int* 5:44–49.
- 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 tricornutum* Bohlin. *Aquat Toxicol* 39:231–246.
- Wong PTS, Couture P. 1986. Toxicity screening using phytoplankton. In Dutka BJ, Bitton G, eds, *Toxicity Testing Using Microorganisms*, Vol 2. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 79–100.
- Guanzon NG, Nakahara H, Yoshida Y. 1994. Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fish Sci* 60:379–384.
- Okamoto OK, Asana CS, Aidar E, Colepicolo P. 1996. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *J Phycol* 32:74–79.
- Ahner BA, Morel FMM. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol Oceanogr* 40: 658–665.
- Kaplan D, Heimer YM, Abeliovich A, Goldsbrough PB. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Sci* 109: 129–137.
- Rijstenbil JW, Sandee A, Van Drie J, Wijnholds JA. 1994. Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Dietylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol Rev* 14:387–396.
- Steffens JC. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:553–575.
- Virtanen V, Bordin G, Rodriguez A-R. 1996. Separation of metallothionein isoforms with capillary zone electrophoresis using an uncoated capillary column. Effects of pH, temperature, voltage, buffer concentration and buffer composition. *J Chromatogr A* 734:391–400.
- Torres E, Cid A, Fidalgo P, Abalde J. 1997. Rapid assay for the analysis of class III metallothioneins by capillary zone electrophoresis in crude extracts of microalgal cells exposed to cadmium. *J Chromatogr A* 775:339–347.



ELSEVIER

Bioresource Technology 84 (2002) 265–270

BIORESOURCETECHNOLOGY

Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*

Mónica Pérez-Rama, Julio Abalde Alonso, Concepción Herrero López, Enrique Torres Vaamonde *

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 La Coruña, Spain

Received 1 November 2001; received in revised form 15 January 2002; accepted 29 January 2002

Abstract

Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica* was tested in cultures exposed to different cadmium concentrations (0.6, 3, 6, 15, 30 and 45 mg/l). The EC50 for growth was 7.9 mg Cd/l after six days of exposure. The cadmium removed was proportional to the concentration of this metal in the medium and it was dependent on the time of exposure; cultures with higher cadmium concentration removed a higher amount of this metal. In cultures exposed to 0.6 mg/l, *T. suecica* cells removed 98.1% of added cadmium with 0.392×10^{-6} µg Cd/cell, whereas in cultures with 45 mg/l only 7.7% was removed with 16.052×10^{-6} µg Cd/cell. The highest amount of cadmium removed per liter of culture was observed in cultures exposed to 6 mg/l, with 3.577 mg/l of cadmium. After six days of incubation, the higher proportion of cadmium was bioaccumulated intracellularly in all cultures except in 45 mg/l cultures, the percentage of intracellular cadmium being always more than 50%. The highest percentage of bioadsorbed cadmium (60.1%) was found in cells of cultures with the highest cadmium concentration (45 mg/l). Furthermore, a relation between intracellular cadmium and the concentration of sulfhydryl groups was observed. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Microalga; *Tetraselmis suecica*; Cadmium removal; Bioaccumulation; Biosorption; Sulfhydryl groups

1. Introduction

Metal pollution of environments is one of the major problems of increasing magnitude. In this way, metal pollution can produce many biological effects on aquatic environments. These biological effects may result in structural changes in planktonic communities. In particular, they reduce the richness of microalgal species, the microalgal production and alter the microalgal community structure (Rai et al., 1981). The toxic effect of metals on microalgae is relevant since these organisms constitute the base of the marine food chain. Metals exert their harmful effects in many ways, although all the major mechanisms of toxicity are a consequence of the strong coordinating properties of metal ions that affect the properties of many biological molecules (enzymes, etc.) (Kneer and Zenk, 1992). Moreover, metals are

accumulated throughout the food chain, posing a serious threat to human health.

One of the metals whose concentration is increasing in environments is cadmium. This metal has been ranked as one of the major potential metal hazards with acute toxicity to terrestrial and aquatic organisms (Vymazal, 1987). Cadmium is used in different industrial processes as production of television tube phosphores, alloy preparation, metal plating, nuclear reactor shields and rods, pigments, stabilizers, batteries, etc. A high concentration of cadmium in mine drainage has also been reported. The concentration of this element occurs at ultra trace levels in natural environments, but its increasing utilization in industrial processes has led to increased levels in aquatic environments (Mislin and Ravera, 1986). This observation has created the necessity for the development of techniques to remove this metal from the environment (Torres et al., 1998; Volesky, 1990; Vymazal, 1987).

The aim of this study was to test the ability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* to remove cadmium. This microalga is easy to culture, usually used in

* Corresponding author. Tel.: +34-981-167000; fax: +34-981-167065.

E-mail address: torres@udc.es (E. Torres Vaamonde).

aquaculture systems, and has shown high tolerance to cadmium toxicity.

2. Methods

2.1. *T. suecica* culture conditions

The marine microalga *T. suecica* (Kylin) Butch was cultured for six days in natural enriched seawater media containing several concentrations of CdCl₂. The seawater was passed through a 0.45 µm-pore Millipore filter and a charcoal column to eliminate organic chelating substances and subsequently sterilized at 121 °C for 20 min. The assay was carried out in this natural seawater with the addition of inorganic nutrients (Fábregas et al., 1986) but without EDTA and Tris. The salinity of seawater was 35‰ and the initial pH of the culture was 7.8.

A stock solution of cadmium was prepared by dilution of CdCl₂ in Milli-Q water to a final concentration of 10 g/l of cadmium. For the experiments, appropriate volumes of the stock solution were added to the seawater media to obtain cadmium concentrations of 0.6, 3, 6, 15, 30 and 45 mg/l.

Cultures were carried out in 2 l glass bottles (PY-REX). The bottles were previously rinsed with nitric acid and several times with Milli-Q water. Inside these bottles, the enriched seawater and an appropriate volume of the stock solution of cadmium were placed with the *T. suecica* cells at an initial cell density of 25×10^4 cells/ml. Control cultures without cadmium were included. Each experiment was carried out in triplicate. Cultures were maintained at 18 ± 1 °C under a light intensity of 68 µE/m²/s using cool fluorescent light and with a dark:light cycle of 12:12 h. Natural sterile air was constantly bubbled at a flow rate of 10 l/min.

2.2. Growth measure

Growth of microalgal cultures was measured daily by counting culture aliquots in a Neubauer hemocytometer chamber after fixation with Lugol. The degree of growth inhibition by cadmium in *T. suecica* cells was measured on the sixth day. For that, the EC50 (cadmium concentration which reduces the population growth to 50% of the control) was determined by probit analysis on this day from the percentages of growth inhibition at different cadmium concentrations (Finney, 1964).

2.3. Extraction and detection of non-protein sulphhydryl groups-rich compound in crude extracts

Cells from control cultures not exposed to cadmium and exposed to different concentrations of this metal

were collected daily by centrifugation (4000×g for 5 min) and washed with metal-free seawater. The cell pellet was resuspended in 0.1 N HCl and the cells were homogenized with an ultrasonic cell disrupter for 3 min at 14 µm. Cellular debris was removed by centrifugation at 12000×g for 15 min at 4 °C.

Non-protein sulphhydryl groups-rich compounds were determined in these acid crude extracts by the method of Ellman (1959). An aliquot of 400 µl of the acid extract was mixed with 700 µl of a solution containing 10 mM dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman reagent) and 1 mM EDTA in 0.5 M sodium phosphate buffer, pH = 7.5. After 10 min of reaction in darkness, the absorption was recorded at 412 nm. Values were corrected for the absorbance of the reagents and of the extracts.

Glutathione was used as a suitable calibrating substance for quantifying the sulphhydryl groups.

2.4. Determination of cadmium removed

The cadmium removed by the microalga *T. suecica* was evaluated using a modified method described by Stauber and Florence (1985).

Total cadmium in cells was determined by filtration of 15 ml aliquots from each culture of *T. suecica*. Each aliquot was filtered through two superposed 1.2 µm MF-Millipore filters. Filters were separately digested for 24 h with 1 ml of 15 M HNO₃ and 0.5 ml HClO₄. Cadmium was measured in both filters and the lower filter was used as blank.

Intracellular cadmium was measured in the following way. A 25 ml aliquot from each microalgal culture was centrifuged at 4000×g for 5 min, the pellet was resuspended for 20 min in 25 ml of a solution containing 0.02 M EDTA dissolved in seawater. Afterwards, cells were centrifuged and washed twice with seawater. The EDTA washing removed cadmium adsorbed onto the cell surface, thereby allowing only intracellular cadmium to be measured. The washed pellet was digested as in total cadmium determination.

Digested samples were brought to final volume of 5 ml with Milli-Q water. Cadmium present in the samples was measured by ICP-MS using a VG Elemental Plasma Quad 2 ICP-MS System (VG Elemental, 63069 Offenbach, Germany).

Cadmium bioadsorbed onto the cell surface was determined by subtracting the intracellular cadmium concentration from the total cadmium removed (bioadsorbed cadmium = total cadmium – intracellular cadmium).

All determinations were made daily for six days and on day 0 the measures were taken after the addition of the inoculum of *T. suecica* to each culture.

The cadmium removal percentage (%) was calculated on the basis of cadmium added to each culture.

3. Results

3.1. Growth

There was growth inhibition in cultures exposed to cadmium. ANOVA test ($p < 0.001$) showed that this metal had a significant effect on growth of *T. suecica* after six days of exposure. The inhibition was proportional to cadmium concentration: as cadmium concentration increased in the medium, growth decreased. Cultures with cadmium concentrations of 15 and 30 mg Cd/l hardly grew, and in those with the highest cadmium concentration assayed (45 mg/l) total inhibition of growth was observed. Duncan test ($\alpha = 0.005$) showed that all assayed concentrations of cadmium inhibited growth of *T. suecica*, a significant effect on growth being observed even at the lowest concentration, 0.6 mg Cd/l.

The effective concentration (EC50 value) for this microalga was estimated as 7.9 ± 1 mg/l of cadmium after six days of exposure to this metal.

3.2. Time course of sulfhydryl groups

The changes with time of sulfhydryl groups in cultures exposed to the different cadmium concentrations and in control cultures during the six days showed that the amount of sulfhydryl groups was proportional to the initial cadmium concentration: the greatest increase in sulfhydryl groups per cell was found in cultures containing the higher cadmium concentrations (15, 30 and 45 mg/l). In all cultures, sulfhydryl groups increased during all days of culture. Sulfhydryl groups were most abundant in cultures of 45 mg Cd/l with 1.168×10^{-13} mol -SH/cell on the sixth day. The other cultures (0.6, 3, 6, 15 and 30 mg/l) reached a maximum amount of 1.463×10^{-15} , 1.094×10^{-14} , 2.220×10^{-14} , 7.350×10^{-14} and 8.726×10^{-14} mol -SH/cell, respectively.

3.3. Removed cadmium

T. suecica is a marine unicellular microalga whose cells are able to bioaccumulate and bioabsorb cadmium, allowing it to be removed from the medium. These cells showed a high ability for cadmium removal.

The total cadmium removed per cell was significant from the first day of culture. In all cultures, *T. suecica* showed a rapid accumulation of cadmium in the first two days. The amount of cadmium removed in most cultures reached a maximum after two or three days of exposure to the metal, and thereafter, a decrease was observed. The highest value of metal removed occurred in cultures with the highest cadmium concentration assayed (45 mg Cd/l) and on the fifth day of culture (16.052×10^{-6} µg/cell). In cultures with the lowest cad-

mium concentration assayed (0.6 mg/l) the maximum amount of cadmium removed by cells was 0.392×10^{-6} µg/cell on the third day of culture. In the other cultures (3, 6, 15, 30 and 45 mg/l) the maximum amount of cadmium removed from the medium was 1.769×10^{-6} , 3.49×10^{-6} , 6.784×10^{-6} , 10.655×10^{-6} and 16.052×10^{-6} µg/cell, respectively. Total cadmium removed by the cells increased as cadmium concentration in the medium increased.

Part of the total cadmium removed by cells was accumulated intracellularly and another part was adsorbed onto the cell surface.

The amount of cadmium removed intracellularly increased as cadmium increased in the medium and with time of exposure. In cultures with the lower cadmium concentrations (0.6, 3 and 6 mg Cd/l) this increase was more gradual from the third day of culture. The maximum amount of cadmium removed intracellularly was 6.260×10^{-6} µg/cell in cultures exposed to 45 mg Cd/l and after six days of culture. In cultures exposed to 0.6 mg Cd/l the uptake of cadmium reached a value of 0.217×10^{-6} µg/cell in six days. In the rest of the cultures exposed to the cadmium concentrations assayed (3, 6, 15 and 30 mg/l) the maximum amounts of cadmium removed by bioaccumulation into *T. suecica* cells were 0.834×10^{-6} , 1.889×10^{-6} , 4.231×10^{-6} and 4.883×10^{-6} µg/cell, respectively.

During the six days of culture and for all cadmium concentrations assayed there was a rapid increase in the cadmium adsorbed on the cell surface during the first two days of exposure. From the second day on, cadmium adsorbed decreased in all cultures. The maximum amount of cadmium removed by adsorption to the cell surface was in cultures exposed to the highest cadmium concentration (45 mg/l) with 13.254×10^{-6} µg/cell on the second day of culture. Cultures exposed to 0.6 mg Cd/l removed 0.199×10^{-6} µg/cell after three days of culture. The rest of cultures (3, 6, 15 and 30 mg/l) removed 1.098×10^{-6} , 2.146×10^{-6} , 4.812×10^{-6} and 8.916×10^{-6} µg/cell, respectively, after two days of culture.

Table 1 shows the cadmium removed from each culture after six days. The highest amount of intracellular cadmium was 2.318 mg Cd/l in the cultures exposed to 6 mg Cd/l. However, bioadsorbed cadmium was higher in cultures exposed to the highest cadmium concentration assayed (45 mg/l) with 2.085 mg/l.

Fig. 1 shows the relation between intracellular cadmium and the sulfhydryl groups on the sixth day of culture. This figure indicates that the correlation between the intracellular cadmium and the content of sulfhydryl groups was highly significant ($R^2 = 0.996$, $p \leq 0.001$). The slope of the regression line was 2.16, which indicates that the ratio between sulfhydryl groups and cadmium was 2, just as expected from this type of interaction.

Table 1
Cadmium removed (mg/l) by the sixth day in cultures of *T. suecica* exposed to different cadmium concentrations

Initial cadmium concentrations added to the cultures (mg/l)	Intracellular cadmium	Bioadsorbed cadmium on cell surface
Control	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
0.6	0.469 ± 0.090	0.120 ± 0.015
3	1.895 ± 0.401	0.450 ± 0.026
6	2.318 ± 0.403	1.259 ± 0.115
15	1.667 ± 0.386	1.005 ± 0.187
30	1.689 ± 0.302	1.663 ± 0.379
45	1.383 ± 0.204	2.085 ± 0.401

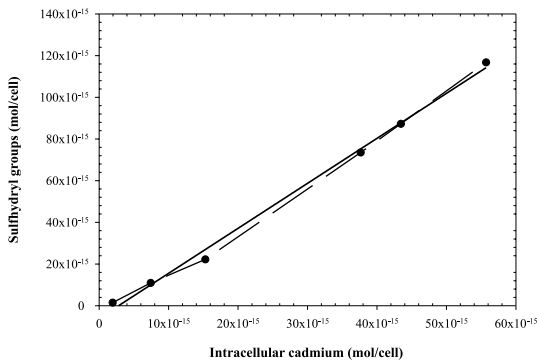


Fig. 1. Concentration of sulfhydryl groups in *T. suecica* cells as a function of the concentration of intracellular cadmium on the sixth day of culture.

