



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del cadmio en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica  
cultivada en anaerobiosis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Santiago Martínez Michel Geovanni



TUTOR DE TESIS:  
Dr. Ricardo Jasso Chávez

México, D.F.

Marzo, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, bajo la dirección del Dr. Ricardo Jasso Chávez.

#### JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Vocal	Dr. José Salud Rodríguez Zavala
Secretario (Tutor)	Dr. Ricardo Jasso Chávez
Suplente	Dr. Rodolfo García Contreras
Suplente	Dra. Perla Mariana del Rio Estrada

Con mucho amor para:  
Isis y Alexander, mi nueva familia  
Mis padres y hermanas

Tree of hope, be firm.  
You are the one that gives me  
the reason to believe in my roots.  
[...]

## **Agradecimientos:**

Al Dr. Ricardo Jasso por su apoyo intelectual y personal durante la realización de este proyecto.

A Elizabeth Lira Silva por su amistad y apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio y fuera de éste.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología por su exigencia y confianza. Por su amistad y por ayudarme a vivir momentos inolvidables.

Al personal del HGZ No. 32 del IMSS, porque su compañía y amistad me han permitido tener una visión diferente de la vida.

A quienes de manera directa o indirecta han permitido el cierre de este ciclo.

INDICE	
RESUMEN	01
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>02</b>
1.1. <i>Euglena gracilis</i> como modelo biológico	02
1.2. Contaminación por metales pesados	03
1.3. Efecto tóxico del cadmio	05
1.4. Mecanismos de resistencia de metales pesados	06
1.5. Procesos de biorremediación y fotobiorreactores	08
1.6. Metabolismo energético de <i>Euglena gracilis</i>	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos particulares	18
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
5.1. Medio de cultivo	19
5.1.1. Medio anaerobio	20
5.1.2. Medio aerobio	20
5.2. Crecimiento celular y exposición a cadmio	21
5.3. Cuantificación de metabolitos	22
5.3.1. Malato	22
5.3.2. Glucosa	22
5.3.3. Glutamato	22
5.4. Cuantificación de la actividad específica de enzimas	23
5.4.1. Enzima málica	23
5.4.2. Glutamato deshidrogenasa	23
5.4.3. Malato deshidrogenada	24
5.5. Cuantificación de oxígeno	24
5.6. Medición de fotosíntesis y respiración	24
5.7. Cuantificación de clorofila	25

5.8. Cuantificación de proteína	25
5.9. Cuantificación de metales pesados	25
5.10. Cuantificación de moléculas con grupos tiol	26
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>Primera parte: Toxicidad del cadmio</b>	
6.1. Efecto del cadmio sobre el crecimiento celular de <i>Euglena gracilis</i> en microaerofilia	28
6.2. Consumo de sustratos por <i>Euglena gracilis</i>	30
6.3. Actividad específica de enzimas involucradas en el consumo de sustratos	32
6.4. Concentración de oxígeno a través del tiempo de cultivo	34
6.5. Actividad fotosintética y respiración celular	35
<b>Segunda parte: Mecanismos de tolerancia y resistencia</b>	
6.6. Acumulación y remoción de cadmio	37
6.7. Efecto del cadmio en el contenido de moléculas con grupos tiol	38
<b>7. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>41</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>50</b>
<b>10. FUENTES DE INFORMACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>58</b>
11.1. Abreviaturas	58
11.2. Componentes anaerobios	59
11.4. Índice de figuras	60
11.5. Índice de tablas	60

## RESUMEN

*Euglena gracilis* Z fue cultivada en medio anaerobio y expuesta a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub>. Se determinó el consumo de las fuentes de carbono, la actividad fotosintética y la respiración celular. Se cuantificó la remoción y acumulación del metal por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y el contenido de moléculas con grupos tiol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El estudio toxicológico indicó que *E. gracilis* fue capaz de crecer y duplicarse en medio de cultivo anaerobio. Se obtuvo una densidad celular hasta de 8x10<sup>6</sup> células/mL lo que generó un ambiente de microaerofilia. En estas células expuestas a CdCl<sub>2</sub>, el crecimiento celular presentó un retraso en la fase exponencial con respecto a las células cultivadas en aerobiosis. En altas concentraciones de CdCl<sub>2</sub> (100, 175 y 300 µM) se observó una baja tasa de duplicación celular. La IC<sub>50</sub> fue de 60-75 µM y 45 µM en células en microaerofilia y aerobias, respectivamente. El malato y glutamato fueron consumidos preferentemente (> 90%) en ambas condiciones; sin embargo, la glucosa no fue un buen sustrato ya que el consumo fue menor al 55%. Las actividades específicas de enzimas involucradas en el consumo de sustratos presentaron modificaciones por la microaerofilia y la exposición celular a cadmio.

La presencia de cadmio generó fluctuaciones en los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> posiblemente por modificaciones en el metabolismo. La actividad fotosintética en condiciones aerobias fue aproximadamente dos veces mayor en el control y 4 veces mayor en la condición de 25 µM Cd, con respecto a las condiciones correspondientes de microaerofilia. En microaerofilia se determinó un patrón de inhibición de la respiración celular en presencia de cadmio.

En cuanto a los mecanismos de resistencia estudiados, se determinó que los niveles de cisteína aumentaron proporcionalmente en células tratadas con CdCl<sub>2</sub> y en altas concentraciones del metal se indujo también la síntesis de fitoquelatinas. En condiciones de microaerofilia, la adhesión del metal a la superficie celular resultó ser el mecanismo predominante de remoción de cadmio en comparación con la acumulación intracelular.

Bajo estas condiciones de crecimiento, *E. gracilis* fue capaz de contender con el efecto tóxico del cadmio, así como de remover el metal pesado. Se propone que debido a las condiciones de cultivo, las principales especies químicas que entran a la célula y que provocan los efectos descritos en este trabajo son el cisteínato de cadmio y el sulfuro de cadmio. Asimismo, se concluye que la plasticidad metabólica de *E. gracilis* le confiere gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones de estrés, tales como cambios en la concentración de oxígeno y presencia de cadmio.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Euglena gracilis* como modelo biológico

*Euglena gracilis*, un protista de vida libre, ha sido usado como modelo en diferentes estudios biológicos debido a su remarcable plasticidad metabólica y su capacidad de adaptación a ambientes contrastantes. Cuando crece en presencia de luz es verde y fotosintética (Figura 1.1), en cambio, cuando crece en obscuridad es blanca y heterotrófica (Buetow, 1989) y bajo esta última condición puede utilizar una gran variedad de sustratos, tales como: los ácidos glutámico, málico, L-láctico, D-láctico, acético y succínico, así como glucosa, peptona y etanol, entre otros (Buetow, 1989; Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2008). Este organismo puede sobrevivir a cambios considerables en el pH, en un intervalo de 3.5 a 7.8, valor que suele cambiar a lo largo del tiempo de cultivo. Además, en condiciones de laboratorio puede sobrevivir en condiciones de baja tensión de oxígeno por periodos de tiempo relativamente largos (hasta 30 días) (Buetow, 1989).



Figura 1.1. *Euglena gracilis* vista al microscopio óptico (40x)

*E. gracilis* es un organismo muy interesante desde el punto de vista biológico, debido a que comparte características con las células animales, vegetales, de tripanosomátidos (protistas) e incluso presenta características que son exclusivas del grupo y que no comparte con ninguno de los anteriores, tales como la capacidad de fermentar ésteres de cera o la síntesis de paramilo como polisacárido de reserva (Buetow, 1989). Tiene clorofilas a y b como las plantas, pero carece de pared celular.

En su lugar, posee una película proteica de protección (Figura 1.2) cuya composición y estructura cambia de acuerdo a la condición de cultivo (heterotrófica, autótrofa, mixotrófica), según estudios evolutivos y de biología comparada del género *Euglena* (Leander *et al.*, 2007). La mitocondria de *E. gracilis* presenta una cadena respiratoria alterna con componentes sensibles e insensibles a rotenona, antimicina y cianuro, como las plantas y bacterias (Devars *et al.*, 1992; 1998), la cual bombea protones y genera un potencial transmembranal (Moreno-Sánchez & Raya, 1987) de magnitud suficiente para impulsar el transporte de calcio al interior de la mitocondria (Uribe *et al.*, 1994).

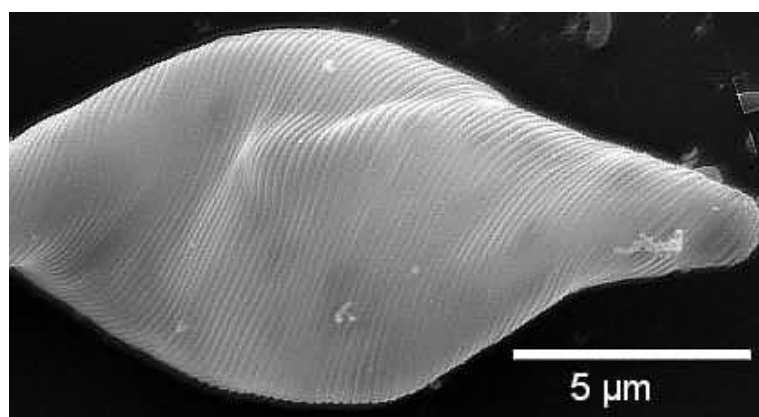


Figura 1.2. *E. gracilis* vista en el microscopio electrónico

Fuente: <http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/eng/eneug03a.htm>

Sus mecanismos de adaptación a ambientes contrastantes y su plasticidad metabólica han convertido a *E. gracilis* en un excelente modelo para estudios de biología de células eucariontes (Foltinova & Grones, 1997; Leedale, 1982; Price, 1989).

### **1.2. Contaminación por metales pesados**

Algunos metales son necesarios para diversos procesos metabólicos en los seres vivos, sin embargo, su papel fisiológico y metabólico no es completamente conocido. Los metales pueden ser clasificados de diversas maneras, de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas, así como sus aplicaciones. Son de particular importancia ecológica y económica los denominados metales pesados. De manera general se acepta que los metales pesados son aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g/ml. De acuerdo con Nieboer & Richardson (1980) los metales pueden dividirse en 3 clases según su

reactividad con los grupos funcionales de las biomoléculas y sus características fisicoquímicas, dichos elementos se pueden agrupar de la siguiente manera:

Tabla 1.1. Clasificación de los metales pesados

<b>Grupo</b>	<b>Afinidad</b>	<b>Ejemplos</b>
Clase A	Reaccionan más con el oxígeno (O>N>S)	Al, Ca, Sr, Ba y La
Clase B	Reaccionan más con el azufre (S>N>O)	Cu, Hg y Pb
Clase C	Afinidad intermedia	Fe, Co, Ni, Zn, Cr, Cd

FUENTE: Nieboer & Richardson (1980).