4. Discussion

Cadmium is one of the most toxic metals with no described biological function. This metal can produce serious hazards to aquatic organisms, including microalgae. *T. suecica* growth was inhibited in cultures exposed to cadmium. However, the effective concentration value (EC50) for this microalga was 7.9 mg Cd/l after six days of metal exposure under these culture conditions. The cease-growth only happened at cadmium concentrations of 15 mg/l or higher.

Cadmium uptake by the microalgae *T. suecica* followed an initial rapid phase of uptaking during the first days of culture, reached a maximum and thereafter, there was a decrease or stabilization of the amount of total removed cadmium. Jennings and Rainbow (1979), Fernández-Leborans and Novillo (1996) and Torres et al. (1998) reported a similar pattern in *Dunaliella tertiolecta*, *Olisthodiscus luteus* and *Phaeodactylum tricornutum*, respectively. Total and intracellular cadmium removed per liter of medium in 6 mg/l cultures after six days of exposure was higher than in the rest of cultures. This concentration was close to the EC50 value obtained in this assay. This is the highest cadmium concentration in which significant cell growth was observed, in spite of the toxic effect of cadmium, allowing the removal of

more metal per liter of culture. The microalga growth depends on cadmium concentration in the medium, at lower cadmium concentrations the toxic effect of this metal is lower. In cultures that can reach a higher cell density the amount of cadmium removed per cell decreased as the number of cells increased. This did not occur in cultures with the higher cadmium concentrations assayed (15, 30 and 45 mg/l). Practically no growth was observed in these cultures and the amount of cadmium per cell increased. A solution to removing more metal in cultures with highest concentrations would be to increase cellular biomass. Hamdy (2000) reported the effect of biomass weight on the metal uptake of different cations. They observed that cadmium removed increased when biomass of the alga *Laurencia obtusa* increased.

Since the addition of cadmium to cultures of *T. suecica*, this metal appeared bound to the cell surface. The cell wall supposes a first barrier in the uptake of the metal and plays an important role in tolerance processes to metal toxicity. This cellular structure has a common composition of carbohydrates and proteins with which the metals could react. Macfie and Welbourn (2000) reported that total amount of cadmium uptaken by a walled-strain of *Chlamydomonas reinhardtii* was greater than the wall-less strain after 24 h.

Microalgae can protect themselves against metals toxicity. Different reports have shown that exclusion mechanisms and cadmium adsorption to cell surfaces seem not to be the main tolerance mechanism to cadmium. *Euglena gracilis* chelated and accumulated the higher amount of cadmium into the cells (Albergoni et al., 1980). In the same way, Carr et al. (1998) observed that *Chlorella vulgaris* accumulated the highest proportion of cadmium intracellularly. Cadmium toxicity to cellular metabolism provokes the reduction of cadmium uptake in *T. suecica* cells, and the percentage of cadmium adsorbed to cell surfaces in cultures with the highest cadmium concentrations increased, so, in the culture with the higher cadmium concentration (45 mg/l) 60.1% of the total cadmium removed was bioadsorbed. However, even in these cultures with 45 mg Cd/l a high percentage of cadmium was bioaccumulated (39.9%). Therefore, *T. suecica* mainly seems to use an internal

detoxification mechanism. A common response of microalgae upon exposure to cadmium is the synthesis of intracellular metal-binding peptides that may function in detoxification of this metal. These peptides are included in the class III metallothioneins group. Cadmium is bound to –SH groups of these molecules (Gekeler et al., 1988; Kaplan et al., 1995; Knauer et al., 1998). The increase of intracellular cadmium in *T. suecica* was in relation with sulfhydryl groups. Moreover, the ratio between the amount of sulfhydryl groups and intracellular cadmium was always close to 2 (Fig. 1) in all cadmium concentrations assayed. In a previous study it was observed that *T. suecica* synthesized class III metallothioneins in cultures with a cadmium concentration of 6 mg/l. Metal analysis showed that about 87% of the accumulated cadmium was bound by these class III metallothioneins (Pérez-Rama et al., 2001). In our assay, the concentration of sulfhydryl groups increased as cadmium increased in the medium, even in the higher cadmium concentrations the sulfhydryl groups increased all days of culture. This indicates that at these concentrations the cells are alive, and that although no growth was observed, the cells synthesized more sulfhydryl groups to tolerate the toxic effect of cadmium. Under these conditions cells can continue accumulating cadmium intracellularly in all the cultures, even in those exposed to the higher cadmium concentrations.

T. suecica was found to have good accumulation properties for cadmium. The presence of a significant amount of this metal in its cells and the high tolerance to this metal suggested the possibility of using this microalgae in bioremediation processes in seawater polluted with cadmium. Matsunaga et al. (1999) tested 24 strains of marine microalgae for their ability for cadmium removal and they found that the marine green microalga *Chlorella* sp. NKG16014 showed the highest removal of cadmium with 48.7%, when this microalga was exposed to 50 μ M cadmium (5.62 mg/l) after two weeks and with a initial cell density of 5×10^7 cells/ml. In our work with *T. suecica*, this microalga removed 59.6% of cadmium when it was exposed to 6 mg/l after only six days and this percentage increased as cadmium decreased in the medium (Table 1); the initial cell density used was only 25×10^4 cells/ml, however it is important to take into account that *T. suecica* cells are larger than those of *Chlorella* sp., this fact would increase the efficiency of the removal process. Cadmium concentrations up to 6 mg/l (exactly, up to the EC50 value: 7.9 mg/l) and with an initial cell density of 25×10^4 cells/ml living microalgal cells of *T. suecica* could act as an effective system for cadmium removal.

There has been little commercial exploitation of microalgal biosorption for metal removal or recovery processes. Both living and dead biomass can be used for metal removal. Non-living biomass has the advantage that it can be regenerated for multiple uses, but the

metal is not uptaken into cells, since metals are adsorbed only at the algal surface (Fehrmann and Pohl, 1993; Torres et al., 1998). This can be a disadvantage because different reports (Matsunaga et al., 1999) and our work with *T. suecica* indicate that intracellular cadmium levels are higher than the bioadsorbed. This indicates that living biomass of these microalgal cells would be more effective for cadmium removal than non-living biomass. The feasibility of using living algae in exposed, open, water bodies for wastewater treatment has been investigated by a number of workers (Volesky, 1990).

Acknowledgements

This work was carried out with the support of the Plan Nacional de I + D (Ref: REM 2000-0458HIB). M. Pérez-Rama holds a Fellowship Award from the Universidade da Coruña. We thank Servicios Generales de Apoyo a la Investigación from Universidade da Coruña, and especially to Alicia Cantarero for their assistance in ICP analysis.

References

- Albergoni, V., Piccini, E., Coppelotti, O., 1980. Response to heavy metals in organisms-I. Excretion and accumulation of physiological and nonphysiological metals in *Euglena gracilis*. Comp. Biochem. Physiol. C 67, 121–127.
- Carr, H.P., Cariño, F.A., Yang, M.S., Wong, M.H., 1998. Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 433–440.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J., 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. Aquaculture 53, 101–113.
- Fehrmann, C., Pohl, P., 1993. Cadmium adsorption by the non-living biomass of microalgal grown in axenic mass culture. J. Appl. Phycol. 5, 555–562.
- Fernández-Leborans, G., Novillo, A., 1996. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae). Water Res. 30 (1), 57–62.
- Finney, D.J., 1964. Probit Analysis. Cambridge University Press, London, UK.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150, 197–202.
- Hamdy, A.A., 2000. Biosorption of heavy metals by marine algae. Curr. Microbiol. 41, 232–238.
- Jennings, J.R., Rainbow, P.S., 1979. Accumulation of cadmium by *Dunaliella tertiolecta* Butcher. J. Plankton Res. 1, 67–74.
- Kaplan, D., Heimer, Y.M., Abeliovich, A., Goldsbrough, P.B., 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. Plant Sci. 109, 129–137.
- Knauer, K., Ahner, B., Bin Xue, H., Sigg, L., 1998. Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 17 (12), 2444–2452.
- Kneer, R., Zenk, M.H., 1992. Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metals poisoning. Phytochemistry 31 (8), 2663–2667.

- Macfie, S.M., Welbourn, P.M., 2000. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413–419.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A., 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *J. Biotechnol.* 70, 33–38.
- Mislin, H., Ravera, O., 1986. In: *Cadmium in the Environment*, vol. 50. Birkhäuser Verlag Basel, Basel, Switzerland.
- Pérez-Rama, M., Herrero, L.C., Abalde, A.J., Torres, E., 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kytlin) Butch. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (9), 2061–2066.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56, 99–151.
- Stauber, J.L., Florence, T.M., 1985. The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.* 6, 297–305.
- 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. *Biores. Technol.* 63, 213–220.
- Volesky, B., 1990. *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vymazal, J., 1987. Toxicity and accumulation of cadmium with respect of algae and cyanobacteria: a review. *Tox. Assess.* 2, 387–415.

Mónica Perez-Rama
Enrique Torres Vaamonde
Julio Abalde Alonso

Laboratorio de Microbiología,
Facultad de Ciencias,
Universidade da Coruña,
La Coruña, Spain

Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane

A new method to improve the analysis of phytochelatins and their precursors (cysteine, γ -Glu-Cys, and glutathione) derivatized with monobromobimane (mBrB) in complex biological samples by capillary zone electrophoresis is described. The effects of the background electrolyte pH, concentration, and different organic additives (acetonitrile, methanol, and trifluoroethanol) on the separation were studied to achieve optimum resolution and number of theoretical plates of the analyzed compounds in the electropherograms. Optimum separation of the thiol peptides was obtained with 150 mM phosphate buffer at pH 1.60. Separation efficiency was improved when 2.5% v/v methanol was added to the background electrolyte. The electrophoretic conditions were 13 kV and capillary dimensions with 30 cm length from the inlet to the detector (38 cm total length) and 50 μ m inner diameter. The injection was by pressure at 50 mbar for 17 s. Under these conditions, the separation between desglycyl-peptides and phytochelatins was also achieved. We also describe the optimum conditions for the derivatization of biological samples with mBrB to increase electrophoretic sensitivity and number of theoretical plates. The improved method was shown to be simple, reproducible, selective, and accurate in measuring thiol peptides in complex biological samples, the detection limit being 2.5 μ M glutathione at a wavelength of 390 nm.

Keywords: Capillary zone electrophoresis / Glutathione / Monobromobimane / Phytochelatins / Thiols
DOI 10.1002/elps.200406138

1 Introduction

Organisms have developed different mechanisms for metal tolerance. Phytochelatins or class III metallothioneins are molecules that appear when certain organisms, such as plants, fungi, and algae, are exposed to metals [1–3]. Phytochelatins are oligo- and polypeptides with the amino acid structure $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, where $n = 2$ –11. Some species, instead of the amino acid Gly, present another amino acid as Glu, Ser, or β -Ala. In other species, the terminal amino acid is not present [4]. The functions of these peptides are detoxification of metals, binding these elements to the thiol group of Cys in an innocuous form,

Correspondence: Dr. Enrique Torres Vaamonde, Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Alejandro de La Sota, no 1, E-15008 La Coruña, Spain
E-mail: torres@udc.es
Fax: +34-981-167065

Abbreviations: DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride; γ -EC, γ -Glu-Cys; $(\gamma$ -EC) $_n$, $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$, desglycyl-phytochelatins with n Glu-Cys subunits; $(\gamma$ -EC) $_n$ G, $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, phytochelatins with n Glu-Cys subunits; GSH, glutathione, γ -Glu-Cys-Gly; mBrB, monobromobimane

or participate in the mechanisms of regulation of these elements in biological systems [5]. However, these functions are not fully understood.

To better understand the role of these molecules in the metabolism of metals in these organisms, it is essential to analyze them quickly and efficiently. The classical technique for analysis of phytochelatins is reverse-phase HPLC. The relatively strong absorption of peptides in the short wavelength UV region (200–220 nm) provides a universal detection method, but there is a marked lack of selectivity. Therefore, additional steps to purify the sample prior to analysis are needed. However, the derivatization with a specific chromogenic or fluorogenic compound provides better selectivity in the detection process. In the case of phytochelatins, derivatization with monobromobimane (mBrB) prior to separation with HPLC [6–8] or post-column derivatization with Ellman's reagent [3, 9–11] provides the desired selectivity for the analysis of these molecules. These compounds react with the thiol group to form labeled molecules that allow their detection at a specific wavelength or by fluorescence. Under these conditions, these peptides can be analyzed without the need to first purify the biological sample. Therefore, the

general development, characterization, and application of procedures involving mBrB to label thiol compounds have been reported previously in HPLC analysis [12–14]. HPLC methodology was used in the early characterization of phytochelatin peptides and is still in use for the detection and quantification of these compounds.

Capillary zone electrophoresis (CZE) is the most universal and most frequently used electroseparation technique for qualitative and quantitative analysis of peptides [15–17]. For this reason, this technique is also a useful alternative for the analysis of peptides containing thiol groups. CZE offers several advantages over HPLC, including simple instrumentation, small amounts of reagents, the ability to process very small samples, and shorter run times. In the last years, new applications of CZE to the analysis of peptides have been published, but few papers report the successful separation of phytochelatins by CZE. Previous works [18, 19] reported the detection of these peptides without any previous thiol labeling. As in HPLC, intrinsic to the determination of underivatized thiols is an inherent lack of selectivity. This is the reason why previous purification steps by different techniques, such as gel-filtration chromatography, are also required for phytochelatin detection. These steps considerably prolong the total analysis time. This problem is alleviated by means of derivatization with different specific reagents before being separated by CZE. Sutter *et al.* [20] used on-line derivatization of thiol-peptides with *N*-ethylmaleimide. Kubota *et al.* [21] used 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole for labeling phytochelatins prior to the separation of these molecules by CZE. Mounicou *et al.* [22] developed another alternative technique for the determination of phytochelatins without derivatization by capillary electrophoresis. In the work of these authors, capillary electrophoresis was coupled with electrospray-mass spectrometry, which allows a structural characterization of these molecules.

Probably, mBrB is one of the most used compounds for labeling phytochelatins and other thiols, but to date there exist no data on its use to label phytochelatins prior to the separation by a CZE technique. The mBrB derivatization is sensitive and specific [23]. Taking into account the advantage of the specificity of mBrB for molecules with thiol groups and the higher number of theoretical plates of capillary electrophoresis, these can be combined to develop a procedure that allows a rapid and adequate analysis of phytochelatins and other thiol molecules. The aim of this work was to develop a simple and sensitive method to detect and measure phytochelatins and other thiol-containing molecules derivatized with mBrB in crude extracts of biological samples using CZE.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals used were of the highest purity available. *Ortho*-phosphoric acid (H_3PO_4), citric acid ($C_6H_8O_7$), boric acid (H_3BO_3), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), 5-sulfosalicylic acid 2-hydrate ($C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$), mBrB ($C_{10}H_{11}N_2O_2Br$), 2,2,2,-trifluoroethanol ($C_2H_3F_3O$), sodium borohydride ($NaBH_4$), 2-mercaptoethanol (C_2H_6OS), diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride (DTPA) ($C_{14}H_{19}N_3O_8$), Cys ($C_3H_7NO_2S$), γ -Glu-Cys ($C_8H_{14}N_2O_5S$), and glutathione (GSH) ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade acetonitrile and methanol were from Scharlau (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain). Filters were obtained from Millipore (Millipore Ibérica, Madrid, Spain). The different reagents and buffers were prepared with water obtained from a Milli-Q system. Phytochelatin standards were a kind gift from Dr. Zenk (University of Munich).

2.2 Capillary electrophoresis conditions

The electrophoretic analysis was performed in an HP^{3D}CE Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode array detector. The electropherograms were analyzed with the Agilent ChemStation Software (Agilent Technologies). Detection was set at a wavelength of 390 nm. The capillary temperature was maintained at 25°C. Uncoated fused-silica capillaries (Composite Metal Servicesm Hallow, UK) with 25 and 30 cm effective lengths (33 and 38 cm total lengths), 50 μ m ID and 375 μ m OD were used for the method. Phosphate buffer was used as background electrolyte to study the effect of pH on the separation. The phosphoric acid was titrated with 1 M NaOH to obtain a pH from 1.50 to 1.75. Different concentrations (150, 170, 200 nM) of phosphate and citrate at optimum pH for the separation were assayed. Citric acid was titrated to the adequate pH with 1 M HCl. Different concentrations of acetonitrile, methanol or trifluoroethanol, dissolved in the background electrolyte and used as organic modifier, were also assayed. Comparative separations were run at 12 kV and with a capillary with 30 cm length. All buffers were passed through a 0.22 μ m nitrocellulose filter and degassed before use. Prior to the runs, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH solution, distilled water, and then conditioned with the background electrolyte. The protocol for each sample run consisted of a 3 min prerinse with the background electrolyte followed by sample injection. Samples were introduced into the capillary by pressure at 50 mbar. For the assays of sample injection volume, different times of injection were used: 15, 17, 20, 25, and 30 s. Each run was repeated 6 times. The number of theoretical

plates and resolution was calculated by software. Linearity in a graphic of current vs. voltage applied to the selected background electrolyte (Ohm's law plot) was used to select the suitable voltage. Different voltages (1–20 kV) were applied to the background electrolyte and the current was registered. A graphical representation with these two parameters was performed. The maximum voltage was indicated by the point at which nonlinearity occurs.

2.3 Biological samples

Biological samples of a marine microalga were used to develop this procedure. The marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch was cultured in natural seawater enriched with inorganic nutrients without EDTA and Tris [24]. Cultures were grown in glass bottles (Pyrex) with natural sterile air at a flow rate of 10 L/min. They were maintained at $18 \pm 1^\circ\text{C}$ and $68 \mu\text{Einsteins/m}^2/\text{s}$, with a dark:light cycle of 12:12 h. Initial cell density was 25×10^4 cells/mL. Cadmium was the metal used for the induction of phytochelatin. The marine microalga was exposed to 8 mg/L of this metal, added to the culture medium as CdCl_2 . After 7 days culture, cells exposed to cadmium were collected by centrifugation ($12\,000 \times g$ for 10 min) and washed with metal-free seawater. Samples were stored at -20°C until analysis of phytochelatin.

2.4 Extraction and derivatization of phytochelatin in biological samples using mBrB

The derivatization procedure was adapted from Rijstenbil *et al.* [25]. Frozen samples were resuspended in 0.1 M HCl. In addition, 0.05, 0.1 and 0.2 M sulfosalicylic acid was assayed as possible substitute of HCl for extraction of phytochelatin from cells. Cells were homogenized with an ultrasonic cell disrupter for 3 min at $14 \mu\text{m}$. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was collected and 500 μL was added to 500 μL of a freshly prepared derivatization buffer. This buffer was composed of 1 M borate buffer (pH 9), 1 mM DTPA, and different concentrations of a reducing agent. 2-Mercaptoethanol in concentrations varying from 1 to 10 mM and concentrations of NaBH_4 from 0.05 to 5 mg/mL were assayed as reducing agents. Once the sample was mixed with derivatization buffer, 8 μL 0.1 M mBrB dissolved in acetonitrile was added and incubated at room temperature in Eppendorf tubes for 1 h in darkness. Samples were centrifuged at $12\,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Finally, 600 μL supernatant was transferred to CZE vials for injection. Standards of phytochelatin, Cys, γ -Glu-Cys, and GSH, derivatized in the same way than biological samples, were used to identify the different peaks.

3 Results

The optimum conditions needed for the separation of samples derivatized with mBrB during capillary electrophoresis were examined. Buffer electrolyte and sample matrix were considered to obtain an adequate resolution and separation efficiency of peaks in electropherograms.

3.1 Optimization of the capillary electrophoretic conditions

Different pHs of 150 mM phosphoric acid were assayed as running buffer: 1.55, 1.60, 1.65, and 1.75 (Fig. 1). The shortest migration time was obtained with the lowest pH, but the peaks were not well-separated. In this case, Cys and an unidentified thiol comigrated together. GSH and γ -Glu-Cys were not separated. Phytochelatin and their respective desglycyl-peptides also comigrated together. When the pH was increased, Cys, γ -Glu-Cys, and GSH showed a good separation and desglycyl-peptides were visible. The best separation was obtained with pH 1.60, allowing to resolve the peaks of phytochelatin and their respective desglycyl-peptides that comigrated as a single peak. Resolution values and the number of theoretical plates increased with respect to the lowest pH assayed. With pH 1.75, although the resolutions of Cys, γ -Glu-Cys, and GSH were improved, the number of theoretical plates decreased. Migration times and their standard deviation obtained from six runs are reported in Table 1.

Different concentrations of phosphate and citrate at pH 1.60 were also assayed as separation buffers (Fig. 2). The concentrations used were 150, 170, and 200 mM. A voltage of 12 kV was also applied. Although the current was relatively low (55, 60, and 65 μA , respectively) and the migration time was longer with citrate, sensitivity and resolution were higher with phosphate buffer. Smaller thiol peptides (γ -Glu-Cys and GSH) and the amino acid Cys were not separated with citrate and comigrated as a single peak, the phytochelatin peaks were broad and not defined, and desglycyl peptides did not appear. Citric acid without pH titration to 1.60 was also assayed at the same concentrations than phosphate buffer (150, 170, and 200 mM). With this buffer, sensitivity and resolution were lower than with phosphate buffer, although, desglycyl peptides appeared and phytochelatin peaks were sharp (electropherograms not shown). Therefore, phosphate was chosen as optimum running buffer. Adequate separation of Cys, γ -Glu-Cys, GSH, and phytochelatin was obtained with a concentration of 150 mM phosphate pH 1.60 (Fig. 2, 1a). When the concentration of background electrolyte was increased, the migration time increased slightly but resolution decreased. Raising the background electrolyte concentration to 200 mM phos-

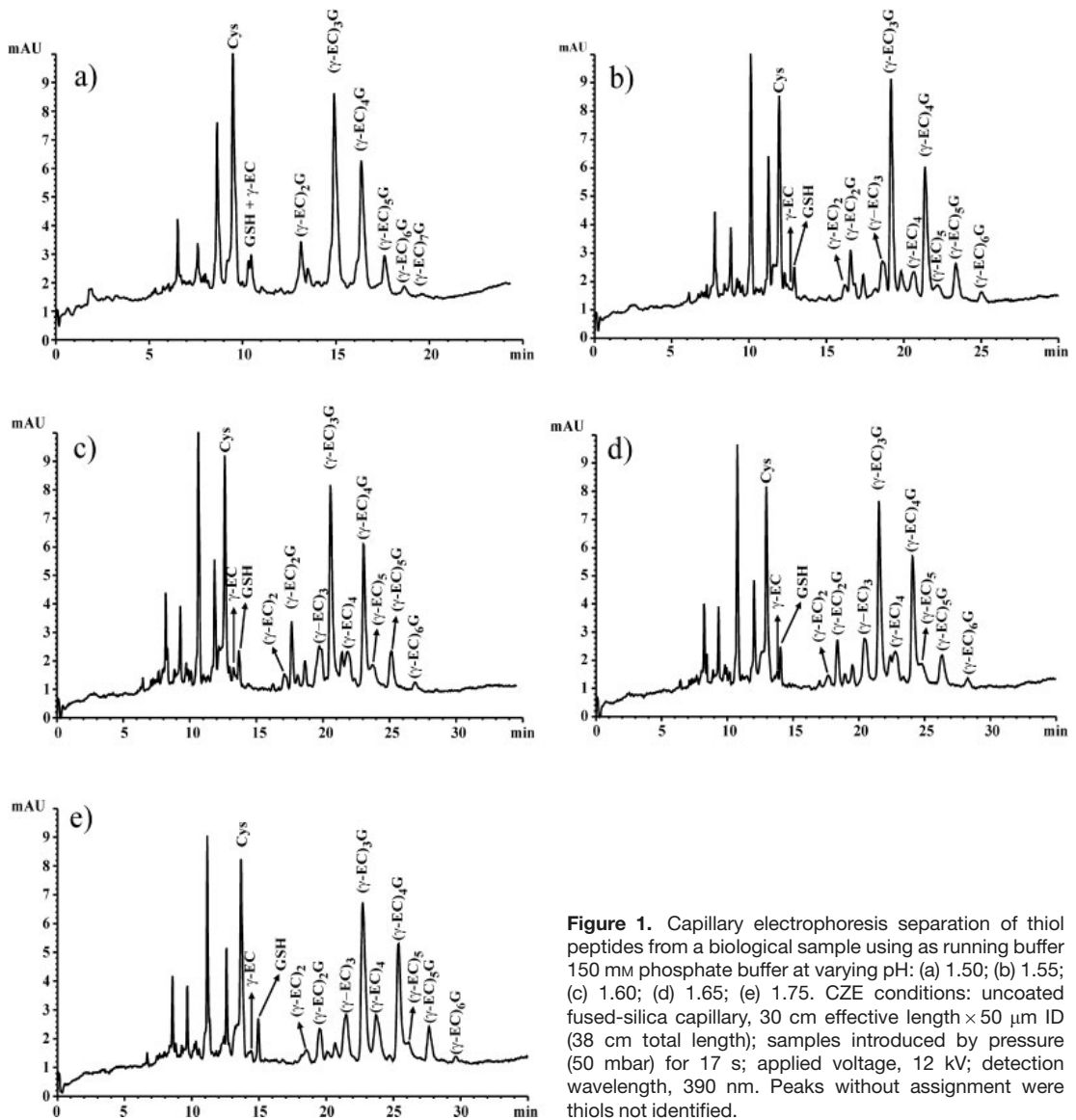


Figure 1. Capillary electrophoresis separation of thiol peptides from a biological sample using as running buffer 150 mM phosphate buffer at varying pH: (a) 1.50; (b) 1.55; (c) 1.60; (d) 1.65; (e) 1.75. CZE conditions: uncoated fused-silica capillary, 30 cm effective length \times 50 μ m ID (38 cm total length); samples introduced by pressure (50 mbar) for 17 s; applied voltage, 12 kV; detection wavelength, 390 nm. Peaks without assignment were thiols not identified.

phate resulted in a considerable current increase and band-broadening, which produced a decrease in the number of theoretical plates of the peaks (Fig. 2, 1c).

Organic modifiers were also assayed to optimize the background electrolyte (electropherograms not shown). The organic modifiers were methanol, acetonitrile and trifluoroethanol. These modifiers were added to the running buffer at concentrations of 2.5, 5, and 10% v/v. The addi-

tion of these modifiers produced a decrease in conductivity and an increase in migration time. The resolution and the number of theoretical plates did not change when a concentration of 2.5% v/v acetonitrile and trifluoroethanol was added, although $(\gamma$ -EC)₄ (desglycyl-phytochelatin with 4 Glu-Cys subunits) comigrated with another unidentified thiol when acetonitrile was added. When the concentrations of acetonitrile and trifluoroethanol were increased to 10% v/v, γ -Glu-Cys and

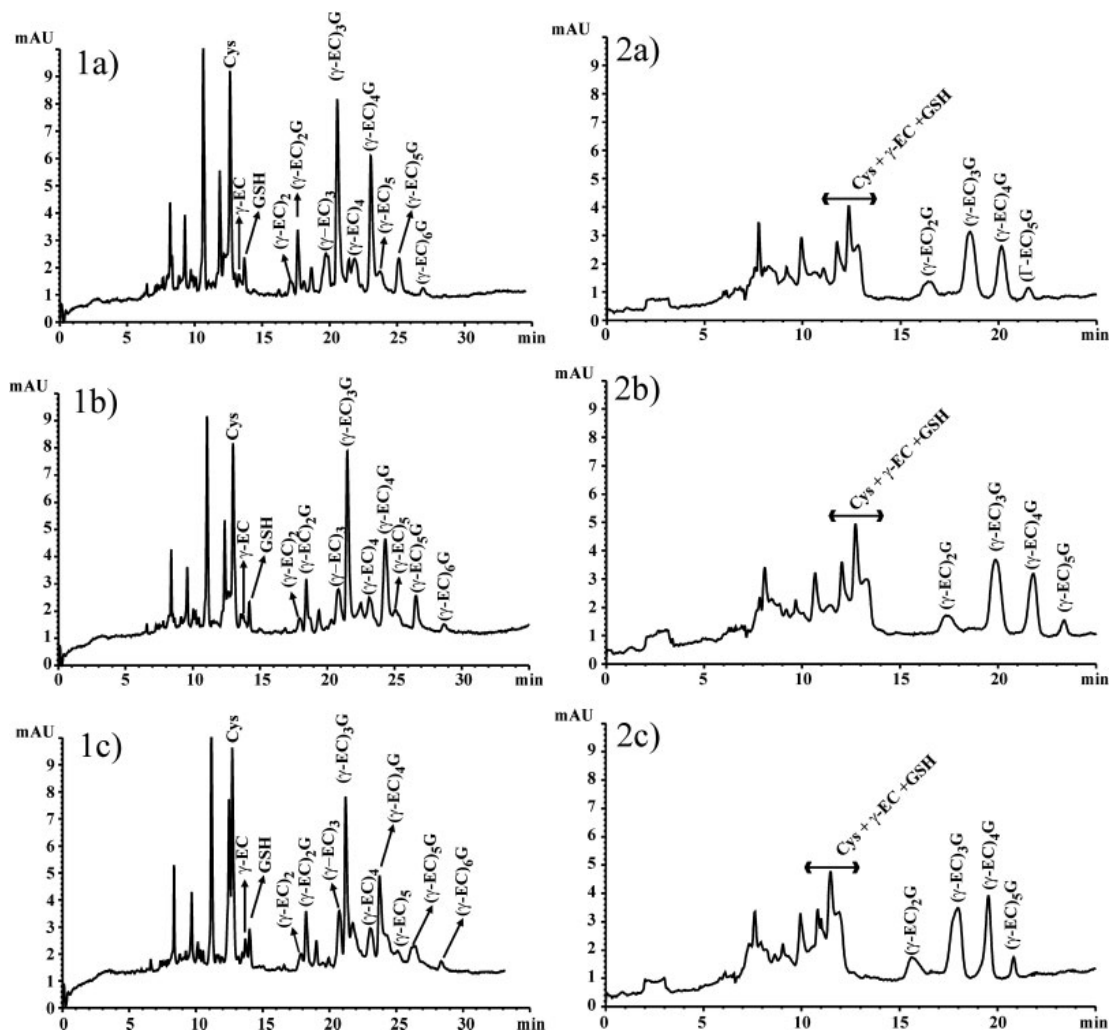


Figure 2. Separation of thiol peptides using (1) phosphate buffer and (2) citrate buffer as background electrolyte, both at pH 1.60, at different concentrations: (a) 150 mM; (b) 170 mM; (c) 200 mM. Instrument conditions were the same as in Fig. 1. Peaks without assignment were thiols not identified.