Los metales de la clase A pueden diferenciarse fácilmente por sus propiedades fisicoquímicas respecto a los de las clases B y C, mientras en estas dos últimas las diferencias no son tan evidentes.

Históricamente también se ha relacionado el término “metal pesado” con la toxicidad biológica y el daño ambiental, sin embargo, es importante aclarar que no existe relación directa entre el grado de toxicidad de un elemento o el riesgo para un ecosistema y la densidad o “peso” de un elemento (Duffus, 2002).

Basados en la densidad y afinidad a grupos funcionales, actualmente 40 elementos químicos son clasificados como metales pesados. Muchos de estos elementos son esenciales para el crecimiento celular de procariontes y eucariontes y se requieren en bajas concentraciones ( $V^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ). Algunos de los metales pesados como son:  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , etc., no son esenciales para el crecimiento celular y son extremadamente tóxicos aún en bajas concentraciones (Martell, 1975; Trevors, 1986).

El incremento en la concentración de los metales pesados en la biósfera es el resultado de perturbaciones en el medio ambiente ocasionadas por el hombre o por eventos geológicos. La contaminación de la atmósfera, hidrósfera y litósfera por metales pesados se ha incrementado en las últimas décadas como consecuencia de la actividad industrial y la explotación minera (Nriagu & Pacian, 1988). Con la magnificación trófica de estos contaminantes el problema se agrava, poniendo en riesgo la adecuación de los seres vivos y la salud humana (Vasquez-Alarcón *et al.*, 2001). Los organismos fotosintéticos son una de las principales vías de acceso de los metales pesados hacia los animales y el ser humano, ya que estos son utilizados comúnmente como alimentos.

Los metales pesados no pueden ser eliminados fácilmente de los cuerpos de agua por lo que suelen persistir por mucho tiempo en los sedimentos lacustres y marinos y son liberados lentamente.

### **1.3. Efecto tóxico del cadmio**

El cadmio es un metal de transición perteneciente a la clase C (afinidad intermedia con grupos funcionales de las biomoléculas que contienen azufre, nitrógeno u oxígeno), cuya densidad es de 8.64 g/mL por lo que es considerado un metal pesado (Nieboer & Richardson, 1980).

En el año 2011, el cadmio fue colocado en el séptimo lugar de la lista de compuestos de alto riesgo de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Riesgo de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés: <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>), la cual clasifica a los compuestos con base en su toxicidad, abundancia y riesgo de exposición en humanos. En esta lista se encuentra arsénico, plomo, mercurio, cloruro de vinilo, policlorobifenilos y benceno en los primeros 6 lugares.

El cadmio se encuentra en la naturaleza en bajos niveles (Iverson & Brickman, 1978) formando parte de la corteza terrestre en una concentración promedio de 0.18 ppm (Babich & Stotzky, 1978).

La intoxicación por cadmio en humanos puede ocurrir al respirar aire contaminado con este metal (por ejemplo en fábricas de baterías), ingerir alimentos contaminados (principalmente crustáceos, hígado y riñón de animales intoxicados), respirar el humo de cigarrillo o aire contaminado proveniente de la quema de combustibles fósiles o de la basura. La exposición continua a este metal es extremadamente tóxica, ya que los iones  $Cd^{2+}$  penetran a la célula a través de los sistemas de transporte celular que utilizan los iones fisiológicamente activos, como el  $Zn^{2+}$  (Nieboer & Richardson, 1980), además de que interaccionan con grupos SH y carboxilo de proteínas y otras biomoléculas y promoviendo la desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos y ruptura de cadenas de DNA (Valle & Ulmer, 1972).

La toxicidad del  $Cd^{2+}$  está estrechamente relacionada con la concentración usada y el tiempo de exposición. Los principales efectos descritos en *E. gracilis* son: inhibición del crecimiento, disminución de la fotosíntesis, de la respiración y de la división celular; multinucleación, aumento en el contenido de DNA, cambios en la estructura del cloroplasto y de la mitocondria, acumulación de paramilo, inducción de

proteínas de estrés, aumento en los tioles solubles en ácido (Cys,  $\gamma$ -EC, GSH, FQs) y generación de especies reactivas de oxígeno (Mendoza- Cózatl *et al.*, 2002).

#### 1.4. Mecanismos de resistencia y tolerancia a metales pesados

*E. gracilis* se encuentra entre las especies más abundantes y frecuentes en hábitats dulceacuícolas contaminados por metales pesados, además es la única especie fotosintética detectada en efluentes industriales y mineros (Fernández-Leborans & Novillo, 1996).

Este microorganismo fotosintético ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la resistencia a metales pesados, tales como  $Hg^{2+}$  (Figura 1.3),  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cr^{3+}$  y  $Pb^{2+}$  (Avilés *et al.*, 2003; Bariaud *et al.*, 1985; Cervantes *et al.*, 2001; Coppellotti 1989; Devars *et al.*, 1998, 2000; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; García-García *et al.*, 2008; Harada *et al.*, 2002; Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2002, 2006; Navarro *et al.*, 1997).



**Figura 1.3. Micrografía electrónica de *E. gracilis* expuesta a  $Hg^{2+}$**

Se observan daños en la estructura celular (Devars, 1998)

En general, la resistencia de organismos fotosintéticos y no fotosintéticos a  $Cd^{2+}$  ha sido correlacionada con el incremento en la producción de metabolitos con azufre, tales como la cisteína (Cys), el glutatión (GSH) y las fitoquelatinas (FQs), incrementando la transcripción y la actividad de las enzimas relacionadas con la vía de asimilación de azufre (Harada *et al.*, 2002). En otros organismos se induce la síntesis de metaloproteínas o quelatinas, las cuales son moléculas compuestas por proteínas de bajo peso molecular ricas en grupos tiol (Coppellotti, 1989). Estas proteínas juegan un papel

muy importante en la desintoxicación al tener la capacidad de secuestrar metales pesados por unión a sus grupos tiol (Hamer, 1986). Estas moléculas impiden que el metal se una a grupos sulfhidrilo de enzimas, proteínas estructurales y aminoácidos (Bruins *et al.*, 2000; Wong & Klaassen, 1981). Existen otras proteínas involucradas en la protección contra la intoxicación por metales pesados, tales como la glutatión reductasa, tripanotión reductasa (Montrichard *et al.*, 1999) y las P-glicoproteínas (Einicker-Lamas *et al.*, 1995).

*E. gracilis* es capaz de crecer en aguas contaminadas por  $\text{Cd}^{2+}$  (Hernández-Navarro *et al.*, 2003). Estudios bioquímicos en los que se analizan los mecanismos por los cuales *E. gracilis* resiste la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  muestran que existen incrementos en los niveles de Cys, GSH (Avilés *et al.*, 2003; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007) y FQs (Devars *et al.*, 1998, 2000) y que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede compartimentarse tanto en el cloroplasto (Mendoza-Cozatl, *et al.*, 2002, 2006a, b) como en la mitocondria (Avilés *et al.*, 2005).

Uno de los aspectos más importantes de la acumulación de metales pesados es el que se refiere al proceso de complejación. En este mecanismo, algunos ligandos presentes en el medio se unen al metal pesado para formar complejos que lo inactivan y así disminuyen su efecto tóxico. De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que lo mantiene en equilibrio electrónico (acomplejado) dentro de la célula, aunque sigue siendo potencialmente tóxico, ya que no ha sido eliminado. Los metales pesados muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales, tales como sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Los ligandos que unen metales pesados son básicamente aminoácidos (histidina, cisteína) y ácidos orgánicos (por ejemplo fitoquelatinas y metalotioneinas). (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

En *E. gracilis* se ha descrito la inactivación de cadmio mediante la formación de complejos de alta masa molecular (HMWC: *high molecular mass complexes*) formados por tioles,  $\text{Cd}^{2+}$  y sulfuro, alrededor de un núcleo de sulfuro de cadmio (CdS). Este proceso tiene lugar tanto en el citoplasma como en el estroma del cloroplasto y tiene una importante participación en la resistencia a cadmio (Mendoza-Cózatl, 2006b).

La resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$  en *E. gracilis* ha sido evaluada bajo diferentes condiciones de cultivo y se han encontrado diferencias importantes en el efecto tóxico y la capacidad de las células para resistir y tolerar al metal. Por ejemplo, células fotosintéticas cultivadas en ciclos de luz-obscuridad tienen una remarcable resistencia ( $\text{IC}_{50}=100 \mu\text{M}$ ) y capacidad de acumulación de cadmio (Devars *et al.*, 1998), mientras células

cultivadas bajo iluminación constante presentan una baja resistencia ( $IC_{50} = 10.6 \mu M$ ) (Einicker-Lamas *et al.*, 1996).

La pre-exposición de *E. gracilis* a bajas concentraciones de mercurio ( $1.5 \mu M$ ) modifica de manera significativa la capacidad de acumulación del cadmio y disminuye su efecto tóxico sobre las capacidades fisiológicas de las células (Avilés *et al.*, 2005). En cambio, el pre-tratamiento de *E. gracilis* a altas concentraciones de  $Cd^{2+}$  ( $20-50 \mu M$ ) genera una cepa resistente tanto a  $Cd^{2+}$  como a  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , posiblemente mediante la disminución en la capacidad de captación del metal. Este mecanismo no conduce a la acumulación del metal por lo que no podría ser aplicado para procesos de biorremediación (Cervantes *et al.*, 2006).

Debido a estos resultados, *E. gracilis* ha sido propuesta para procesos biotecnológicos de biorremediación de cuerpos de agua contaminados por metales pesados (Devars *et al.*, 1998; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

### 1.5. Procesos de biorremediación y fotobiorreactores

En las últimas décadas han surgido diferentes métodos físicos y químicos de remoción de metales pesados de cuerpos de agua contaminados, proceso que es conocido como remediación. La remoción de metales pesados de cuerpos de agua a través del uso de plantas y microorganismos es un proceso llamado biorremediación y de acuerdo a diferentes estudios, esta tecnología ofrece grandes ventajas respecto a métodos físicos y químicos (Salt *et al.*, 1995; Dhankher *et al.*, 2002).