Cys comigrated with other unidentified thiol molecules and both separation efficiency and resolution decreased. Addition of 2.5% v/v methanol resulted in a slight increase in resolution and the number of theoretical plates. With the higher concentrations of methanol, resolution did not change significantly but migration time increased. The best results were obtained with a running buffer of 150 mM H_3PO_4 , pH 1.60, and 2.5% v/v methanol. The Ohm's law plot was used for the determination of the maximum voltage that can be utilized with this background electrolyte. Linearity in the graphical representation of current vs.

voltage applied (graphic not shown) was lost when a voltage of 14 kV was applied to this background electrolyte. The number of theoretical plates, resolution of peaks, and migration times were slightly improved when a voltage of 13 kV was applied. The use of a shorter capillary also means a shorter analysis time. Initial separations were performed in a capillary of 30 cm length from inlet to detector. When the capillary was shortened to 25 cm, the migration time decreased but the number of theoretical plates decreased considerably, even with a voltage of 12 kV.

Table 1. Migration time, with their respective standard deviation, of thiol peptides and the amino acid Cys on increasing the running buffer pH and concentration

	Cys	γ -Glu-Cys	GSH	(γ -EC) ₂ G	(γ -EC) ₃ G	(γ -EC) ₄ G	(γ -EC) ₅ G
150 mM phosphate buffer							
pH 1.50	9.48 ± 0.14	10.31 ± 0.10	10.46 ± 0.15	13.13 ± 0.21	14.91 ± 0.16	16.35 ± 0.13	17.59 ± 0.21
pH 1.55	11.94 ± 0.15	12.29 ± 0.13	12.92 ± 0.21	16.56 ± 0.17	19.17 ± 0.22	21.38 ± 0.27	23.37 ± 0.24
pH 1.60	12.61 ± 0.18	13.28 ± 0.19	13.69 ± 0.16	17.65 ± 0.23	20.56 ± 0.25	23.05 ± 0.33	25.13 ± 0.33
pH 1.65	12.96 ± 0.14	13.80 ± 0.11	14.04 ± 0.17	18.37 ± 0.23	21.52 ± 0.28	24.09 ± 0.29	26.32 ± 0.36
pH 1.75	13.67 ± 0.19	14.53 ± 0.25	14.95 ± 0.21	19.52 ± 0.19	22.71 ± 0.28	25.37 ± 0.20	27.65 ± 0.24
Phosphate buffer pH 1.60							
150 mM	12.61 ± 0.09	13.28 ± 0.16	13.69 ± 0.17	17.65 ± 0.25	20.56 ± 0.19	23.05 ± 0.29	25.13 ± 0.31
170 mM	12.99 ± 0.08	13.72 ± 0.13	14.20 ± 0.19	18.43 ± 0.17	21.48 ± 0.24	24.31 ± 0.31	26.59 ± 0.36
200 mM	12.72 ± 0.11	13.70 ± 0.15	14.02 ± 0.23	18.24 ± 0.26	21.20 ± 0.31	23.75 ± 0.33	26.40 ± 0.34

Values are presented as means ± SD. The number of determinations performed for assessment of means and standard deviation was 6.

Different injection volumes were assayed to achieve a higher sensitivity without losing the efficiency of the method. The injection of the sample was performed by pressure at 50 mbar for 15, 17, 20, 25, and 30 s. The sample introduction into the capillary for 20–30 s provoked a loss of resolution that increased with injection time. Also, new peaks of phytochelatin (with $n > 6$) that could be in low concentrations did not appear. With 15 s injection, sensitivity of peaks decreased and peaks of (γ -EC)₆G were not detected. Therefore, sample injection was kept by pressure at 50 mbar for 17 s.

3.2 Optimization of sample preparation from biological material: extraction and derivatization of phytochelatin

Several buffers have been assayed in this work for the extraction and derivatization of phytochelatin and other important thiols using mBrB to achieve an adequate capillary electrophoretic separation with the method developed. The background electrolyte and the electrophoretic conditions used to optimize the sample preparation were those obtained from the optimization procedure previously developed: 150 mM H₃PO₄, pH 1.60, and 2.5% methanol v/v, 13 kV, capillary of 30 cm length from inlet to detector and injection with pressure at 50 mbar for 17 s.

Sulfosalicylic acid concentrations of 0.05, 0.1, and 0.2 M, and 0.1 M HCl were used for phytochelatin extraction (Fig. 3). Sulfosalicylic acid drastically affected the separation by CZE. With sulfosalicylic acid concentrations of 0.1 M and 0.2 M, Cys and γ -Glu-Cys were not separated, and although (γ -EC)₂₋₅G was discerned, sen-

sitivity was low, peaks were broad, and desglycyl peptides comigrated with phytochelatin. At a concentration of 0.05 M, Cys, γ -Glu-Cys, and GSH were separated and resolution and number of theoretical plates were considerably improved but phytochelatin peaks were still too broad and desglycyl peptides migrated close to phytochelatin. However, HCl produced appropriate peaks which were clearly separated and identified (Fig. 3).

Different concentrations of NaBH₄ or 2-mercaptoethanol were added to the buffer to avoid oxidation of the thiol groups (Fig. 4). However, 2-mercaptoethanol interfered in the analysis, giving poor results. When 1, 5, and 10 mM 2-mercaptoethanol was used, peaks corresponding to γ -EC, GSH, and (γ -EC)₂₋₄G were only slightly higher than the baseline (Fig. 4c). Three NaBH₄ concentrations were assayed: 0.05, 1.5, and 5 mg/mL, along with a control without a reducing agent (Figs. 4a, b). Unlike with 2-mercaptoethanol, peaks were very high with NaBH₄ and all compounds were clearly detected. The higher NaBH₄ concentration affected the separation of peaks because desglycyl peptides and γ -Glu-Cys comigrated with other peaks and the number of theoretical plates decreased (Fig. 4, b1). The lower concentration of NaBH₄ (0.05 mg/mL) and the control evidenced a sharp decrease in the height of the peaks (Fig. 4, a and b3). The best results were obtained with a concentration of 1.5 mg/L NaBH₄.

3.3 Characteristics of the method developed

The linearity and the concentration limit of detection of the method were checked by analyzing GSH solutions of different concentrations (0.5–100 μ M). After the derivatization process and the analysis, the peak area *versus* con-

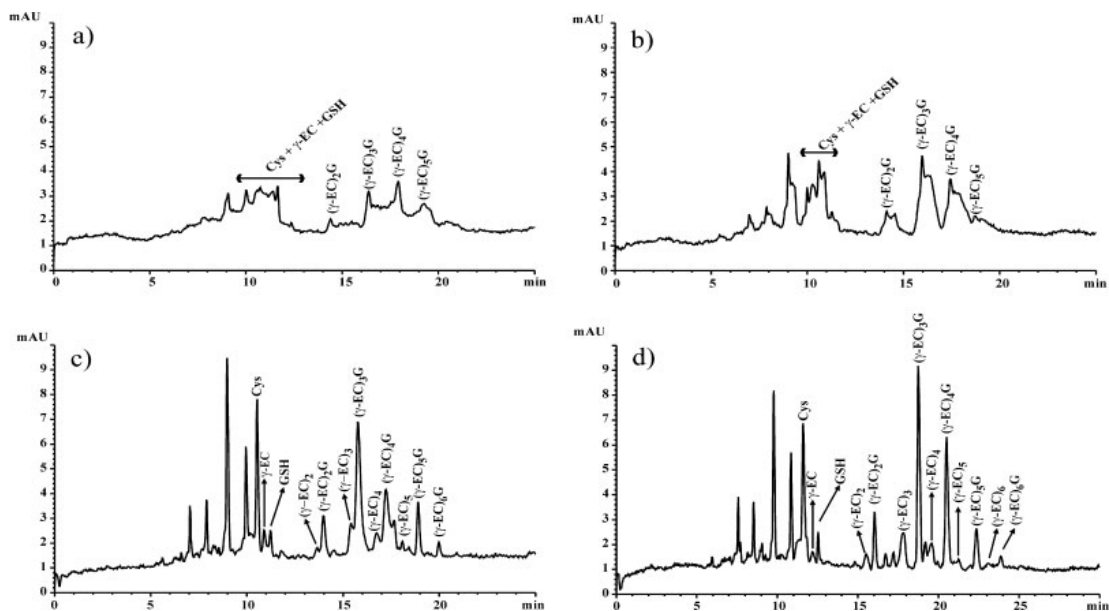


Figure 3. Effect of sulfosalicylic acid and HCl on the extraction of thiols. Sulfosalicylic acid: (a) 0.2 M; (b) 0.1 M; (c) 0.05 M. HCl: (d) 0.1 M. Running buffer, 150 mM H_3PO_4 , pH 1.60, and 2.5% methanol v/v. CZE conditions: uncoated fused-silica capillary, 30 cm effective length \times 50 μm ID (38 cm total length); samples introduced by pressure (50 mbar) for 17 s; applied voltage, 13 kV; detection wavelength, 390 nm. Peaks without assignment were thiols not identified.

centration was linear ($R^2 = 0.997$) in this concentration range. An amount of 2.5 μM standard GSH was detected. Table 2 shows the number of theoretical plates and resolution of phytochelatin and other thiols obtained with the method developed.

Table 2. Number of theoretical plates and resolution values obtained for phytochelatin and other thiols in the electropherogram of the method developed

	Number of theoretical plates	Resolution
Cys	26 422 \pm 1587	3.03 \pm 0.15
γ -Glu-Cys	15 266 \pm 2758	1.70 \pm 0.03
GSH	61 181 \pm 2436	1.19 \pm 0.07
(γ -EC) $_2$ G	55 655 \pm 2287	14.72 \pm 0.32
(γ -EC) $_3$ G	62 096 \pm 3421	2.07 \pm 0.15
(γ -EC) $_4$ G	58 944 \pm 2654	1.83 \pm 0.11
(γ -EC) $_5$ G	56 536 \pm 3655	5.19 \pm 0.21
(γ -EC) $_6$ G	90 654 \pm 4445	4.38 \pm 0.27

Running buffer, 150 mM H_3PO_4 , pH 1.60, and 2.5% methanol v/v. CZE conditions: uncoated fused-silica capillary, 30 cm effective length \times 50 μm ID; samples introduced by pressure (50 mbar) for 17 s; applied voltage, 13 kV; detection wavelength, 390 nm

4 Discussion

The presented method permits the separation of thiol peptide phytochelatin and other related thiols derivatized with monobromobimane in complex biological samples without previous purification steps by CZE. This method is a good alternative to other electrophoretic methods for the analysis of these molecules [22, 26]. Sutter *et al.* [20] used on-line derivatization of thiol peptides with *N*-ethylmaleimide. The method was suitable for the simultaneous determination of phytochelatin and their precursor molecules by CZE, increasing the sensitivity compared to underivatized thiols. The authors used standards to perform the analytical method, but once the method was applied to biological samples, differences between the chromatograms of standards and biological samples appeared (phytochelatin peaks were broad and migration times were different). Desglycyl-phytochelatin were not detected with that procedure. Kubota *et al.* [21] used 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole for labeling phytochelatin prior to the separation of these molecules by CZE. Here, desglycyl peptides were detected and the run time was short, however, 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole is considered little specific for labeling thiol groups.

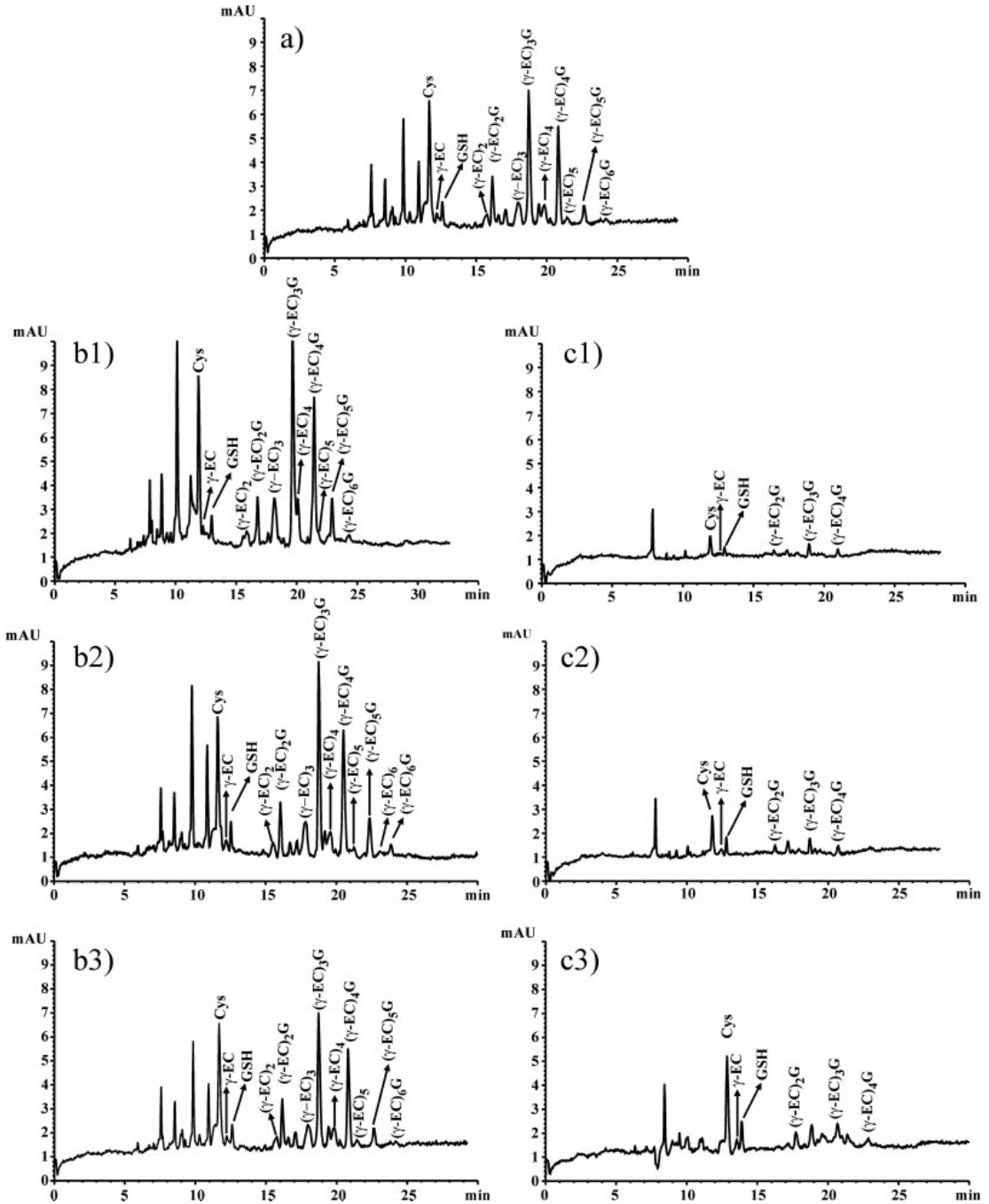


Figure 4. Effect of the reducing agent (2-mercaptoethanol and NaBH₄) and different concentrations on the derivatization process and CZE analysis of thiol peptides. NaBH₄: (b1) 5 mg/mL; (b2) 1.5 mg/mL; (b3) 0.5 mg/mL. 2-Mercaptoethanol: (c1) 10 mM; (c2) 5 mM; (c3) 1 mM; (a) Sample without reducing agent. Running buffer and instrument conditions were the same as in Fig. 3. Peaks without assignment were thiols not identified.

Another compound often used to label thiol groups is mBrB, but to date, separation of mBrB-thiol peptides by CZE was not developed and this separation was achieved only by HPLC. For this reason, it was necessary to optimize a procedure for the separation of these molecules by CZE. In CZE, parameters, such as background electrolyte, ionic strength, electrical field strength, capillary temperature, capillary diameter and length, sample preparation, *etc.*, can affect the efficiency of the separation of the molecules and so, they have to be taken into account to optimize a capillary electrophoresis procedure. The background electrolyte system is the most direct route for the optimization of the separation [27]. This optimization can be achieved using several types of buffers, ionic strengths, additives, such as organic solvents or inorganic salts, and pH modification.