Tabla 1.4.1. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
<b>Biológicos</b>	- Bajo costo operativo	- Requieren largos periodos de tratamiento
	- Tecnologías amigables con el ambiente	- Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos
	- Los contaminantes pueden ser destruidos	- No pueden emplearse si el tipo de suelo o las propiedades del agua no favorecen el crecimiento microbiano
	- Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior.	- Los residuos generados deben tratarse o disponerse: aumentando los costos y la necesidad de permisos
	- Pueden realizarse en periodos de tiempo cortos	
	- El equipo es accesible y no se	

<b>Fisicoquímicos</b>	necesita de mucha energía ni ingeniería	- Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación
-----------------------	---	--

Tomado de Volke-Sepúlveda & Velasco-Trejo, 2002.

De manera natural existen organismos que pueden resistir y sobrevivir en presencia de metales pesados. Algunos de estos organismos han sido propuestos para procesos de biorremediación y como biomonitores de contaminación ambiental por metales pesados. Dichos organismos están incluidos en casi todos los grupos taxonómicos.

En los últimos años, una gran cantidad de grupos de investigación se han dedicado a estudiar y determinar los mecanismos relacionados con la resistencia y la acumulación de metales. Para esto es necesario primero entender los mecanismos bioquímicos y fisiológicos por los cuales los organismos resisten y acumulan cantidades significativas de metales, para posteriormente manipular genéticamente a organismos de rápido crecimiento para que adquieran características de organismos hiperacumuladores (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006).

La mayor parte de los estudios sobre resistencia a metales se han llevado a cabo en plantas con la idea de sanear suelos contaminados (Cunningham & Ow, 1996). De la misma forma se aplica a cuerpos de agua mediante el uso de plantas u otros organismos acuáticos. A fin de mejorar los procesos de biorremediación, diversos grupos de trabajo han estudiado la habilidad de bacterias, plantas, levaduras, microalgas y macroalgas para tolerar, unir y acumular metales pesados (Dhankher *et al.*, 2002; Hamdy, 2000; Nedelkoska & Doran, 2000).

Los estudios de biorremediación no solo se han realizado en ensayos de laboratorio, sino también se han probado a diferentes escalas, pasando de matraces pequeños a fermentadores o biorreactores de gran capacidad, donde generalmente se utilizan microorganismos acumuladores para el tratamiento de aguas residuales, detoxificación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o en aguas industriales contaminadas (Flores *et al.*, 2003).

El cultivo intensivo de microalgas ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo de nuevos diseños de biorreactores. Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos (Grobbelaar, 2000), los sistemas



abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera.

En los últimos años, se han generado gran cantidad de diseños de biorreactores para el cultivo de microorganismos fotosintéticos con fines biotecnológicos. Los avances en el diseño de estos sistemas han permitido mejorar notablemente la densidad celular, la productividad y por ende la economía de los cultivos.

Los primeros fotobiorreactores fueron propuestos por Pirt *et al.* (1983), Gudin y Chaumont (1983) y Torzillo *et al.* (1986), construidos con materiales transparentes como vidrio, policarbonato y otros materiales. En la última década los fotobiorreactores han recibido mucha atención, ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres o más veces en comparación con los biorreactores usados actualmente. Además ofrecen ventajas operativas, tales como: facilidad para cosechar la biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de las condiciones de cultivo y menor inversión de capital en la construcción del fotobiorreactor. Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de compuestos derivados de microalgas.

Independientemente de la configuración del fotobiorreactor se deben considerar los factores que afectan su correcto funcionamiento y productividad, tales como: el suministro de luz, el mezclado (no siempre necesario, dependiendo del producto que se quiera obtener), la obstrucción de la luz en las células, el suministro de nutrientes (incluyendo CO<sub>2</sub>), el control de la temperatura y la remoción del O<sub>2</sub> producido fotosintéticamente (Flores *et al.*, 2003).

Algunos requerimientos del cultivo, como el suministro de nutrientes y el control de la temperatura, son relativamente fáciles de cubrir y controlar en comparación con otros, como el suministro de luz (Morita *et al.*, 2002).

Las microalgas y otros organismos fotosintéticos han sido propuestos para el tratamiento de aire (fijación de CO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub>) y de aguas (remoción de metales pesados) en fotobiorreactores (González *et al.*, 1997; Prakash *et al.*, 1999).

El principal impulsor de los avances en el diseño de fotobiorreactores ha sido la producción de compuestos químicos tales como enzimas, vitaminas, biocombustibles (Figura 1.4) y otros metabolitos de interés biotecnológico y biomédico y no la ya comprobada capacidad para convertir desechos orgánicos (agroindustriales, aguas

municipales, etc.) en insumos de alto valor agregado (Oswald, 1988; Prospero, 2000; Roviroso *et al.*, 1995; Sylvestre *et al.*, 1996).

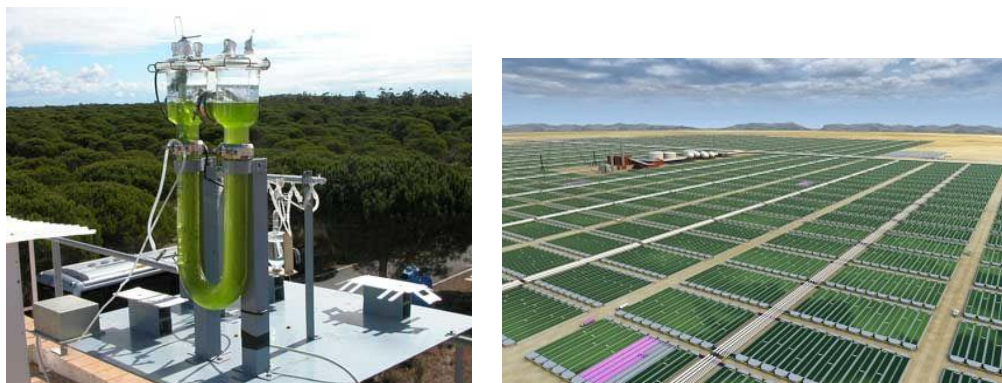


Figura 1.4. Fotobiorreactores industriales utilizados para la producción de biocombustibles. FUENTE: <http://www.cci-calidad.com/>

El uso sistemático de estas capacidades en sistemas intensivos se convertiría en un hito ecológico pues las microalgas, al ser la base de la cadena trófica acuática, son los microorganismos apropiados para cerrar el ciclo ecológico con el aprovechamiento de compuestos inorgánicos que las normativas actuales consideran como peligrosos cuando están libres en el ambiente.

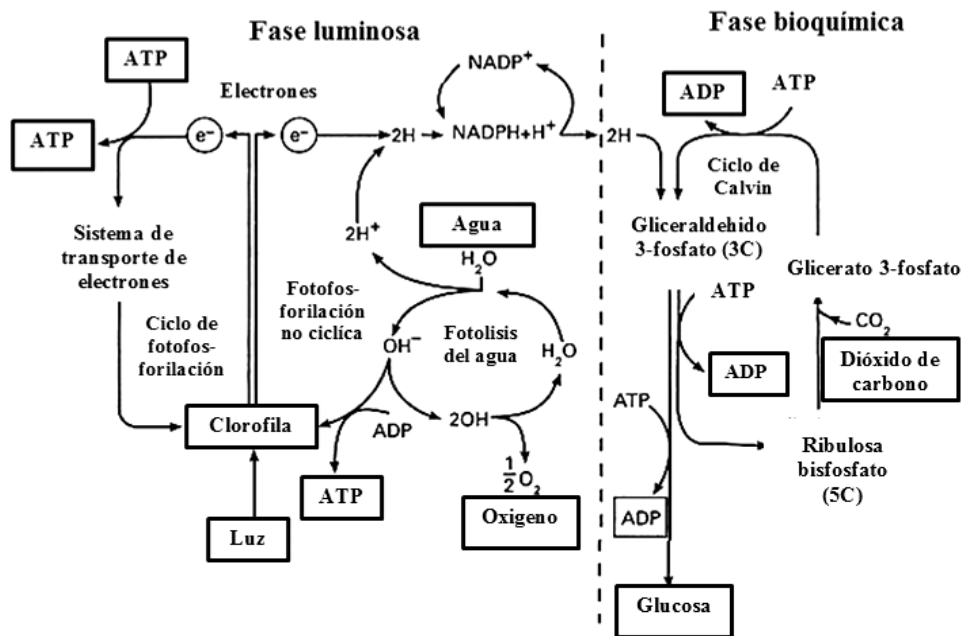
De igual manera, el conocimiento del metabolismo de las especies utilizadas en los procesos de biorremediación permitiría la construcción de biorreactores mejor diseñados y adecuados para cada especie o grupo taxonómico, a fin de potenciar sus capacidades de acumulación y remoción y así obtener un mayor rendimiento en estos procesos biotecnológicos.

### **1.6. Metabolismo energético de *Euglena gracilis***

El metabolismo energético de *E. gracilis* ha sido ampliamente estudiado bajo diferentes condiciones de cultivo (Buetow, 1989). La presencia de una ruta convencional Embden-Mayerhof-Parnas ha sido demostrada en *Euglena* (Hurlbert & Rittenberg, 1962) para la degradación de la glucosa exógena y endógena. La presencia de enzimas de la vía pentosas fosfato para la oxidación de la glucosa también ha sido reportada en *E. gracilis* (Smillie, 1989). La evidencia experimental para la operación de esta vía en *Euglena* es mínima, sin embargo, esta vía podría ser importante fuente de equivalentes reductores para la síntesis consecuente de ácidos grasos (Cheniae, 1963).

El metabolismo de *E. gracilis* puede modificarse por diferentes condiciones de estrés, por ejemplo, cuando la fuente de carbono externa se encuentra limitada se induce la degradación de paramilo (polisacárido de reserva) y se produce D- y L-lactato. Por consiguiente, la oxidación de ambos isómeros es catalizada por deshidrogenasas unidas a la membrana mitocondrial, como parte de la cadena respiratoria (Jasso-Chávez *et al.*, 2001, 2005).

La fotosíntesis y la fijación de CO<sub>2</sub> en *Euglena* son similares a las reportadas en microalgas y plantas vasculares. En *Euglena* este proceso ocurre en el cloroplasto el cual contiene fotosistemas I y II, pigmentos (clorofila a y b), el complejo b<sub>6</sub>f y enzimas del ciclo de Calvin-Benson (Buetow, 1989). La fotosíntesis es una secuencia de reacciones impulsadas por la luz en las que se acopla el flujo de electrones a la síntesis de ATP y NADPH, los cuales son utilizados como fuente de energía para fabricar glúcidos y otros componentes orgánicos a partir de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y que de forma simultánea liberan O<sub>2</sub>. Como sucede en la mayoría de organismos fotosintéticos, cuando no hay suministro de luz solar las mitocondrias de *Euglena* generan ATP, oxidando glúcidos producidos anteriormente en los cloroplastos en presencia de luz (Nelson & Cox, 2004).

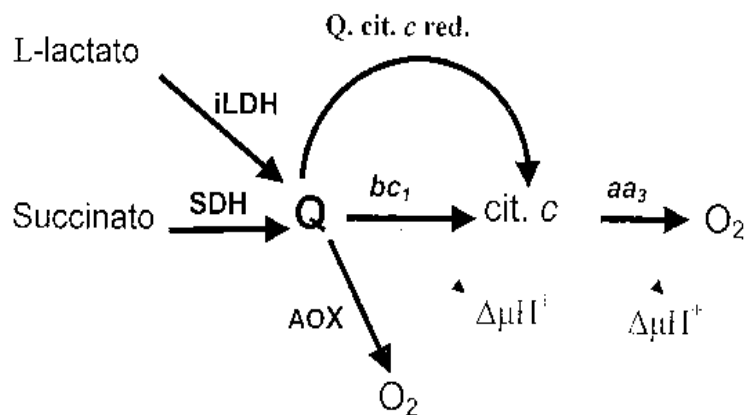


**Figura 1.6.1. Reacciones generales de la fotosíntesis en el cloroplasto**

Los análisis filogenéticos revelan una relación evolutiva muy cercana entre Euglénidos y Tripanosomátidos, cuyos caracteres compartidos han llevado a

proponerlos como los protistas con mitocondrias más basales (antiguos) en la escala evolutiva (Nordnes *et al.*, 1994; Linton *et al.*, 1999). A través de la teoría endosimbiótica se ha propuesto un origen monofilético de las mitocondrias; sin embargo, las mitocondrias de *E. gracilis* presentan características metabólicas y estructurales no compartidas con otros organismos actuales, por lo que se han sugerido eventos evolutivos alternos para explicar dichas convergencias.

*E. gracilis* no tiene la capacidad de oxidar piruvato para la síntesis de acetil CoA cuando se cultiva en condiciones aeróbicas, ya que no posee al complejo piruvato deshidrogenasa (Buetow, 1989). El piruvato puede ser transformado a acetil CoA por el complejo piruvato: NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa (PNO), el cual es inactivado por O<sub>2</sub> (Inui *et al.*, 1984). En cambio, tiene la capacidad de acoplar la oxidación de D- y L-lactato a la fosforilación oxidativa por medio de enzimas isómero específicas. Estas deshidrogenasas lácticas que reducen a la poza de quinonas, están unidas a la membrana interna mitocondrial y son independientes de NAD<sup>+</sup>, por lo que se les conoce como lactato deshidrogenasas independientes de pirídín nucleótidos (D-iLDH y L-iLDH) (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003).



**Figura 1.6.2. Cadena respiratoria de *Euglena gracilis*.** SHD, succinato deshidrogenasa; iLDH, lactato deshidrogenasa independientes de NAD<sup>+</sup>;  $bc_1$ , quinol citocromo c oxidoreductasa (sensible a antimicina); Q. cit. c red., quinol citocromo c oxidoreductasa (insensible a antimicina y sensible a mixotiazol);  $aa_3$ , citocromo c oxidasa; AOX, oxidasa alterna insensible a cianuro. Modificado de Moreno-Sánchez *et al.*, 2000.

*E. gracilis* lleva a cabo la fosforilación oxidativa en asociación con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la respiración mitocondrial. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos de *E. gracilis* presenta diferencias al descrito en mitocondrias de células de mamífero. Este ciclo contiene una  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa dependiente de

pirofosfato de tiamina, que produce succinato semialdehído a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato, así como dos deshidrogenasas de succinato semialdehído, una dependiente de  $\text{NAD}^+$  y otra de  $\text{NADP}^+$ , las cuales catalizan la conversión de succinato semialdehído a succinato (Buetow, 1989).

Además de los componentes clásicos, la cadena respiratoria de *E. gracilis* tiene complejos respiratorios alternos, tales como una NADH deshidrogenasa externa insensible a rotenona (Uribe & Moreno-Sánchez, 1992) y una oxidasa alterna resistente a cianuro (Castro-Guerrero *et al.*, 2005; Moreno-Sánchez *et al.*, 2000) la cual podría tener una participación importante en la respuesta contra el estrés oxidativo de la mitocondria (Castro-Guerrero *et al.*, 2008).

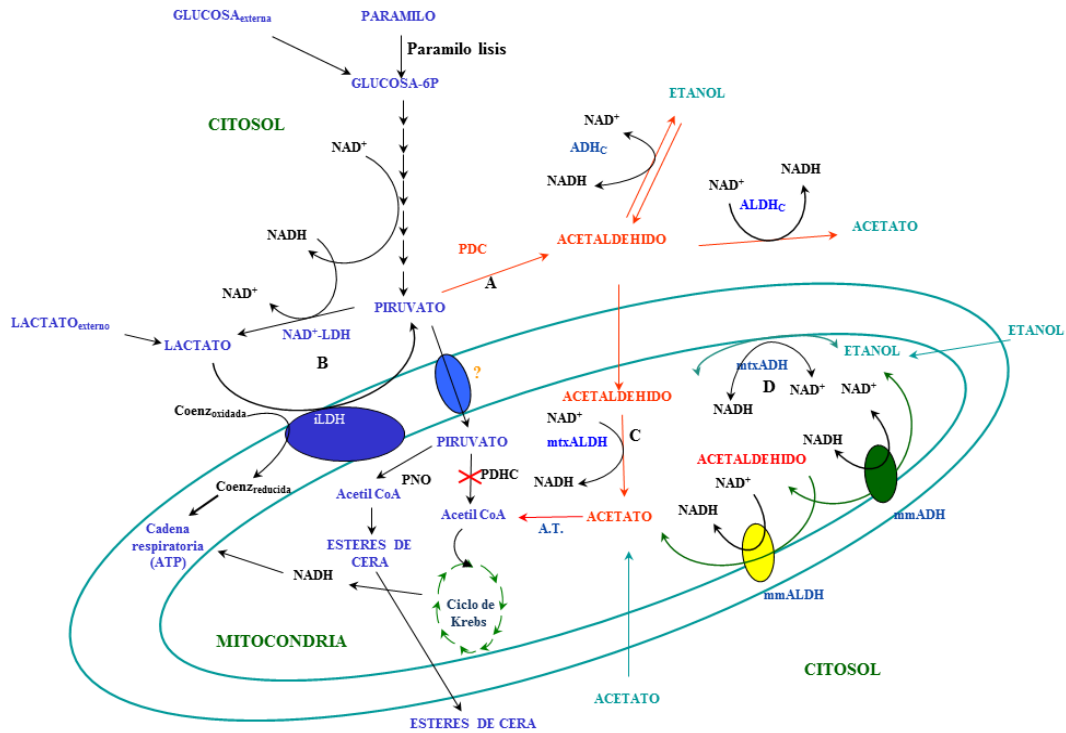
El metabolismo del etanol también ha sido ampliamente estudiado en *E. gracilis*. Se ha reportado la presencia de enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasa citosólicas y mitocondriales (Ono *et al.*, 1995; Palma-Gutiérrez *et al.*, 2008; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006; Yoval-Sánchez *et al.*, 2011).

De esta forma, se ha establecido que el mejor sustrato oxidable externo es el etanol y cuando éste se agota, la degradación de paramilo por la glucólisis produce altas cantidades de D- y L-lactato, los cuales alimentan a la cadena respiratoria para la síntesis de ATP.

La mitocondria de *E. gracilis* fotosintética es un organelo que produce ATP en presencia o ausencia de  $\text{O}_2$  (Buetow, 1989; Kitaoka *et al.*, 1989). En anaerobiosis, la piruvato  $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa (PNO) es la enzima clave para la fermentación de los ésteres de cera. El acetil CoA producido por la PNO es usado como precursor y como donador de carbono para la síntesis de ácidos grasos en la mitocondria, consumiendo los electrones provenientes del catabolismo de la glucosa (Inui *et al.*, 1985; Kitaoka *et al.*, 1989). Los ácidos grasos son reducidos y esterificados, generando ceras que se acumulan en el citosol (Buetow, 1989). Cuando las condiciones aeróbicas regresan, los ésteres de cera se catabolizan por  $\beta$ -oxidación y fosforilación oxidativa para sintetizar paramilo. Bajo condiciones aeróbicas, alcoholes y aldehídos alifáticos son producidos a partir de la degradación de ésteres de cera en el citosol (Inui *et al.*, 1986). Posiblemente las diferentes aldehído y alcohol deshidrogenasas expresadas por *Euglena* podrían estar involucradas en el metabolismo de alcoholes alifáticos, producidos durante la degradación de esteres de cera. Los alcoholes y aldehídos grasos son poco solubles en agua, por lo que interactúan preferentemente con la membrana. La presencia de estas enzimas (ADHs y ALDHs) en la membrana mitocondrial interna podría favorecer la

utilización de etanol y acetaldehído, previniendo su efecto tóxico en la cadena respiratoria (Yoval-Sánchez *et al.*, 2011).

El metabolismo mitocondrial ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, se conoce muy poco sobre el metabolismo del cloroplasto. ¿Quién aporta más ATP cuando *E. gracilis* se cultiva fotoheterotróficamente, el cloroplasto o la mitocondria? La respuesta a esta pregunta aún no es clara, para conocer la respuesta, se requiere regresar al estudio del cloroplasto bajo condiciones de cultivo no óptimas.



**Figura 1.6.3. Esquema del metabolismo energético en *E. gracilis*.**

PDC, piruvato descarboxilasa; ALDHc, alcohol deshidrogenasa citosólica; nLDH, lactato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>; iLDH, lactato deshidrogenasa independiente de NAD<sup>+</sup>; ALDHc, aldehído deshidrogenasa citosólica; mtxADH, alcohol deshidrogenasa de la matriz mitocondrial; mtxALDH, aldehído deshidrogenasa de la matriz mitocondrial; mmADH, alcohol deshidrogenasa de la membrana mitocondrial; mmALDH, aldehído deshidrogenasa de la membrana mitocondrial; PDHC, complejo piruvato deshidrogenasa; AT, acetato tiocinasa. **A:** Reportada por Hurlbert & Rittenberg (1962). **B:** Descrita por Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez (2003). **C:** Caracterizada por Rodríguez-Zavala *et al.* (2006). **D:** Reportada por Ono *et al.* (1995). Modificado de Yoval-Sánchez *et al.* (2011).