The pH is the most important selectivity factor in electrophoretic separations of ampholytes, such as peptides, because the net charge of the ion is dependent on the pH. In this way, both the charge and peptide size play a major role in determining the electromobility of peptides. In buffers of low pH, electromobility differences between peptides will be determined by the total number of protonated basic residues in the chain and separation will be based on the positive charge density of peptides. Peptide charge is changed most readily by altering the pH of the separation electrolyte.

Previous publications have demonstrated the advantages of acid background electrolytes. Acid pH suppresses the dissociation of silanol groups on the capillary surfaces and allows the separation of peptides with minimum wall interaction. In addition, a very small electroosmotic flow (EOF) is obtained, leading to a higher resolution for cationic peptides, although in many cases the analysis time can be longer [28]. For low-pH buffers, phosphate and citrate are routinely used. Ban *et al.* [27] studied the optimal conditions for separating a mixture of four neuropeptides using citrate and phosphate pH 2.0 as running buffer and obtained a sensitivity 5-fold higher with 100 mM sodium phosphate than with 100 mM citrate. Yang *et al.* [29] used different concentrations and pH of phosphate buffer to resolve structurally related synthetic peptides; the assayed peptides were resolved with 25 mM phosphate buffer, pH 2.0.

One previous work [18] reported on the successful CZE separation of thiol peptides phytochelatins from a crude extract using 150 mM phosphate, pH 3.50, as background electrolyte with migration from the negative to the positive pole at a voltage of 12 kV, but other important thiol peptides were not detected. In the present study, the pH of 150 mM phosphate was decreased to values in a narrow range of 1.50–1.65. As one can see in Fig. 1, even small

changes of the pH had a drastic influence on the resolution of the components. A pH value of 1.60 was the optimum for the separation of phytochelatins, moreover, it allowed the separation of phytochelatins and their respective desglycyl peptides as well as their precursors (GSH, γ -Glu-Cys, and the amino acid Cys) in an mBrB-derivatized biological sample.

In capillary electrophoresis, the concentration of the background electrolyte can be adjusted to enhance the separation performance. However, higher concentrations of 150 mM of phosphate buffer (170 and 200 mM) produced worse results. This effect was due to Joule heat that was not efficiently dissipated and thus provoked an increase in the current and EOF. The use of electrolytes of high ionic strengths requires a well-controlled capillary temperature or the use of lower field strengths with an increase in the analysis times. Lower concentrations than 150 mM phosphate were also assayed, but the separation was insufficient (data not shown) because, although the analysis time was shorter, the peaks were too broad and several important thiols comigrated as one peak.

Once the buffer and its concentration were established, the resolution and the analysis time were considered for improvement. Different modifiers were tested at varying concentrations. The addition of modifiers to the background electrolyte has different effects, depending on the nature of the additive. These cosolvents can improve analyte solubility, detector sensitivity, separation, and resolution and can help to control the EOF. In the presented work, three organic modifiers were assayed: acetonitrile, methanol, and trifluoroethanol. In general, the effect of organic solvents on the electrophoretic mobility is difficult to predict. Only one of the solvents assayed in this work (2.5% v/v methanol) enhanced the performance of the method. With this solvent, the differences in mobility of the analyzed mBrB peptides increased and, therefore, resolution was improved. A background electrolyte composed of 150 mM phosphate pH 1.60 and 2.5% v/v methanol was found to be optimum for the separation. An electropherogram showing the separation of the thiols is demonstrated in Fig. 5.

A simple strategy used to decrease the analysis time is to raise the voltage when the capillary length is not modified, since higher voltages result in shorter analysis times and narrower peaks. However, the ionic strength of a background electrolyte restricts the maximum voltage that can be utilized because the voltage should not be so high that the heat cannot be effectively dissipated. For this reason, the Ohm's law plot was used for the determination of the maximum voltage that can be utilized with the optimum background electrolyte. A voltage of 13 kV was the most suitable for the electrophoretic conditions used in this work.

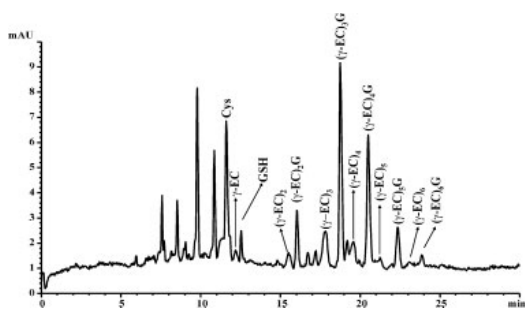


Figure 5. Electropherograms of phytochelatin and related thiol peptides from samples of the marine microalgae *Tetraselmis suecica*. Running buffer, 150 mM H_3PO_4 , pH 1.60, and 2.5% v/v methanol. CZE conditions: uncoated fused-silica capillary, 30 cm effective length \times 50 μm ID (38 cm total length); samples introduced by pressure (50 mbar) for 17 s; applied voltage, 13 kV; detection wavelength, 390 nm. Extraction procedure: 0.1 M HCl and 1.5 mg/mL NaBH_4 . Peaks without assignment were thiols not identified.

One of the most critical points in quantitative analysis is the injection of the sample. The length of the sample plug that is injected is an important parameter [30]. Selecting an appropriate sample volume in CZE is difficult. Low sample volumes offer very high theoretical plates but they yield small detector signals. The sample volume to be injected into the capillary is a trade-off between the number of theoretical plates and sensitivity. For maximum efficiency of the developed method, the smallest volume of injected sample that gave detectable quantities of the solutes was 17 s at 50 mbar pressure.

The influence of sample processing on separation was also examined. Although the sample constitutes a very small portion of the overall volume in the capillary once it is injected, the matrix of the sample has profound effects on the separation by CZE [20, 27, 31]. The results obtained in the present study indicated that both separation and migration times of the examined compounds were influenced by sample composition. Several buffers have been assayed for the extraction and the derivatization of phytochelatin and other important thiols using mBrB to achieve an adequate capillary electrophoretic separation with the method developed.

Acid extraction is necessary to avoid oxidation of thiols and allows the precipitation of proteins and other undesirable molecules that could interfere in the derivatization reaction. In the literature, extraction of nonprotein thiols (phytochelatin and others) is carried out in different acids, such as trichloroacetic acid, sulfosalicylic acid, trifluoroacetic acid, and HCl. Plant tissue and algae are

routinely homogenized in 0.2 M sulfosalicylic acid or 0.1 M HCl to extract phytochelatin [32–35]. The effect on the separation of using these acids was studied in this paper. The results showed that the best acid to extract phytochelatin for the analysis by the procedure developed was 0.1 M HCl. Sample deproteinization with sulfosalicylic acid negatively influenced the separation of the examined compounds during CZE.

After extraction of the phytochelatin, they were derivatized with mBrB. The reactions of mBrB with thiols are pH-dependent and an alkaline buffer has to be used for good derivatization [13]. Under these conditions, a reducing agent must be added to avoid oxidation of the thiol groups. NaBH_4 is the most common reducing agent used in phytochelatin analysis, but 2-mercaptoethanol has also been utilized in several works [36]. From the results presented here, it is concluded that 2-mercaptoethanol interfered the analysis (Fig. 4). The reason for this finding is that most of the mBrB binds to the thiol group of 2-mercaptoethanol, preventing the derivatization of thiols present in the sample. To avoid this problem, a higher mBrB concentration or a smaller 2-mercaptoethanol concentration should be used. This involves an unnecessary loss of reagent or a higher risk of thiol oxidation. Otherwise, assays with NaBH_4 did not raise this problem, and therefore it was selected as more suitable reducing agent. The best concentration was 1.5 mg/L NaBH_4 . In comparison with the lower concentration of NaBH_4 (Fig. 4, b2) or with a control (without reducing agent) (Fig. 4, a) all peaks were separated and a loss of thiol groups due to oxidation was not observed. Therefore, the derivatization process must be taken into account to obtain good results in the analysis of phytochelatin, not only by a CZE procedure. NaBH_4 would be more appropriate as reducing agent to obtain good derivatization efficiency.

Finally, most authors stop the reaction by means of the addition of metanesulfonic acid after the derivatization process. In this work, this was avoided, leaving the sample under alkaline conditions. This is an important aspect because, as a result of using an acid background electrolyte and since the sample has alkaline conditions, stacking is produced (pH-mediated stacking). This procedure allows an increase in both sensitivity and number of theoretical plates.

An amount of 2.5 μM standard GSH was detected with the technique developed. Detection was set at a wavelength of 390 nm because mBrB has a maximum absorbance at this wavelength and other compounds that could be present in the sample do not absorb. Peaks in an electropherogram were not detected at this wavelength when a sample without derivatization was injected. The sensi-

tivity of this technique could be increased by several orders of magnitude using a capillary electrophoretic system equipped with a fluorescence detector since mBrB is also a fluorescent compound. Hart *et al.* [26] performed a method capable of detecting about 1 fmol GSH derivatized with 5-bromomethylfluorescein (5-BMF) using an HPCE-LIF apparatus. Mounicou *et al.* [22] performed detection with electrospray-mass spectrometry allowing a greater selectivity in the detection process of phytochelatins. However, these detection types are rather expensive. The method described in this paper, which employs a commercially available CZE instrumentation with photodiode array detection, is a good alternative to analyze phytochelatins and other related thiols in a rapid, low cost, and selective procedure.

In conclusion, a method to improve the analysis of phytochelatins and other thiol peptides derivatized with mBrB in complex biological samples by CZE was described. The electrophoretic conditions used to optimize the separation were: 150 mM H₃PO₄, pH 1.60, and 2.5% methanol v/v, 13 kV, capillary of 30 cm length from inlet to detector (38 cm total length), 50 μm ID, and 375 μm OD. Injection was done with pressure at 50 mbar for 17 s and the detection wavelength was set to 390 nm. Derivatization of biological samples was also optimized to achieve good sensitivity and efficiency in the analysis. Extraction of thiols with 0.1 M HCl showed the best results to analyze these compounds by the technique developed. In addition, NaBH₄ was more suitable than 2-mercaptoethanol as reducing agent in this procedure. The conditions established in this work allow a rapid, reproducible, and sensitive analysis of phytochelatins and other thiols using a UV detector and of crude extracts of biological samples, avoiding previous complicated purification steps (Fig. 5 and Table 2).

This work was funded by the Plan Nacional de I + D (Ref: REN 2003 – 02414), Spain. The authors wish to thank Prof. Zenk and his co-workers for preparing the phytochelatin standards.

Received July 29, 2004

5 References

- [1] Cobbett, C., Goldsbrough, P., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2002, 53, 159–182.
- [2] Salt, D. E., Rauser, W. E., *Plant Physiol.* 1995, 107, 1293–1301.
- [3] Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H., Zenk, M. H., Miyamoto, K., *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 92, 24–29.
- [4] Rauser, W. E., *Plant Physiol.* 1995, 109, 1141–1149.
- [5] Kaplan, D., Heimer, Y. M., Abeliovich, A., Goldsbrough, P. B., *Plant Sci.* 1995, 109, 129–137.
- [6] Cazale, A. C., Clemens, S., *FEBS Lett.* 2001, 507, 215–219.
- [7] Doring, S., Korhammer, S., Oetken, M., Markert, B., *Fresenius' J. Anal. Chem.* 2000, 366, 316–318.
- [8] Maier, E. A., Matthews, R. D., McDowell, J. A., Walden, R. R., Ahner, B. A., *J. Environ. Qual.* 2003, 32, 1356–1364.
- [9] Maita, Y., Kawaguchi, S., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1989, 43, 394–401.
- [10] Sneller, F. E. C., Noordover, E. C. M., Bookum, W. M. T., Schat, H., Bedaux, J. J. M., Verkleij, J. A. C., *Ecotoxicology* 1999, 8, 167–175.
- [11] Hu, S. X., Lau, K. W. K., Wu, M., *Plant Sci.* 2001, 161, 987–996.
- [12] Fukushima, T., Usui, N., Santa, T., Imai, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1655–1687.
- [13] Kosower, E. M., Kosower, N. S., *Methods Enzymol.* 1995, 251, 133–148.
- [14] Newton, G. L., Dorian, R., Fahey, R. C., *Anal. Biochem.* 1981, 114, 383–387.
- [15] Righetti, P. G., *Biopharm. Drug Dispos.* 2001, 22, 337–351.
- [16] Hearn, M. T. W., *Biologicals* 2001, 29, 159–178.
- [17] Kasicka, V., *Electrophoresis* 2003, 24, 4013–4046.
- [18] Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Abalde, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 775, 339–347.
- [19] Pérez-Rama, M., Herrero, C., Abalde, J., Torres, E., *Environ. Toxicol. Chem.* 2001, 20, 2061–2066.
- [20] Sutter, K., Friebe, S., Krauss, G. J., *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1999, 74, 167–178.
- [21] Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., Maitani, T., *J. Chromatogr.* 1998, 803, 315–320.
- [22] Mounicou, S., Vacchina, V., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., Lobinski, R., *Analyst* 2001, 126, 624–632.
- [23] Sneller, F. E. C., van Heerwaarden, L. M., Koevoets, P. L. M., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J. A. C., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4014–4019.
- [24] Pérez-Rama, M., Abalde, J., Herrero, C., Torres, E., *Biores. Technol.* 2002, 8, 265–270.
- [25] Rijstbil, J. W., Dehairs, F., Ehrlich, R., Wijnholds, J. A., *Aquat. Toxic.* 1998, 42, 187–209.
- [26] Hart, J. J., Welch, R. M., Norvell, W. A., Kochian, L. V., *Electrophoresis* 2002, 23, 81–87.
- [27] Ban, E., Choi, O. K., Chung, W. Y., Park, C. S., Yoo, E. A., Chung, B. C., Yoo, Y. S., *Electrophoresis* 2001, 22, 2173–2178.
- [28] Oda, R. P., Landers, J. P., in: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL 1994, pp. 9–42.
- [29] Yang, Y., Boysen, R. I., Chen, J. I., Keah, H. H., Hearn, M. T., *J. Chromatogr. A* 2003, 1009, 3–14.
- [30] Baker, D. R., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York 1995, pp. 184–186.
- [31] Krivánková, L., Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P., Caslavská, J., Thormann, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 505–517.
- [32] Pawlik-Skowronska, B., *Aquat. Toxicol.* 2003, 62, 155–163.
- [33] Tripathi, R. D., Rai, U. N., Gupta, M., Chandra, P., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996, 56, 505–512.
- [34] Mehra, R. K., Tran, K., Scott, G. W., Mulchandani, P., Saini, S. S., *J. Inorg. Biochem.* 1996, 61, 125–142.
- [35] Rijstbil, J. W., Gerringa, L. J., *Aquat. Toxicol.* 2002, 56, 115–131.
- [36] Pistocchi, R., Mormile, M. A., Guerrini, F., Isani, G., Boni, L., *J. Appl. Phycol.* 2000, 12, 469–477.

COMPOSITION AND PRODUCTION OF THIOL CONSTITUENTS INDUCED BY CADMIUM IN
THE MARINE MICROALGA *TETRASELMIS SUECICA*

MÓNICA PÉREZ-RAMA, ENRIQUE TORRES VAAMONDE*, JULIO ÁBALDE ALONSO

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Alejandro de La Sota, No. 1. 15008. La Coruña, Spain

(Received 12 April 2005; Accepted 27 June 2005)

Abstract—Time course of intracellular levels of different thiols (phytochelatins, desglycyl-phytochelatins, glutathione, γ -glutamylcysteine (γ -Glu-Cys), and cysteine) were studied in the microalga *Tetraselmis suecica* exposed to different cadmium concentrations for eight d. The cadmium concentrations assayed were 3, 7.9, 15, and 30 mg/L. Contents of thiol compounds synthesized by this microalga changed with cadmium concentration and with time of exposure. Cysteine concentrations increased significantly when compared with those of γ -Glu-Cys and glutathione in cultures containing 7.9, 15, and 30 mg/L. The increase in the amount of glutathione was significant only in the cells exposed to the higher cadmium concentrations (15 and 30 mg/L). Nevertheless, in all the cadmium concentrations assayed, γ -Glu-Cys levels were constant. A rapid increase in phytochelatins was observed with increased cadmium concentration in the first days of culture. The type of phytochelatins (number of subunits) was also dependent on the concentration of cadmium. The rate of (γ -Glu-Cys)_n-Gly accumulation was higher than that of other types of phytochelatins throughout the culture in cells exposed to 3, 15 and 30 mg/L. However, in cultures treated with 7.9 mg/L, (γ -Glu-Cys)_n-Gly increased substantially after eight d of culture, exceeding the amount of (γ -Glu-Cys)_n-Gly. Cultures exposed to the higher cadmium concentrations (15 and 30 mg/L) showed a decrease in phytochelatins after four and three d of culture, respectively, whereas an increase in cysteine and glutathione occurred at the same time. A fast decrease in phytochelatins was also measured when cells were placed into Cd-free medium. This decrease agrees with a degradation of the phytochelatins.

Keywords—Thiols Phytochelatins Cysteine Cadmium Microalga

INTRODUCTION

Different environmental studies have shown that coastal areas are often affected by cadmium pollution. This pollution causes loss of biological diversity and an increase in the bioaccumulation and magnification of cadmium in the food chain. The survival capacity of the different aquatic organisms, including phytoplankton, depends on the presence of specific responses that prevent the toxicity of this metal.

Microalgae have developed different resistance mechanisms such as adsorption of metal ions to cell wall components, excretion of organic compounds forming extracellular complexes with the metal ions, and production of metal ion chelators either in the cytosol or at intracellular level [1].

It is assumed that phytochelatins, small thiol-containing peptides, act as intracellular chelators [2, 3]. These molecules are oligo- and polypeptides with the amino acid structure (γ -Glu-Cys)_n-Gly (also abbreviated as (γ -EC)_nG). Phytochelatins with *n* ranging from 2 to 11 have been described [4, 5]. Although glycine is the most common terminal amino acid, glutamic acid [6], serine [7], and β -alanine [8] have been found instead of glycine in several species. Moreover, the terminal amino acid does not appear in desglycyl-phytochelatins [9]. In these molecules, cadmium is chelated throughout coordination with the thiol group of cysteine.

Phytochelatins are synthesized enzymatically from the tripeptide glutathione (GSH) by a γ -glutamyl-cysteinyl-dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) [10, 11]. The enzyme cleaves the terminal glycine from one glutathione and catalyses the transfer of the γ -glutamyl-cysteinyl-dipeptidyl to the amino terminus of another glutathione that acts as acceptor to form the *n* =

2 oligomer, hence, the chain growing by binding additional γ -Glu-Cys moieties to the phytochelatin peptide chain.

Prior synthesis of glutathione, carried out in two steps involving two enzymes, is necessary for the synthesis of phytochelatins. In the first step, γ -glutamylcysteine synthetase combines the amino acids glutamic acid and cysteine to form γ -glutamylcysteine (γ -Glu-Cys). Later, the enzyme glutathione synthetase catalyzes the reaction between γ -glutamylcysteine and the amino acid glycine to form GSH [4].

Therefore, glutathione is the base unit of phytochelatins and at the same time cysteine is the main precursor of GSH via synthesis of γ -Glu-Cys. Cysteine biosynthesis is required under conditions of metal stress to allow increased biosynthesis of GSH and phytochelatins. Moreover, different reports have shown that cysteine is also involved in metal detoxification [12-14].

Once cadmium is chelated by phytochelatins, evidence has shown that these complexes are carried towards the vacuolar system. Nassiri et al. observed that the cadmium accumulated in the vacuoles of *Tetraselmis suecica* and *Skeletonema costatum* showed good correlation between cadmium, sulfur, and nitrogen. This suggests that phytochelatin-Cd complexes can be sequestered in the lysosomal or vacuolar system [15, 16].

The involvement of physiological responses in monitoring studies has become of increasing interest. To understand the tolerance mechanism developed by phytochelatins, it is essential to know the dynamics of the synthesis and the stability of these molecules and their precursors. Few works report on the evolution of phytochelatins and their precursors, both with time of exposure and with different doses of cadmium in microalgal cells [3, 17]. Thus, the goal of this work was to study the time course of synthesis, magnitude of response, and degree of polymerization of phytochelatins by *Tetraselmis suecica*, a typical marine microalga,

*To whom correspondence may be addressed (torres@udc.es).

exposed to different cadmium concentrations. The intracellular concentrations of GSH, γ -Glu-Cys, and cysteine were also measured in response to metal stress. In this work, a sensitive capillary electrophoresis technique was used to analyze phytochelatins and related thiols. This technique allows the quantification and characterization of not only phytochelatins but also of cysteine, γ -Glu-Cys, GSH, and other thiol peptides, such as desglycyl-phytochelatins, simultaneously (in the same run) [18]. Samples were previously derivatized with monobromobimane (mBrB), a chromogenic compound that labels thiol groups and provides selectivity in the detection process.

Persistence of thiols, in cultures (previously exposed to cadmium) transferred to a medium without metal, was also monitored.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemicals were of the highest purity available. Orthophosphoric acid (H_3PO_4), boric acid (H_3BO_3), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), monobromobimane (mBBR) ($C_{10}H_{11}N_2O_2Br$), sodium borohydride ($NaBH_4$), diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride (DTPA) ($C_{14}H_{19}N_3O_8$), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), lugol and Tris (hydroxymethyl) amino methane (TRIS) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol was purchased from Scharlau (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain). Filters were obtained from Millipore (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

The different reagents and running buffers were prepared with Milli-Q® water obtained from a Milli Q Plus system (Millipore Ibérica).

Tetraselmis suecica culture conditions and cadmium treatment

Cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch were grown in natural enriched seawater medium, with the addition of inorganic nutrients without EDTA and TRIS [19]. The seawater was passed through a 0.45 μ m-pore Millipore filter and a charcoal column to eliminate organic chelating substances and afterwards sterilized at 121 °C for 20 min. The salinity of the seawater was 35 ‰ and the initial pH of the culture was 7.8. Cultures were maintained at 18 ± 1 °C under a light intensity of 68 μ E/m²/sec using cool fluorescent light and with a 12:12-h dark:light cycle. Natural sterile air was constantly bubbled at a flow rate of 10 L/min.

T. suecica was cultured for eight d with cadmium concentrations of 3, 7.9, 15, and 30 mg/L. Initial cell density in the assays was 25×10^4 cells/ml. Control cultures without cadmium were included. Each experiment was carried out in triplicate.

The cadmium concentration corresponding to median effective concentration (EC50 value) for this microalga was estimated in a previous work [20] as 7.9 ± 1 mg/L of cadmium after six d of exposure to this metal. Therefore, the concentration 7.9 mg Cd/L was selected for the assay and two concentrations above (15 and 30 mg Cd/L) and one below (3 mg Cd/L) were also assayed.

Growth of microalgal cultures was measured daily by counting culture aliquots in a Neubauer hemocytometer chamber after fixation with lugol using a light microscope. Aliquots of *T.*

suecica cells were harvested by centrifugation (1500 g for 10 min at 15 °C) every day and stored at -20 °C until the analysis.

Characterization and quantification of the Cd-induced thiols

Thiol peptides were extracted from frozen samples and derivatized with monobromobimane that specifically labels sulfhydryl-containing compounds. Separation and analysis of labeled-thiol peptides were carried out using capillary electrophoresis [18]. The equipment used was an HP^{3D}CE (Capillary Electrophoresis System, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Standards of phytochelatins, cysteine, γ -Glu-Cys, and GSH, derivatized in the same way as the biological samples, were used to identify the different peaks. Glutathione was used as a suitable calibrating substance for quantifying the different peaks.

Determination of intracellular cadmium

A 25 ml aliquot from each microalgal culture was centrifuged at 1500 g for 5 min, the pellet was resuspended for 20 min in 25 ml of a solution containing 0.02 M EDTA dissolved in seawater. Afterwards, the cells were centrifuged (1500 g for 10 min at 15 °C) and washed twice with seawater. The cellular pellet was digested for 24 h with 1 ml of 15 M HNO_3 and 0.5 ml $HClO_4$. The cadmium present in the samples was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using a VG Elemental Plasma Quad 2 ICP-MS System (VG Elemental, Offenbach, Germany) [20].

Stability of phytochelatins and their precursors after transferring to metal-free medium

Tetraselmis suecica cells exposed to a cadmium concentration of 7.9 mg Cd/L for 7 d were transferred to metal-free medium to monitor the persistence of phytochelatins and their precursors in cells. Cultures were carried out as described above.

Cells were harvested by centrifugation (1500 g for 10 min at 15 °C) and resuspended in a solution containing 0.02 M EDTA dissolved in seawater. Cells were kept in this solution for 10 min; afterwards, cells were centrifuged (1500 g for 10 min at 15 °C) and washed twice with seawater. The washing with EDTA removed the cadmium adsorbed onto the cell surface. Cells were resuspended in metal-free seawater enriched with inorganic nutrients without EDTA and TRIS. Cultures were carried out as described above. Thiols and the intracellular concentration of the metal were monitored during the assay (as indicated above) every two h during the phase of light for a short time course evaluation (10 h).

Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program SPSS 11.5 (SPSS Iberica, Madrid, Spain, 2002). The results were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and the mean values of the various treatments were compared by Duncan's multiple range test to a level of 5 %.

RESULTS

Effect of cadmium on *T. suecica* growth

Cultures of *T. suecica* exposed to different cadmium concentrations (3, 7.9, 15, and 30 mg Cd/L) showed significant

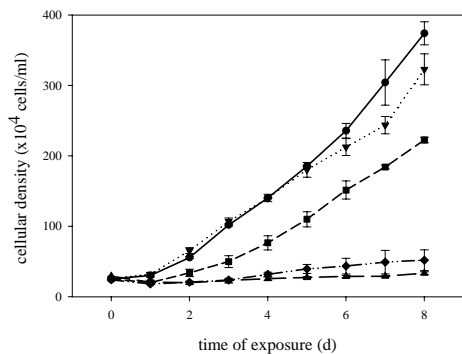


Fig. 1. Growth of *Tetraselmis suecica* cells with the cadmium concentrations assayed. —●— Control,▼..... 3 mg Cd/L, - - -■- - 7.9 mg Cd/L, - -◆- - 15 mg Cd/L, —▲— 30 mg Cd/L.

differences in their growth. Growth inhibition was observed in all cultures exposed to cadmium with respect to the control culture without metal. The ANOVA test ($p > 0.05$) showed that this inhibitory effect on growth was significant in all cultures. The inhibition was proportional to cadmium concentration: As cadmium concentration increased in the medium, growth decreased (Fig. 1). A stimulating effect (hormesis) was observed during the first four d in cultures exposed to the lower cadmium concentration (3 mg/L), but later the growth decreased significantly. Growth was not observed in cultures containing the highest cadmium concentration (30 mg/L).

Characterization and quantification of thiols in *T. suecica* cells exposed to cadmium by a capillary zone electrophoresis technique

A capillary zone electrophoresis technique was used to measure glutathione, γ -Glu-Cys, the amino acid cysteine and phytochelatins previously derivatized with monobromobimane [18]. Desglycyl-peptides were also detected. Using this technique, all the thiols previously mentioned could be analyzed in the same run.

Glutathione, γ -Glu-Cys, and cysteine

The synthesis of these low molecular weight thiols depends on the concentration of cadmium added to the medium (Fig. 2).

Tetraselmis suecica cells treated with the lowest cadmium concentration (3 mg/L) showed a decrease in GSH content during the first day of exposure. Later, GSH increased until reaching the initial content and remained steady without significant differences ($p < 0.05$) until the d 6, increasing slightly at the end of the culture period. However, GSH content never exceeded the amount synthesized by the control or the amount presented on day zero, 202.48 ± 41.87 amol -SH/cell ($a = 10^{-18}$ mol, -SH refers to thiol group) being the highest GSH content (the last day of culture) detected in cultures with 3 mg Cd/L. γ -Glu-Cys did not show significant differences along the assay in cells exposed to this low cadmium concentration (3 mg Cd/L), 121.14 ± 61.72 amol -SH/cell being the highest amount measured, detected on the fourth d of culture. Nevertheless, cysteine showed an increase, higher than that of GSH and γ -Glu-Cys, reaching a value of 316.38 ± 17.395 amol -SH/cell on the seventh d of culture. Cultures containing 7.9 mg

Cd/L showed a decrease in the amounts of GSH and γ -Glu-Cys on the first day; after two d the concentration of these peptides remained without significant changes ($p < 0.05$) until the last day of culture, when the amount of GSH increased slightly and reached 240.98 ± 18.56 amol -SH/cell. The concentration of GSH did not exhibit significant differences among control cultures and those exposed to 3 and 7.9 mg Cd/L (Fig. 2, a, b, and c).

The highest GSH levels were obtained in cultures treated with 15 mg Cd/L, exceeding the levels observed on day zero from the second day of treatment and reaching the highest amounts of GSH of the four cadmium concentrations assayed. The highest concentration of this small peptide was reached on the sixth d of culture (633.06 ± 238.82 amol -SH/cell), being 3.3-fold higher than the levels observed on day zero and 2.9-fold higher with respect to the control on the same day of culture (Fig. 2d).

The concentration of GSH in cultures exposed to 30 mg Cd/L decreased on the first day, but in the later days the levels of this peptide increased substantially with respect to the cultures treated with the lower cadmium concentrations, decreasing only on the last day (Fig. 2e). The highest amount was reached after seven d of culture, being 3.1-fold higher than on day zero and 2.8-fold with respect to the control. Therefore, the levels of GSH in cells treated with 15 and 30 mg Cd/L exceeded substantially the amount measured in control cultures.

However, the amino acid cysteine exceeded in all cultures the concentrations reached in controls, the amount reached by this amino acid being higher at the higher cadmium concentrations (Fig. 2).

The concentrations of the amino acid cysteine increased from the first day of culture in all the concentrations assayed. This amino acid increased substantially in cells exposed to 15 and 30 mg Cd/L and exceeded 74.7- and 86.1-fold the amount recorded on day zero, reaching a concentration of 2915.02 ± 487.12 and 3359.54 ± 499.15 amol -SH/cell, respectively (Fig. 2, d and e). The amino acid cysteine also increased significantly in cultures treated with 7.9 mg Cd/L after the second day, reaching an amount that was 35.1-fold higher than that of day zero on the last day. Cysteine began to increase on the fourth day of culture in cells treated with 3 mg Cd/L. Cysteine reached a concentration that was 30.1 and 38.2-fold higher than the control in cultures containing 15 and 30 mg Cd/L, respectively, the days (8 and 7, respectively) in which this amino acid reached the highest values. This amino acid exhibited significant differences compared with γ -Glu-Cys and GSH in cultures with 7.9, 15, and 30 mg Cd/L ($p > 0.05$).