## 2. JUSTIFICACION

En las últimas décadas, las diferentes actividades humanas han provocado un aumento considerable en los niveles de metales pesados en el ambiente, generando así un grave problema de contaminación ambiental, con grandes repercusiones en la economía y en la salud pública.

Debido a esto, en diferentes partes del mundo han surgido nuevos proyectos enfocados en los procesos de biorremediación, donde a partir del estudio de los mecanismos de resistencia y tolerancia a metales pesados se han propuesto gran cantidad de microorganismos con capacidad de remover contaminantes de la hidrósfera, litósfera y atmósfera.

A fin de mejorar estos procesos biotecnológicos, los mecanismos de resistencia y tolerancia a metales pesados en *E. gracilis* han sido ampliamente evaluados en condiciones aeróbicas; sin embargo, poco se sabe acerca de su metabolismo en ausencia de cantidades significativas de oxígeno, aún cuando hay evidencias que sugieren la presencia de un metabolismo energético anaerobio alterno o posiblemente simultáneo, como parte de su plasticidad metabólica intrínseca.

Los estudios de laboratorio no siempre se ajustan a la realidad, siendo el principal impedimento para la correcta aplicación de procesos biotecnológicos de nueva generación. Un matraz de laboratorio no es igual a un biorreactor de grandes dimensiones, por lo que es conveniente tomar en cuenta estas diferencias operacionales a fin de asemejar las condiciones reales de los procesos biotecnológicos e industriales. En gran cantidad de estudios recientes se sugiere una serie de experimentos en forma de escalafón para minimizar estas brechas operacionales.

Se considera que las condiciones de luz-obscuridad así como la presencia de varias fuentes de carbono y cambios en la concentración de oxígeno propuestas en este proyecto, son semejantes (en mayor grado) a las existentes en biorreactores y fotobiorreactores utilizados para el tratamiento de aguas residuales y la obtención de metabolitos de interés biotecnológico.

Por otro lado, uno de los principales efectos tóxicos del cadmio es el aumento del estrés oxidativo, como consecuencia de la disminución de metabolitos y enzimas antioxidantes, principalmente en los niveles de glutatión, lo que favorece un daño celular en presencia de especies reactivas del oxígeno (EROs).

La producción de EROs es común en condiciones aeróbicas, debido al metabolismo de los complejos *bcl* y *b6f* de mitocondrias y cloroplastos, respectivamente, pero ¿la resistencia y tolerancia a cadmio es dependiente de la concentración de oxígeno? ¿La disminución de EROs ayudará a contrarrestar el efecto tóxico de los metales? ¿Existe una disminución de EROs cuando el oxígeno libre disminuye? ¿En una cepa fotosintética existe una disminución considerable de oxígeno suficiente para generar cambios metabólicos? En este trabajo se pretende responder algunas de estas interrogantes.

Las células serán expuestas a cadmio, ya que este metal posee características químicas (principalmente estabilidad electrónica) que confieren ventajas experimentales en las condiciones de cultivo propuestas en este proyecto, en comparación con otros metales con más de un estado de oxidación.

En este proyecto se pretenden abordar aspectos bioquímicos y microbiológicos involucrados en la plasticidad metabólica de *E. gracilis* y su comprobada capacidad para resistir y tolerar el efecto tóxico de los metales pesados.



### **3. HIPÓTESIS**

Debido a su plasticidad metabólica *Euglena gracilis* será capaz de resistir y remover el cadmio en condiciones de microaerofilia.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica cultivada en medio anaerobio

#### **4.2. Objetivos particulares**

- Definir la fuente de carbono más adecuada para el crecimiento de *E. gracilis* en medio anaerobio
- Determinar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el crecimiento celular
- Cuantificar el consumo de sustratos (malato, glutamato y glucosa)
- Cuantificar la actividad de enzimas involucradas en el consumo de sustratos (enzima málica, malato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa)
- Evaluar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en la actividad fotosintética y la respiración celular
- Determinar la acumulación y remoción de  $\text{Cd}^{2+}$
- Determinar el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en el contenido de moléculas con grupos tiol

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Preparación de medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo en presencia y ausencia de oxígeno. La composición química de este medio se muestra en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Composición química del medio anaerobio y aerobio (pH inicial 3.5)

<b>Componentes tipo 1</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Concentración</b>	<b>Componente tipo 2</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Concentración</b>
Fosfato de amonio	NH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 mM	Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	110 mM
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1.0 mM	Malato	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	15 mM
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM	Glutámico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	34 mM
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.14 mM	Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>	15%
<b>Minerales traza A</b>			<b>Componentes tipo 3</b>		
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.24 mM	Cisteína	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	0.2 g/L
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.04 mM	Sulfuro de sodio	Na <sub>2</sub> S*9H <sub>2</sub> O	0.05 g/L
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.003 mM	Rezasurina	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NN <sub>a</sub> O <sub>4</sub>	0.001%
<b>Minerales traza B</b>			<b>Componentes tipo 4</b>		
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.032 mM	Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.002
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.097 mM	Vitaminas	-	1.0%

Los componentes del medio han sido clasificados en cuatro tipos de acuerdo a su naturaleza química y su función en el medio de cultivo. Los componentes tipo 1 son metales y minerales traza esenciales para el crecimiento de *Euglena gracilis*. Su concentración ha sido modificada por Jasso-Chávez *et al.* (2010) a partir de la composición del medio reportado por Hutner (1954). Los componentes tipo 2 son las fuentes de carbono. Los tipo 3 son componentes característicos de los medios anaerobios. La cisteína y el sulfuro de sodio son agentes reductores (reaccionan con el oxígeno y generan un ambiente reductor) y la rezasurina es un indicador de estado oxido-reducción. La concentración fue tomada de Lira-Silva (2011). Los componentes tipo 4 son una mezcla de tiamina 0.03 mM, cianocobalamina 0.2 µg/mL, FeCl<sub>3</sub> 0.2 mM y CaCl<sub>2</sub> necesarios para el crecimiento de *E. gracilis*.

### 5.1.1. Medio anaerobio

El medio anaerobio se preparó dentro de una cámara de anaerobiosis (COY laboratory products, Grass Lake, Michigan, USA), la cual contiene 80% N<sub>2</sub>, 15% CO<sub>2</sub> y 5% H<sub>2</sub>. Los componentes tipo 1 y tipo 2 fueron mezclados en agua milli Q (Ver Anexo 11.2). Se ajustó el pH a 3.5 con NaOH y se dejó en constante agitación y burbujeo con una bomba peristáltica durante 2 horas. Pasado el tiempo, se agregó la cisteína y 30 minutos después el sulfuro de sodio anaerobio. Inmediatamente, 50 mL de medio fueron vertidos en frascos con 100 mL de capacidad, los cuales fueron sellados herméticamente con un tapón de hule y anillo metálico. Los frascos fueron esterilizados en la autoclave a 20 libras de presión y 125 °C por 45 minutos y almacenados a temperatura ambiente, en un lugar alejado de la luz solar.

*Nota aclaratoria:* La cantidad de CO<sub>2</sub> dentro de cada frasco es igual a la cantidad presente en la cámara de anaerobiosis (15% v/v).



Figura 5.1.1. Elaboración de medio de cultivo. (A) Cámara de anaerobiosis. (B) Frasco con medio aerobio y (C) frasco con medio anaerobio. La resazurina es utilizada para monitorear el estado redox del medio de cultivo (rosa= oxidado, incoloro= reducido).

### 5.1.2. Medio aerobio

El medio aerobio se preparó fuera de la cámara de anaerobiosis. En agua mili Q se mezclaron los componentes 1 a 3 y se ajustó el pH a 3.5 manteniendo una agitación constante sin burbujeo. Posteriormente, 100 mL de medio fueron vertidos en matraces con capacidad de 250 mL los cuales fueron cerrados con tapones de algodón y papel aluminio. Los frascos fueron esterilizados en la autoclave a 20 libras de presión y 125 °C por 45 minutos y almacenados a temperatura ambiente, en un lugar alejado de la luz

solar. La cantidad de CO<sub>2</sub> dentro de cada frasco es igual a la cantidad presente en el ambiente (trazas).

## 5.2. Crecimiento celular y exposición a cadmio

Se utilizaron cultivos axénicos de *Euglena gracilis* (Klebs) fotosintética (Cepa Z). Para evaluar el efecto del metal, en matraces con medio aerobio o anaerobio se añadieron diferentes concentraciones de cadmio (2, 25, 100, 175 y 300 μM) a partir de un stock calibrado de CdCl<sub>2</sub> (anaerobio y estéril). Todos los cultivos se iniciaron a partir de un inóculo de 2x10<sup>5</sup> células por mL y fueron incubados durante 17 y 10 días (cultivos con medio anaerobio y aerobio) respectivamente, con un fotoperiodo de 12 horas (luz blanca de 60-70 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a 25 ± 2 ° C. El metabolismo activo de las células generó oxígeno fotosintético transformando el medio de cultivo anaerobio a uno microaerófilico, sin embargo, la concentración de oxígeno nunca llegó a ser más alta de 2% (ver resultados). De esta forma, en adelante se nombrará como cultivos microaerófilicos a aquellos que se prepararon inicialmente como anaerobios.

Para evaluar el crecimiento celular se siguieron tomando alícuotas del medio de cultivo a diferentes tiempos bajo condiciones de esterilidad. Las células fueron contadas con un hemocitrómetro (Cámara de Neubauer) después de una dilución apropiada e inmovilización con 10 μL de HCl (5 % v/v).

La viabilidad celular fue determinada después de la incubación con 0.025% (w/v) de azul tripano por 10 minutos a temperatura ambiente. En las células viables, el azul tripano no es absorbido, pero éste sí atraviesa la membrana de células muertas.

Una vez que las células llegaron a la fase estacionaria de crecimiento, se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se midió el pH (final) y se tomó una alícuota para medir metabolitos y cadmio. El botón de células fue resuspendido y lavado con buffer KME pH 7.2 (120 mM KCl, 10 mM MOPS y 1mM EGTA). El MOPS (ácido 3-(N-morpholino)propanesulfónico) permite amortiguar cambios en el pH en sistemas biológicos con pH cercano al neutro. Además, se utilizó un agente quelante de metales (EGTA: ácido etileno glicol tetraacético) para eliminar las trazas de metales utilizados en el medio de cultivo.

Nuevamente, del sobrenadante se tomó una alícuota para cuantificar el cadmio (primer lavado); las células fueron resuspendidas con KME y almacenadas a -72° C en presencia de 1 mM de DTT (ditiotreitól), el cual mantiene reducidos los grupos tiol y permite la conservación y estabilidad de las muestras por un lapso de tiempo largo.