The dipeptide γ -Glu-Cys presented the fewest changes in the cadmium concentrations tested. After the second day, in the cultures containing 3 and 7.9 mg Cd/L this peptide remained without significant differences ($p < 0.05$), the highest concentration of γ -Glu-Cys measured being in cultures treated with 7.9 mg Cd/L when a concentration of 152.63 ± 45.01 amol -SH/cell was reached. In the same way, in cultures exposed to 15 and 30 mg Cd/L this small peptide remained without major variations.

Phytochelatin

The time course analysis showed that the concentrations of phytochelatin and their number of subunits depend on the amount of cadmium added to the culture and on the time of exposure (Fig. 3). Synthesis of phytochelatin was not detected with the technique applied in the control and at day zero of each culture.

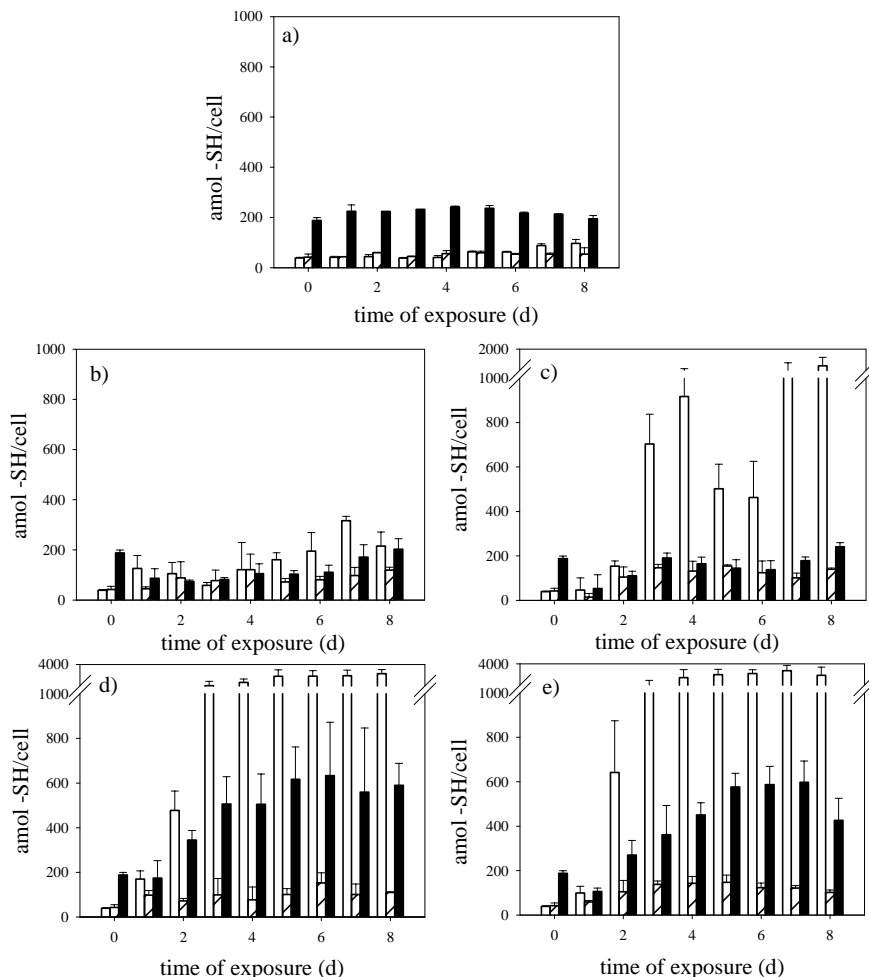


Fig. 2. Time course of glutathione (GSH), γ -Glu-Cys (γ -EC), and the amino acid cysteine concentration in cells of *Tetraselmis suecica* in response to different cadmium concentrations expressed as amol -SH/cell ($a = 10^{18}$ mol, -SH refers to thiol group): (a) control, (b) 3 mg/L, (c) 7.9 mg/L, (d) 15 mg/L and (e) 30 mg/L. \square Cys, \square γ -EC, \blacksquare GSH. Data bars represent means of three sample replicates \pm standard deviation.

Synthesis of phytochelatins showed a similar pattern in cultures with 3 and 7.9 mg Cd/L (Fig. 3, a and b). The levels of the different types of phytochelatins in cultures treated with 3 and 7.9 mg Cd/L increased progressively in the course of time. The (γ -EC)₂G to (γ -EC)₅G were detected under both cadmium concentrations assayed.

The rate of (γ -EC)₃G accumulation was higher than that of any other type of phytochelatins in cells exposed to the lowest cadmium concentration studied (3 mg Cd/L), for all days of culture, reaching a value of 3859.60 ± 553.11 amol -SH/cell. However, in cultures treated with 7.9 mg Cd/L, (γ -EC)₄G increased substantially after seven d of cultures, exceeding the amount of (γ -EC)₃G and reaching a concentration of 4540.19 ± 1042.13 amol -SH/cell. The peptide (γ -EC)₄G exceeded by 17-fold the initial amount of this type of phytochelatin. A (γ -EC)₆G was detected from the fifth day of culture in cells exposed to 7.9 mg Cd/L and a (γ -EC)₇G appeared on the last day of culture in this same cadmium concentration.

Phytochelatins of cultures exposed to 15 mg Cd/L increased until the fourth day of culture, the amount of (γ -EC)₃G being significantly higher than that of the other types of phytochelatins ($p > 0.05$), reaching a concentration of 3299.87 ± 438.17 (Fig. 3c). After a 4-d culture, phytochelatin levels decreased gradually, coincident with a considerable increase in GSH and cysteine (Fig. 2d).

As in cultures exposed to 15 mg Cd/L, cells of *T. suecica* treated with the highest cadmium concentration (30 mg Cd/L) showed a decrease in the concentration of phytochelatins after three d of culture (Fig. 3d). At the same time, an increase in the concentration of cysteine and GSH was measured. The amount of (γ -EC)₃G, as in cultures exposed to 3 and 15 mg Cd/L, was significantly higher than that of the other types of phytochelatins ($p > 0.05$), reaching a concentration of 3123.71 ± 1210.354 .

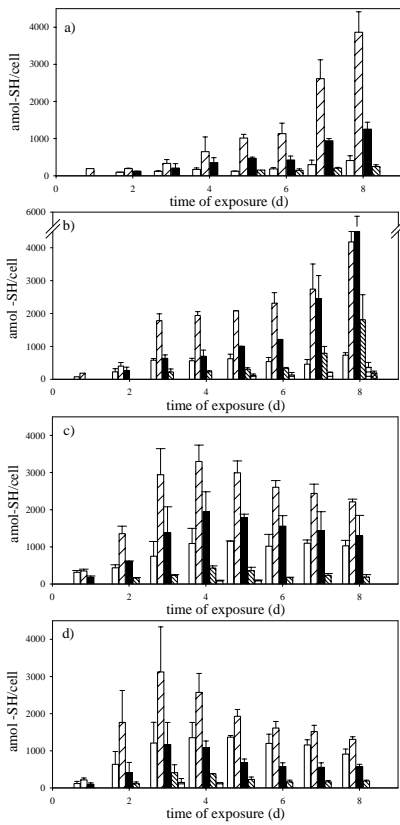


Fig. 3. Time course of phytochelatin (γ -(EC)_nG) synthesis in *Tetraselmis suecica* exposed to different cadmium concentrations expressed as amol –SH/cell ($a = 10^{18}$ mol, -SH refers to thiol group): (a) 3 mg/L, (b) 7.9 mg/L, (c) 15 mg/L, and (d) 30 mg/L. Data bars represent means of three sample replicates \pm standard deviation. \square γ -(EC)₂G, \square γ -(EC)₃G, \blacksquare γ -(EC)₄G, \square γ -(EC)₅G, \square γ -(EC)₆, \square γ -(EC)₇G.

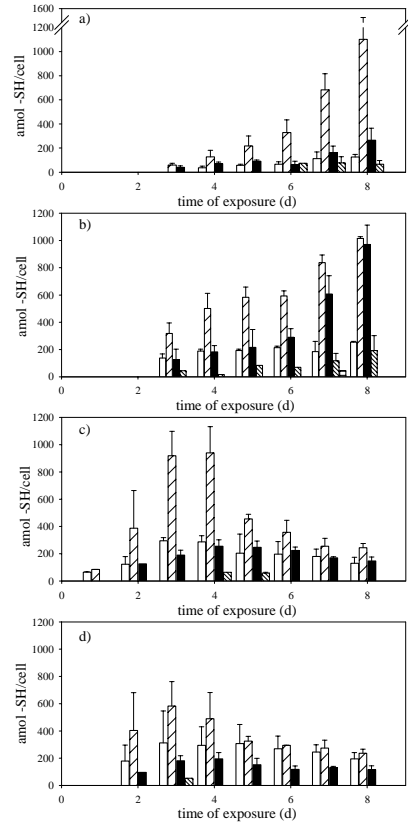


Fig. 4. Time evolution of desglycyl-phytochelatin (γ -(EC)_n) in cultures of *Tetraselmis suecica* exposed to different cadmium concentrations expressed as amol –SH/cell ($a = 10^{18}$ mol, -SH refers to thiol group): (a) 3 mg/L, (b) 7.9 mg/L, (c) 15 mg/L, and (d) 30 mg/L. Data bars represent means of three sample replicates \pm standard deviation. \square γ -(EC)₂, \square γ -(EC)₃, \blacksquare γ -(EC)₄, \square γ -(EC)₅, \square γ -(EC)₆.

*Desglycyl-phytochelatin*s

The capillary zone electrophoresis technique used for the quantification and characterization of the different thiol compounds allowed the identification and separation of desglycyl-phytochelatin [18].

These types of peptides were not detected in the two first days of culture in the cells exposed to 3 and 7.9 mg Cd/L, although in cultures exposed to 30 mg Cd/L these peptides were already detected on the second day and from the first day in the cultures treated with 15 mg Cd/L (Fig. 4).

The time course of these desglycyl-peptides followed the same pattern as that of phytochelatin in the different cadmium concentrations. The concentration of desglycyl-phytochelatin in cultures treated with 3 and 7.9 mg Cd/L increased gradually along the assay. However, in the cultures exposed to 15 and 30 mg Cd/L, the different types of desglycyl-peptides decreased from the fourth and third day, respectively.

The concentration of (γ -EC)₃ significantly exceeded ($p > 0.05$) that of the other types of desglycyl in all the concentrations of cadmium assayed, 1102.048 ± 369.166 , 1014.327 ± 13.80 , 939.445 ± 192.268 , 582.931 ± 179.351 amol –SH/cell being the highest levels of (γ -EC)₃ reached in the cultures treated with 3, 7.9, 15, and 30 mg Cd/L, respectively.

Stability of phytochelatin after transferring to a metal-free medium

Cells of *T. suecica* exposed to 7.9 mg Cd/L for seven d were transferred to metal-free medium. Phytochelatin, desglycyl-phytochelatin, GSH, γ -Glu-Cys, and cysteine were monitored for ten hours. Phytochelatin, desglycyl-phytochelatin and the amino acid cysteine decreased gradually with time (Fig. 5). This reduction mainly affected (γ -EC)₃G and (γ -EC)₄G, these being the most abundant type of phytochelatin at the beginning of the assay (Fig. 5b). The decrease in desglycyl-peptides also mainly affected (γ -EC)₃ and (γ -EC)₄. A decrease in the concentration of phytochelatin

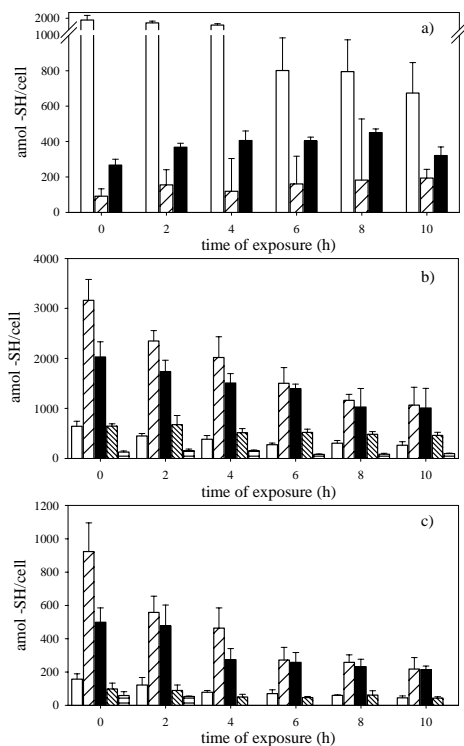


Fig. 5. Time evolution of thiol pools upon resuspension of cells in medium without metal (cells were previously exposed to 7.9 mg Cd/L for seven d) expressed as amol -SH/cell ($a = 10^{18}$ mol, -SH refers to thiol group: (a) time course of the amino acid cysteine and precursors of phytochelatin, glutathione (GSH), and γ -Glu-Cys (γ -EC): \square Cys, \blacksquare GSH, \square γ -EC; (b) time course of phytochelatin (γ -(EC)_nG): \square γ -(EC)₂G, \square γ -(EC)₃G, \blacksquare γ -(EC)₄G, \square γ -(EC)₅G, \square γ -(EC)₆G; (c) time course of desglycyl-phytochelatin (γ -(EC)_n): \square γ -(EC)₂, \square γ -(EC)₃, \blacksquare γ -(EC)₄, \square γ -(EC)₅, \square γ -(EC)₆. Data bars represent means of three sample replicates \pm standard deviation.

occurred simultaneously with a cellular increase in GSH and γ -Glu-Cys (Fig. 5a). These small peptides exceeded by 1.6- and 2.1-fold, respectively, the concentration at the beginning of the assay, although the concentration reached by γ -Glu-Cys was 2.6-fold lower than that of GSH.

The analysis of intracellular cadmium showed that the intracellular concentration of this metal was constant during the assay (10 h).

DISCUSSION

Cadmium toxicity is clearly demonstrated; however, what generally is accepted to be deleterious to living organisms provoked a hormesis effect in cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* exposed to 3 mg/L. Also, Lane et al. [21] provided evidence of a biological role for Cd in the marine diatom *Thalassiosira weissfloggi*. The addition of cadmium to Zn-limited cultures increased the growth rate. These authors found that this microalga expresses a Cd-specific carbonic anhydrase which could substitute the Zn enzyme TWCA1 (*Thalassiosira weissfloggi* carbonic anhydrase), the major intracellular carbonic anhydrase.

Marine microalgae are among the organisms that tolerate higher concentrations of this metal. *Tetraselmis suecica* is a good example of a tolerant microalga. The EC50 value obtained for the growth of this species exposed to cadmium was 7.9 mg Cd/L [20]. This value indicates that this microalgal species is one of the most tolerant to this metal. One of the reasons for this tolerance is its ability to synthesize phytochelatin and related molecules. Different reports have shown that biosynthesis of phytochelatin seems to be one of the main tolerance mechanisms to metals, cadmium being one of the main inducers [22, 23]. In fact, a previous analysis showed that about 87% of the bioaccumulated cadmium was bound by phytochelatin when this microalga was exposed to 6 mg Cd/L for eight d [24]. The concentration of thiol groups in *T. suecica* also increased as cadmium increased in the medium, this increase being higher with the higher cadmium concentrations assayed [20]. These results agree with the increase in phytochelatin in the cultures treated with 3 and 7.9 mg Cd/L. The synthesis of phytochelatin allows a great capacity to bind cadmium that prevents the metal remains free and therefore, the metal does not affect to the cellular targets. Ahner et al. [25] exposed eight species of eukaryotic microalgae to increased concentrations of cadmium. These algae exhibited a similar response, and the authors observed that the concentration of phytochelatin increased with that of cadmium. This fact is common to the species of phytoplankton investigated; therefore, it could be considered a general response.

However, the results obtained in the present work showed that phytochelatin synthesis is an effective defense mechanism in the response to cadmium, but only at metal concentrations below the EC50 value. Cultures of *T. suecica* exposed to the higher cadmium concentrations (15 and 30 mg Cd/L) showed a decrease in the levels of phytochelatin after four and three d of exposure, respectively; nevertheless, the number of thiol groups did not decrease [20]. Although growth was totally inhibited in the cultures exposed to the higher cadmium concentrations, synthesis of the amino acid cysteine was high (and minor the synthesis of GSH), reaching a concentration 86.1-fold higher than that on day zero, on the seventh d of culture. In the same way, cells treated with 15 mg/L of cadmium showed a substantial increase in cysteine (74.7-fold higher than on day zero), although growth was near zero. At these high cadmium concentrations, this amino acid might be acting as main chelator for cadmium. A previous work showed that the intracellular cadmium in cells of *T. suecica* exposed to 30 mg/L considerably exceeded the amount of intracellular cadmium existing in the cultures with lower concentrations from the first day [20]; therefore, cadmium was bioaccumulated in this culture. Bearing this in mind, the present study demonstrated that cysteine might be the principal chelator of cadmium when the concentration of this metal is so high that synthesis of phytochelatin is restricted. The role of cysteine in metal detoxification was studied in several microalgae and plants. Exposure to cobalt ions resulted in an increase in citrate and cysteine levels in cells of *Crotalaria cobalticola* where the synthesis of phytochelatin was not induced [12]. The synthesis of cysteine in a tolerant strain of *Scenedesmus acutus* increased with the cadmium concentration assayed, reaching an amount that was 5-fold higher than that of the wild strain in the culture with the higher cadmium concentration (27 μ M); a decrease in phytochelatin was also observed both in the tolerant and in wild strains when cadmium concentrations were increased [26]. Ahner et al. [14] reported that cysteine increased with cadmium concentration and exceeded the concentration of GSH at the highest cadmium concentrations in the different species of microalgae

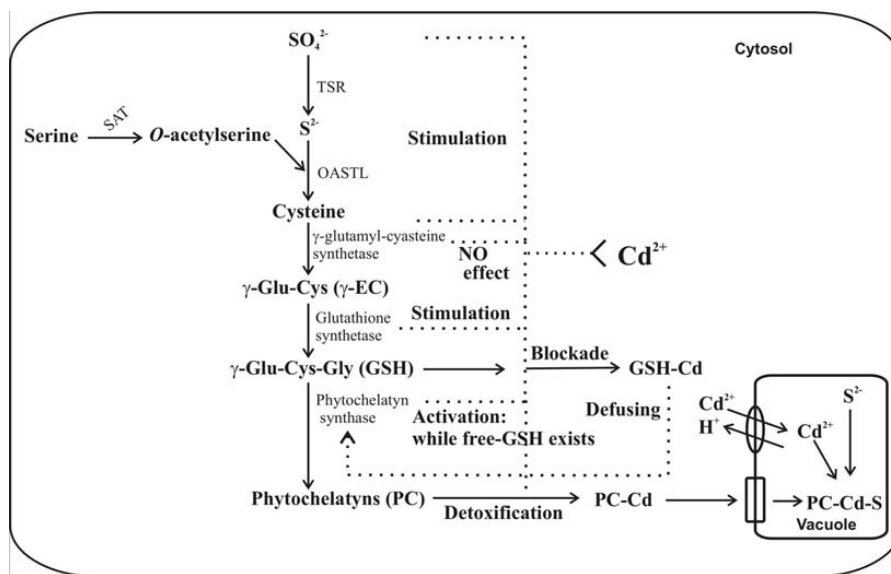


Fig. 6. Schematic representation of cadmium interaction with the different enzymes involved in the biosynthetic pathway of phytochelatins. For a detailed explication see the text. SAT: serine acetyl transferase, OASTL: *O*-acetylserine thiol lyase, TSR: thiosulfate reductase, γ -EC: γ -Glu-Cys, GSH: γ -Glu-Cys-Gly, PC: Phytochelatins.

assayed. Transgenic plants of *Arabidopsis* with altered glutathione levels were unable to synthesize phytochelatins; however, in these plants, the steady state of cysteine concentration increased two-fold in response to cadmium exposure [27]. Consequently, as the concentration of cadmium overcomes a specific value (possibly the EC50 value for the growth of the species), the toxic effect of cadmium blocks the synthesis of phytochelatins, cysteine being the main chelating agent. However, cysteine presents a lower capability of chelating the metal; because of this, cysteine would not avoid cadmium toxicity when a high intracellular concentration of this metal exists. Therefore, in cultures exposed to 15 and 30 mg Cd/L, growth inhibition is not prevented.

The data indicate that the halt in the synthesis of phytochelatins in cultures containing the higher cadmium concentration is due to an inhibition in phytochelatin synthase, because the synthesis of cysteine and GSH continued and the concentration of these two molecules increased. One explanation for this result is deduced from the catalytic characteristics of phytochelatin synthase [28]. This enzyme requires free GSH for the catalysis. In cultures with higher concentrations of cadmium, the union of this metal blocks all available GSH. This indicates an increase in the synthesis of GSH (Fig. 2, d and e) to compensate the one that is blocked, but this synthesis is insufficient to generate free GSH, and so there is no synthesis of phytochelatins. These processes provoke that the cadmium remains free and causes the toxicity.

It is necessary to emphasize that, in contrast to what happens with the synthesis of phytochelatins, the synthesis of cysteine is very high in cultures with high cadmium concentration, indicating that the enzymes involved in the synthesis of this molecule are very active. For example, in plants of *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium there is high expression of the cytosolic *O*-acetyl-

serine(thiol)lyase gene [13]. Therefore, in the cells of *T. suecica*, in spite of being exposed to high cadmium concentrations, the metabolism of sulfur (assimilation pathway) continues to be high. Under these conditions cysteine becomes the mayor thiol in the cells.

Glutathione levels in cultures exposed to cadmium concentrations less than the EC50, however, recuperated as the culture progressed, reaching similar values (or only slightly higher) to those of the control. From this, it is deduced that the capacity of GSH synthesis is sufficient to compensate its lost due to the synthesis of phytochelatins and the one that has been blocked by cadmium complexation. This maintains the GSH levels needed for other functions, allowing these cultures to continue growing (although with a lower growth rate than that of the control (Fig. 1).

Tetraselmis suecica also showed a decrease in GSH on the first day of culture with respect to day zero in all cultures exposed to cadmium. This same pattern was observed in most algae and in plants [23]. In fact, in plant cells a general tendency is a concomitant disappearance of glutathione and the appearance of phytochelatins [29]. This general response is explained by the demands of GSH for phytochelatins synthesis. Also, cadmium provokes the production of reactive oxygen species that induce the activity of antioxidant enzymes like superoxide dismutase or low molecular weight antioxidant, like the GSH [30].

It is interesting to highlight that the level of γ -Glu-Cys remained without significant increases in all the cultures, even with the highest cadmium concentration, where both GSH and cysteine presented a strong increase. This seems to indicate that the activity of γ -glutamylcysteine synthetase did not increase greatly due to cadmium in *T. suecica* cells, and therefore γ -Glu-Cys levels remained constant in all cultures. This same effect was observed in plants of *Brassica juncea*, in which the transcript amount for γ -

glutamylcysteine synthetase did not change significantly after cadmium exposure [31]. There is the possibility that although cadmium did not induce higher expression of the gene of this enzyme, its activity was increased by the action of the metal; nevertheless, our results seem to indicate that this did not occur either. These results confirm, as generally accepted, that γ -glutamylcysteine synthetase is the rate-limiting step in GSH biosynthesis [32, 33], and therefore in the synthesis of phytochelatins, because as observed in the obtained data, cysteine synthesis does not rate-limit GSH production under the conditions of toxicity for cadmium. Elevated γ -glutamylcysteine synthetase activity (over expression) was shown to correlate with cadmium resistance in cultured tomato cells [34] and in *Brassica juncea* [35].

According to the results, a model of the interaction of cadmium with the enzymes involved in the biosynthetic pathway of phytochelatins in the microalga *Tetraselmis suecica* is presented in Figure 6.

Therefore, phytochelatins and cysteine are important cellular components involved in tolerance mechanisms to cadmium, the intracellular level of these molecules being regulated by the concentration of this metal in the medium. The size of the phytochelatins is also an important aspect for the reduction of cadmium toxicity. The ability of an organism to synthesize phytochelatins with a greater number of subunits would allow it to tolerate a higher concentration of cadmium, and therefore it would increase the EC50. In the case of *T. suecica*, phytochelatins with up to seven subunits were detected. The most abundant phytochelatin had four subunits (Fig. 3b). These phytochelatins are produced in cultures with the cadmium concentration that implies the EC50 value for the growth of this species. The elevation of this concentration of the metal exceeds the homeostatic characteristics of *T. suecica* (reduction in the synthesis of phytochelatins is produced) and growth is inhibited.

A second family of thiol peptides was characterized in *T. suecica*, the desglycyl-phytochelatins with the general structure (γ -Glu-Cys)_n. The desglycyl-phytochelatins were previously described in yeast [36] and plants [9, 37]. Meuwly et al. described three families of thiol peptides in maize treated with cadmium: (γ -Glu-Cys)_n, (γ -Glu-Cys)_n-Gly and (γ -Glu-Cys)_n-Glu [37]. Also, *Rubia tinctorum* exposed to different metals synthesized (γ -Glu-Cys)_n-Gly and (γ -Glu-Cys)_n [38]. Desglycyl-phytochelatins appeared upon exposure to metals; therefore, as phytochelatins, they could act in the detoxification of metals. However, desglycyl-peptides and phytochelatins showed a similar pattern of synthesis in *T. suecica* (Fig. 3 and 4), the desglycyl peptides concentration being substantially lower than that of phytochelatins. Nowadays, there are doubts about the biosynthetic origin of these molecules. A possible origin might be a process of degradation of phytochelatins due to the action of a carboxypeptidase [7]. Nevertheless, the data obtained in this work indicate a pattern of synthesis correlated with that of the phytochelatins, which might indicate that the desglycyl-phytochelatins would be a residual activity of phytochelatin synthase, which also might polymerize subunits of γ -Glu-Cys. When the activity of this enzyme decreased in cultures exposed to 15 and 30 mg Cd/L, decreasing the amount of phytochelatins, the amount of desglycyl-phytochelatins also decreased in the same way.

In cultures that were placed in a medium without cadmium, after exposure to an EC50 concentration of this metal, rapid loss of phytochelatins from the cells is produced. After ten h, the content of phytochelatins diminished to 50 % of the initial concentration

(Fig. 5). The quantity of cysteine also diminished, but GSH and γ -Glu-Cys increased. Loss of phytochelatins also occurred in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricoratum* previously exposed to cadmium and lead, respectively [39, 40]. The decrease in the levels of phytochelatins indicates an excretion or degradation process; in fact, in both plants and yeast, phytochelatin-Cd complexes are sequestered into vacuoles. However, no excretion of metals was observed in *T. suecica* during the assay (10 h). These data seem to indicate a degradation process of phytochelatins, the metal remaining inside the vacuoles. Once the metal is excreted to the vacuoles, the phytochelatins would be degraded, decreasing their levels since the activity of phytochelatin synthase would also be lower.

Acknowledgement—This work was funded by the Plan Nacional de I + D (Ref: REN 2003 – 02414), Spain.

REFERENCES

- 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 Microbiol Rev* 14: 387-396.
- Rijstenbil JW, Gerringa LJ. 2002. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat Toxicol* 56: 115-131.
- Tsuji N, Hirayanagi N, Iwabe O, Namba T, Tagawa M, Miyamoto S, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K. 2003. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62: 453-459.
- Rausser WE. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol* 109: 1141-1149.
- 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 tricoratum* Bohlin. *Aquat Toxicol* 39: 231-246.
- Meuwly P, Thibault P, Rausser WE. 1993. γ -Glutamylcysteinylglutamic acid - A new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett* 336: 472-476.
- Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I. 1994. Hydroxymethyl-phytochelatins (γ -Glutamylcysteine)_n-serine are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* 104: 1325-1332.
- Gupta DK, Tohyama H, Joho M, Inouhe M. 2004. Changes in the levels of phytochelatins and related metal-binding peptides in chickpea seedlings exposed to arsenic and different heavy metal ions. *J Plant Res* 117: 253-256.
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T. 1996. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* 110: 1145-1150.
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6838-6842.
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K. 2004. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 751-755.
- Oven M, Grill E, Golan-Goldhirsh A, Kutchan TM, Zenk MH. 2002. Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* 60: 467-474.
- Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Vega JM, Romero LC, Gotor C. 2001. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* 276: 9297-9302.
- Ahner BA, Wei L, Oleson JR, Nori O. 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Mar Ecol Prog Ser* 232: 93-103.
- Nassiri Y, Mansot JL, Wéry J, Ginsburger-Vogel T, Amiard JC. 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies

- of sequestration mechanism of Cd and Cu in the marine diatom *Skletonema costatum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 33: 147-155.
16. Nassiri Y, Wéry J, Mansot JL, Ginsburger-Vogel T. 1997. Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: An electron energy loss spectroscopy (EELS) study. *Arch Environ Contam Toxicol* 33: 156-191.
 17. Yin L, Zhou Y, Fan X, Lu R. 2002. Induction of phytochelatin in *Lemma aequinoctialis* in response to cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 68: 561-568.
 18. Pérez-Rama M, Torres E, Abalde J. 2005. Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatin and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* 26: 610-620.
 19. Fábregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B, Veiga M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
 20. Pérez-Rama M, Abalde J, Herrero C, Torres E. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresour Technol* 8: 265-270.
 21. Lane TW, Morel FMM. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4627-4631.
 22. Scarano G, Morelli E. 2002. Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biomaterials* 15: 145-151.
 23. Hu SX, Lau KWK, Wu M. 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci (Limerick)* 161: 987-996.
 24. Pérez-Rama M, Herrero C, Abalde J, Torres E. 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Environ Toxicol Chem* 20: 2061-2066.
 25. Ahner BA, Kong S, Morel FMM. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol Oceanogr* 40: 649-657.
 26. 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). *Aquat Toxicol* 68: 315-323.
 27. Xiang C, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ. 2001. The biological functions of glutathione revisited in arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* 126: 564-574.
 28. Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y, Rea PA. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* 275: 31451-31459.
 29. Briat JF, Lebrun M. 1999. Plant responses to metal toxicity. *C R Acad Sci III Sci Vie* 322: 43-54.
 30. Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara JH, Colepicolo P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch Environ Contam Toxicol* 40: 18-24.
 31. Schafer HJ, Greiner S, Rausch T, Haag-Kerwer A. 1997. In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amounts for gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-ECS) and metallothionein (MT2). *FEBS Lett* 404: 216-220.
 32. May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inzé D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49: 649-667.
 33. Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KL, Rennenberg H, Foyer CH. 1998. Glutathione: Biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 49: 623-647.
 34. Chen J, Goldsbrough PB. 1994. Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol* 106: 233-239.
 35. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SE, Jouanin L, Terry N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* 121: 1169-1177.
 36. Mehra RK, Winge DR. 1988. Cu (I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* g-glutamyl peptides varying in chain length. *Arch Biochem Biophys* 265: 381-389.
 37. Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE. 1995. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J* 7: 391-400.
 38. Kubota H, Sato K, Yamada T, Maitani T. 1995. Phytochelatin (class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L. *Plant Sci (Limerick)* 106: 157-166.
 39. Ahner BA, Morel FMM. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol Oceanogr* 40: 658-665.
 40. Morelli E, Scarano G. 2001. Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Environ Res* 52: 383-395.