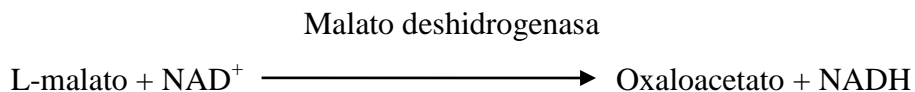
### 5.3. Cuantificación de metabolitos

Se evaluó el consumo de las fuentes de carbono por diferentes técnicas. Para ello, se tomaron alícuotas del medio de cultivo en diferentes etapas del crecimiento. Las células fueron eliminadas por centrifugación y las muestras (sobrenadantes) fueron almacenadas a  $-72^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 5.3.1. Malato

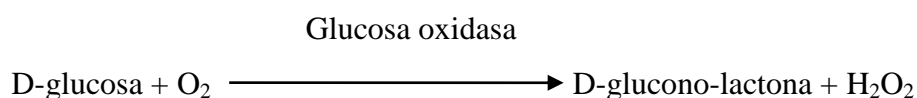
El malato fue cuantificado enzimáticamente por espectrofotometría a 340 nm añadiendo 1.8 mL de buffer de glicina-hidracina (500 mM- 400 mM) pH 9.0, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NAD}^{+}$ , 10  $\mu\text{L}$  de la enzima malato deshidrogenasa comercial (dilución 1:10 U) y 25  $\mu\text{L}$  de la muestra. En este sistema se cataliza la oxidación del L-malato a oxaloacetato en presencia de  $\text{NAD}^{+}$ , generando NADH, el cual absorbe a 340 nm.

El equilibrio de esta reacción está desplazado en gran medida hacia la izquierda bajo condiciones termodinámicas estándar, pero favorecerse la formación de NADH mediante la remoción de los productos de la reacción. Se utiliza un medio alcalino para disminuir la concentración de  $\text{H}^{+}$  y el oxaloacetato es atrapado como un derivado de hidracina.



#### 5.3.2. Glucosa

La glucosa fue cuantificada utilizando glucosa oxidasa midiendo el consumo de oxígeno polarográficamente. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa formando así el peróxido de hidrógeno y D-glucono-lactona.



Se utilizó un buffer de acetato 50 mM, pH 5.1. La solubilidad del oxígeno a  $37^{\circ}\text{C}$  a una altitud de 2240 msnm es de 340 natg de oxígeno en un volumen de 1.7 mL de buffer.

#### 5.3.3. Glutamato

El glutamato fue cuantificado por HPLC en una columna C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, Waters Spherisorb). La columna se equilibró con un buffer de fosfatos 20 mM, pH

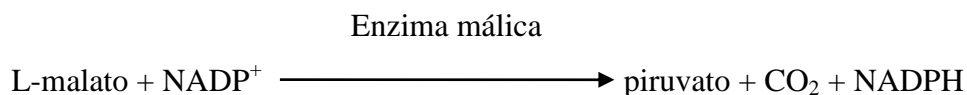
7.8 (fase acuosa) y un buffer compuesto por metanol 45% (v/v), acetonitrilo al 45% (v/v) y agua 10% (v/v) (fase orgánica). La etapa de separación consistió en un gradiente que va de 10% a 90% fase orgánica durante 15 minutos. Las muestras fueron derivatizadas post-columna y el glutamato detectado por absorbancia a 338 nm, después de 3 minutos de reacción con 0.1  $\mu$ M de OPA (orto-ftaldehído). Este compuesto amarillo se utiliza como un reactivo fluorescente muy sensible para ensayar aminas o sulfhidrilos en solución, principalmente en la identificación de aminoácidos. Se utilizaron estándares internos de glutamato para elaborar una curva estándar e identificar cada uno de los picos obtenidos de las muestras, basados en el tiempo de retención.

#### **5.4. Cuantificación de la actividad específica de enzimas**

Se utilizaron extractos celulares para la cuantificación de las actividades enzimáticas. Para la elaboración de los extractos se utilizaron células cosechadas y lavadas con buffer KME pH 7.2, las cuales se rompieron por sonicación mediante 3 ciclos de 10 segundos con 1 minuto de reposo. Los sonicados se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada por 5 min a 14, 000 rpm. Los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación las actividades enzimáticas.

##### **5.4.1. Enzima málica**

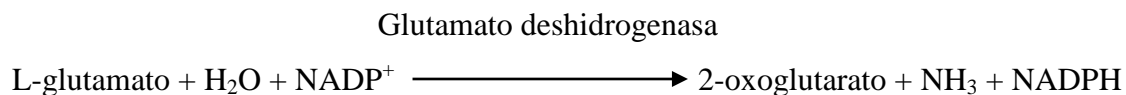
La actividad de la enzima málica fue cuantificada por espectrofotometría, añadiendo 0.9 mL de buffer de KME, pH 7.2, 5  $\mu$ L de NADP<sup>+</sup>, 50  $\mu$ L del extracto celular y 30  $\mu$ L de un stock 1 M de malato. En este sistema, la enzima málica cataliza la descarboxilación oxidativa del L- malato a piruvato en presencia de NADP<sup>+</sup>, generando NADPH, el cual absorbe a 340 nm:



##### **5.4.2. Glutamato deshidrogenasa catabólica**

La actividad de la glutamato deshidrogenasa fue cuantificada por espectrofotometría añadiendo 0.9 mL de buffer de Tris- hidracina (50 mM-400mM) pH 9.0, 10  $\mu$ L de NADP<sup>+</sup>, 50  $\mu$ L del extracto celular y 30  $\mu$ L de un stock 1 M de glutamato.

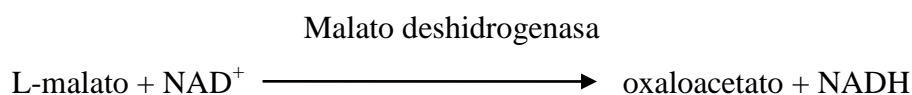
En este sistema la glutamato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L-glutamato a 2-oxoglutarato en presencia de  $\text{NADP}^+$ , generando NADPH el cual absorbe a 340 nm de acuerdo con la siguiente reacción:



#### 5.4.3. Malato deshidrogenasa

La actividad de la malato deshidrogenasa fue cuantificada por espectrofotometría añadiendo 0.9 mL de buffer de glicina- hidracina (500 mM-400mM) pH 9.0, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NAD}^+$ , 50  $\mu\text{L}$  del extracto celular y 30  $\mu\text{L}$  de un stock 1 M de malato.

En este sistema, la malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L-malato a oxaloacetato en presencia de  $\text{NAD}^+$ , generando NADH el cual absorbe a 340 nm:



#### 5.5. Cuantificación de oxígeno

El oxígeno fue cuantificado por cromatografía de gases en un equipo Shimadzu GC2010, el cual cuenta con una columna capilar HP-MOLESIEVE de 30 metros de longitud, 0.32 mm D.I., película de 25  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, USA) y un detector de tipo TCD. La muestra fue tomada a diferentes tiempos de cultivo del espacio vacío del matraz (*headspace*) con una jeringa, y tras varias purgas, se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de gas de cada matraz. Estándares de  $\text{O}_2$  (oxígeno medicinal a diferentes concentraciones) fueron inyectados para hacer la identificación de cada componente por su tiempo de retención.

#### 5.6. Medición de fotosíntesis y respiración

Los parámetros fueron medidos con un electrodo de oxígeno tipo Clark (YSI, modelo 53) en suspensiones celulares (1 mL de muestra) incubadas a 25° C en 1.7 mL de buffer KME, pH 7.2 saturado con aire. La evolución del oxígeno fue medida después de la exposición de la suspensión celular a luz actínica (1,000  $\mu\text{mol}$  quanta  $\text{m}^{-2}$   $\text{s}^{-1}$ ) proporcionada por la lámpara de un proyector de diapositivas (150 W) durante aproximadamente 5-6 minutos. El estímulo de la luz fue detenido cuando la

concentración del oxígeno disuelto llegó al 90-95% de la escala de medición. La tasa de respiración fue medida durante 5-6 minutos y se adicionó 10 mM azida de sodio para detener la actividad mitocondrial por inhibición de la citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial). Asimismo, se adicionó 10 mM de n-propilgalato para inhibir la actividad de la oxidasa alterna, la cual podría estar consumiendo el oxígeno remanente (Moreno-Sánchez *et al.*, 2000). Los valores fueron estimados considerando una solubilidad del oxígeno de 420 n átomos gramo de oxígeno por mililitro (210  $\mu\text{M}$ ) a 25° C y 2240 metros de altitud (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003).

### **5.7. Cuantificación de clorofila**

El contenido de clorofila fue medido espectrofotométricamente a 645 y 662 nm en extractos de acetona al 80% (v/v), a partir de 200  $\mu\text{L}$  de muestra. La clorofila total fue determinada utilizando la ecuación de Marker

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g}) = [20.29 * (645 \text{ nm}) + 8.05 * (662 \text{ nm})]$$

La ecuación de Marker *et al* (1980) permite convertir los valores de absorbancia en concentración utilizando el coeficiente de extinción molar.

### **5.8. Cuantificación de proteína**

El contenido de proteína total fue determinado en extractos celulares. Para la obtención de los extractos se utilizaron células cosechadas y lavadas con buffer KME pH 7.2, las cuales fueron rotas mediante 3 ciclos de 10 segundos de sonicado y 60 segundos de descanso. Los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación de la proteína total. Cantidades conocidas de la muestra (50  $\mu\text{L}$ ) fueron incubadas a temperatura ambiente con 1 mL del reactivo de Biuret durante 10 minutos. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 540 nm. Se elaboró una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA 10%, p/V) para la determinación de la concentración de proteína por interpolación de los valores.

### **5.9. Cuantificación de metales pesados**

Para la determinación de cadmio acumulado se utilizaron células cosechadas por centrifugación y almacenadas a -72° C con 1mM DTT. Después del lavado con KME pH 7.2 se tomó 1 mL del sobrenadante para cuantificar el cadmio adherido a la



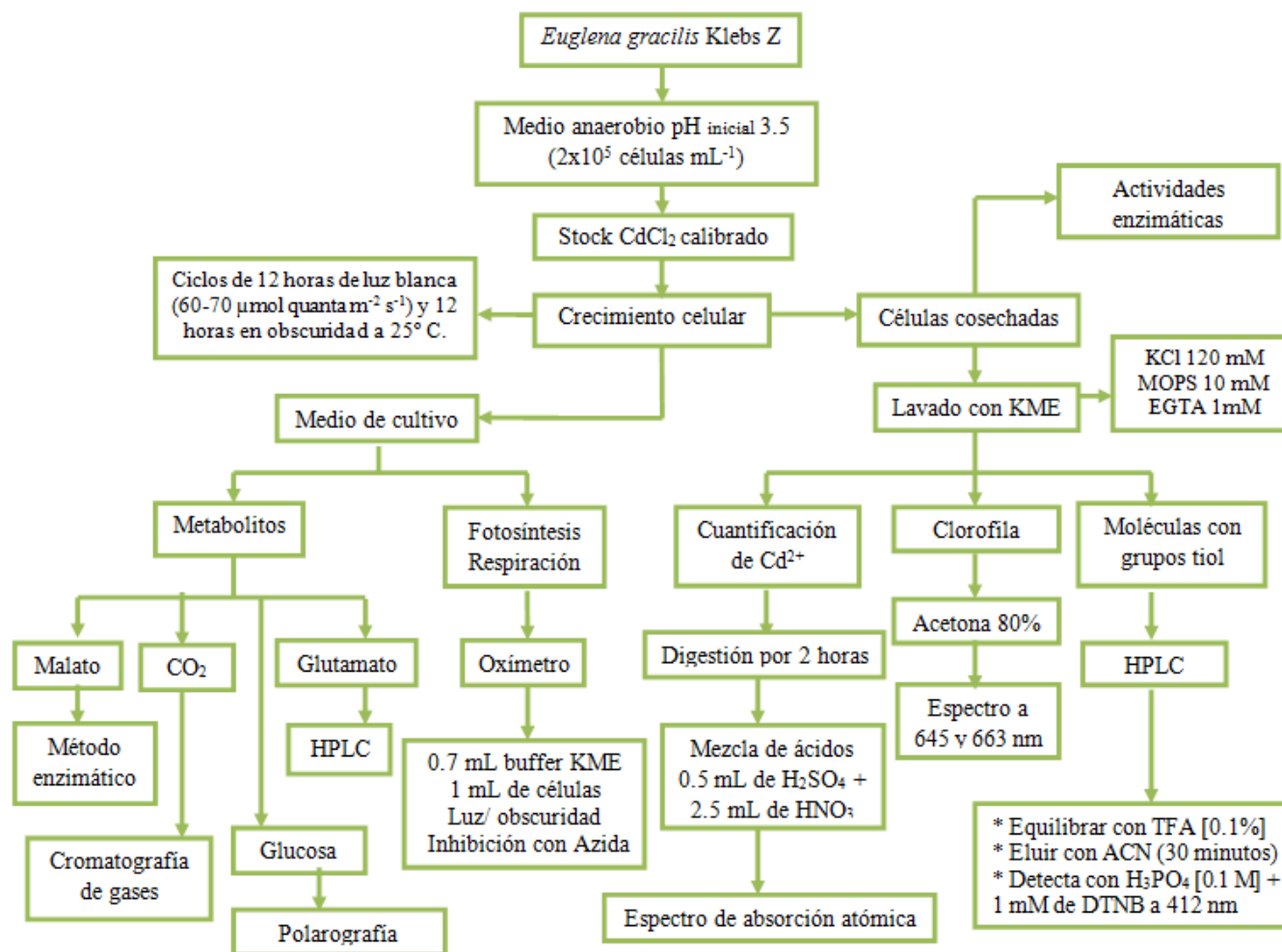
membrana. Además se tomaron alícuotas para cuantificar el tiempo cero (medio antes de inocular) y tiempo final (sobrenadante de la primera centrifugación). Las muestras fueron almacenadas a  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se procesaron digiriéndolas con 3 mL de una mezcla (1:3) de  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$  y calentandolas durante 2 horas a  $100^{\circ}\text{C}$ . Al enfriarse las muestras se aforaron a 5 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ. El cadmio se midió por espectrofotometría de absorción atómica en el equipo Varian Spectra AA 640 a una longitud de onda de 357.9 nm y usando una mezcla de aire: acetileno con un flujo de 13.5/4.5 L/min (Lira-Silva *et al.*, 2012). Se utilizó una lámpara de cátodo hueco con la que se puede cuantificar plata, cadmio, plomo y zinc. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación en una curva patrón construida con 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de cloruro de cadmio comercial (Sigma, México).

### 5.10 Cuantificación de moléculas con grupos tiol

A partir de células descongeladas y estabilizadas con 1 mM DTT, se tomó una alícuota de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, se añadió el 0.1% (p/v) de Tritón X-100 y se incubaron con un exceso de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) durante 10 minutos. El borohidruro de sodio fue añadido para reducir los grupos tiol de las muestras. Después, se adicionó PCA al 3% (p/V). Los lisados se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de PVDF Durapore (Millex®-HV) de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un equipo de HPLC con una columna C18 de fase reversa (4.6 x 150 mm, Alltech Derfiel, II, EE. UU.) La columna se equilibró con un buffer compuesto por ácido trifluoroacético al 99% (v/v) y acetonitrilo al 1% (v/v). Los compuestos tiol fueron derivatizados post-columna con 0.1 mM de DTNB y detectados a 412 nm. El coeficiente de extinción molar del DTNB a pH 8.0 fue de  $13.2\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Lira-Silva *et al.*, 2011). El Reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o DTNB) es un químico usado para cuantificar el número o la concentración de grupos tiol en una muestra, ya que los tioles reaccionan con este compuesto rompiendo el enlace disulfuro.

Se utilizaron estándares internos de cisteína y de GSH- $\gamma$ EC para hacer la identificación de cada uno de los picos obtenidos de las muestras basados en el tiempo de retención.

Figura 5.1.2. Esquema general de los métodos y técnicas



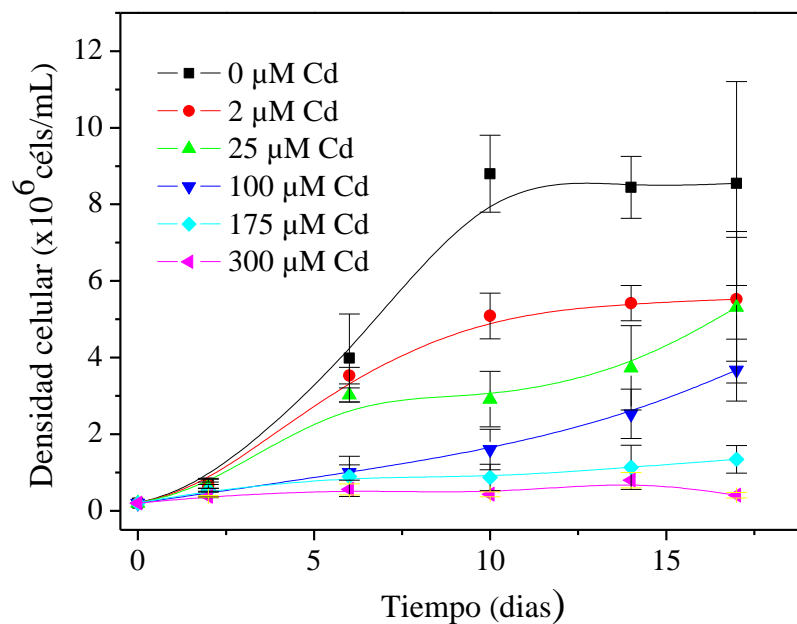
## 6. RESULTADOS

Los resultados han sido agrupados en dos partes, la primera corresponde al efecto tóxico del cadmio y la segunda a los mecanismos de resistencia y tolerancia.

### Primera parte: Toxicidad del cadmio

#### 6.1. Efecto del cadmio sobre el crecimiento celular de *Euglena gracilis* en microaerofilia

Se evaluó el efecto del cadmio sobre el crecimiento celular de *E. gracilis* cultivada en medio anaerobio y medio aerobio. A continuación se muestra la curva de crecimiento de células cultivadas en medio anaerobio:



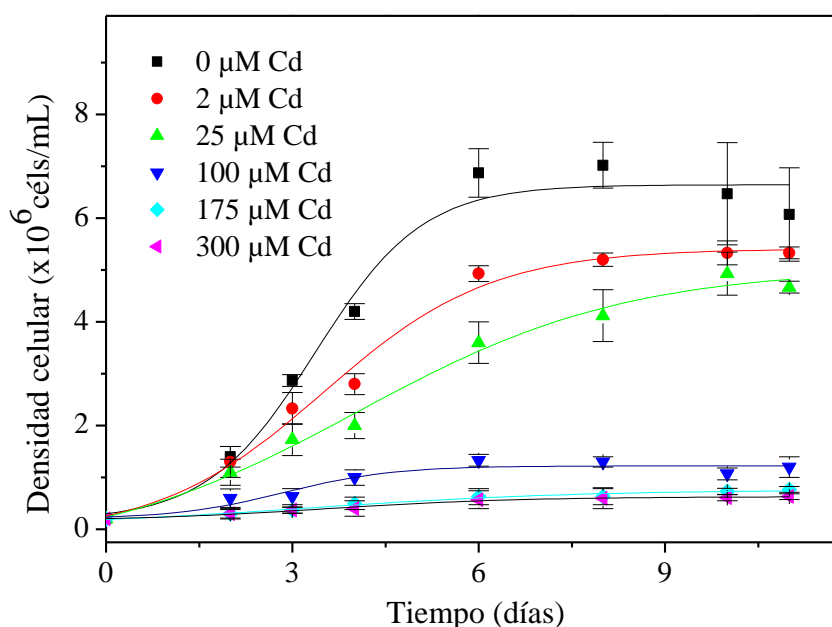
**Figura 6.1.1. Efecto del cadmio en el crecimiento celular de *E. gracilis* en microaerofilia.** Los puntos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=6$ ). Las medias son estadísticamente diferentes con  $p<0.01$  (análisis de varianza de una vía)

En la gráfica anterior se observa que *E. gracilis* fue capaz de crecer y duplicarse en medio de cultivo anaerobio. En células control se obtuvo una densidad superior a  $8 \times 10^6$  células/mL, un valor mayor a lo reportado para condiciones aerobias ( $5.3 \pm 0.9$  células/mL) (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002). Se ha reportado el crecimiento de *E. gracilis*

en efluentes anaerobios de agua procedente de plantas de tratamiento de desechos animales, donde la densidad células máxima es de  $0.118 \times 10^6$  células/mL (Park *et al.*, 2009).

Así mismo, se registró una disminución en la densidad celular en presencia de cloruro de cadmio; sin embargo, las células se duplicaron al menos en una ocasión en concentraciones elevadas del metal. Lo anterior demuestra que a pesar del efecto inhibitorio del cadmio, *E. gracilis* posee los mecanismos necesarios para duplicarse aún en condiciones de microaerofilia. La  $IC_{50}$  calculada para células en la fase estacionaria (día 17) fue de 60-75  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio.

Las células cultivadas en medio y condiciones aerobias presentaron cambios en la cinética de crecimiento, así como diferencias en la toxicidad del cadmio en comparación con la condición anterior.



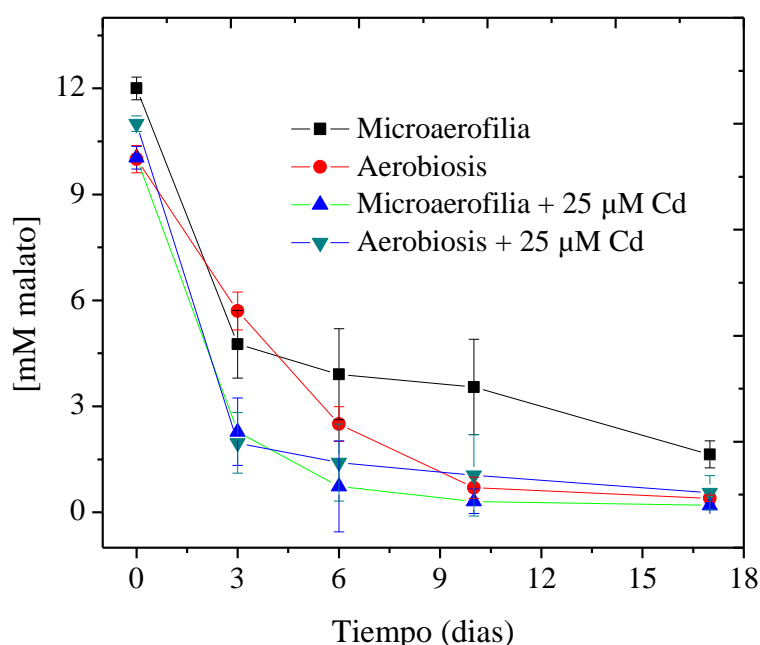
**Figura 6.1.2. Efecto del cadmio en el crecimiento celular de *E. gracilis* fotoheterotrófica en aerobiosis.** Los puntos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). Las medias son estadísticamente diferentes con una  $p < 0.05$  (análisis de varianza de una vía).

En células control se obtuvo una densidad celular similar a la reportada para *E. gracilis* fotosintética de  $6 \times 10^6$  células/mL y la inhibición de la duplicación celular en presencia de cloruro de cadmio (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002). La  $IC_{50}$  calculada para células en fase estacionaria (día 12) fue de 45  $\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio.

Si las cinéticas de crecimiento celular son comparadas, se observa que la condición de microaerofilia generó un retraso en la fase exponencial del crecimiento celular. Las IC<sub>50</sub> indicaron que el cadmio fue igualmente tóxico para células en aerobiosis y microaerofilia. A pesar de estos cambios en el crecimiento, la viabilidad celular se mantuvo mayor al 86% para células expuestas a cadmio y 99 % en células control.

## 6.2. Consumo de sustratos

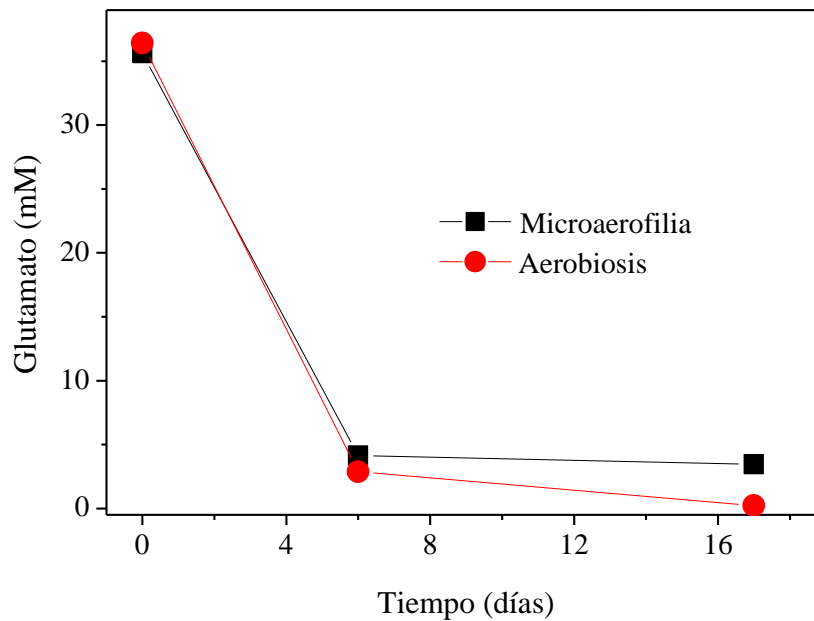
A continuación se presentan los resultados del consumo de sustratos en condiciones aerobias y microaerófilas.



**Figura 6.2.1. Consumo de malato por *E. gracilis* fotoheterotrófica.** Los puntos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las medias son estadísticamente diferentes con una  $p < 0.05$  Microaerofilia vs aerobiosis (análisis de varianza una vía)

El malato fue consumido en mayor proporción en la condición de aerobiosis, lo cual indica que posiblemente su degradación depende de la presencia de oxígeno. De igual manera, en presencia de cadmio (condición de estrés), el malato se consume en mayor proporción en aerobiosis. En todas las condiciones este sustrato es consumido en los primeros días de cultivo y en gran proporción, por lo que podría ser considerado como la principal fuente heterotrófica de carbono.

El consumo de glutamato se muestra a continuación:

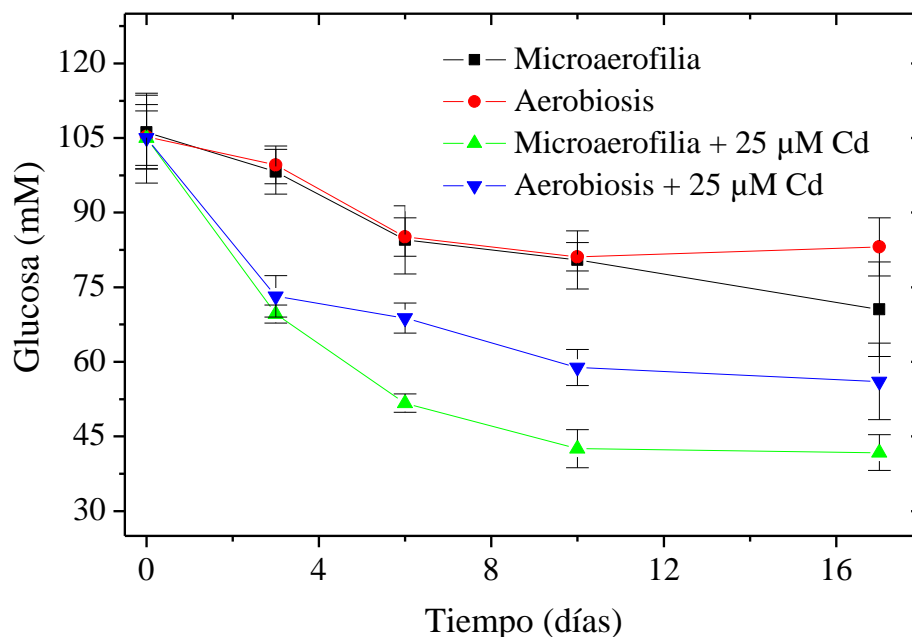


**Figura 6.2.2. Consumo de glutamato por *E. gracilis* fotoheterotrófica.** Los puntos representan la media de dos muestras independientes.

El glutamato fue consumido de forma similar en aerobiosis y microaerofilia, por lo que su degradación podría no estar relacionada con la presencia de oxígeno. Este sustrato fue consumido en los primeros días de cultivo y en gran proporción, por lo que podría ser considerado como una de las principales fuentes heterotróficas de carbono y nitrógeno. Debido a esto, el glutamato podría tener gran importancia en la formación de biomasa, junto con el malato.

En el análisis solo se muestra una  $n=2$  en condiciones control debido a complicaciones en la técnica de cuantificación del glutamato.

El consumo de glucosa en las diferentes condiciones de cultivo se muestra a continuación:



**Figura 6.2.3. Consumo de glucosa por *E. gracilis* fotoheterotrófica.** Los puntos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las medias son estadísticamente diferentes con una  $p < 0.05$  (análisis de varianza de una vía)

La glucosa fue consumida de forma diferente en microaerofilia y aerobiosis, siendo mayor el consumo en células expuestas a 25  $\mu$ M de cadmio. Los resultados anteriores sugieren que la glucosa es consumida preferentemente en condiciones de estrés; sin embargo, si el consumo es comparado con el obtenido para malato y glutamato, la glucosa no fue un buen sustrato.

### 6.3. Actividad específica de enzimas involucradas en el consumo de sustratos

A fin de determinar las vías de degradación de los sustratos, se evaluó la actividad de algunas enzimas involucradas en la degradación de malato y glutamato. A continuación se muestra una tabla comparativa de las actividades específicas de estas enzimas, determinadas a partir de extractos de células:

Tabla 6.3. Actividad específica de enzimas citosólicas

Enzima	Microaerofilia	Microaerofilia + 25 $\mu$ M Cd	Aerobiosis	Aerobiosis + 25 $\mu$ M Cd	Aerobiosis £
Málica	859 $\pm$ 451	223 $\pm$ 131	77 $\pm$ 26	9.2 $\pm$ 4.8	100
Malato deshidrogenasa	14 $\pm$ 3	46 $\pm$ 12	50 $\pm$ 20	48 $\pm$ 26	80
Glutamato deshidrogenasa	2346 $\pm$ 916	3299 $\pm$ 423	605 $\pm$ 161	129 $\pm$ 26	N.D.

£ Actividades específicas reportadas por Lira-Silva (2010) para *E. gracilis* heterotrófica cultivada en aerobiosis. Media  $\pm$  desviación estándar (n=4).  
Unidades: nmol/min\*mg proteína.

La actividad específica de estas enzimas presenta diferencias importantes en las diferentes condiciones de cultivo.

La actividad de la enzima málica fue mayor en células en microaerofilia, por lo que posiblemente el consumo de malato sea por medio de esta enzima. Aunque en presencia de cadmio la actividad de esta enzima se ve reducida, ésta sigue siendo mayor en microaerofilia. La actividad en células en aerobiosis es menor a la reportada anteriormente para células heterotróficas. .

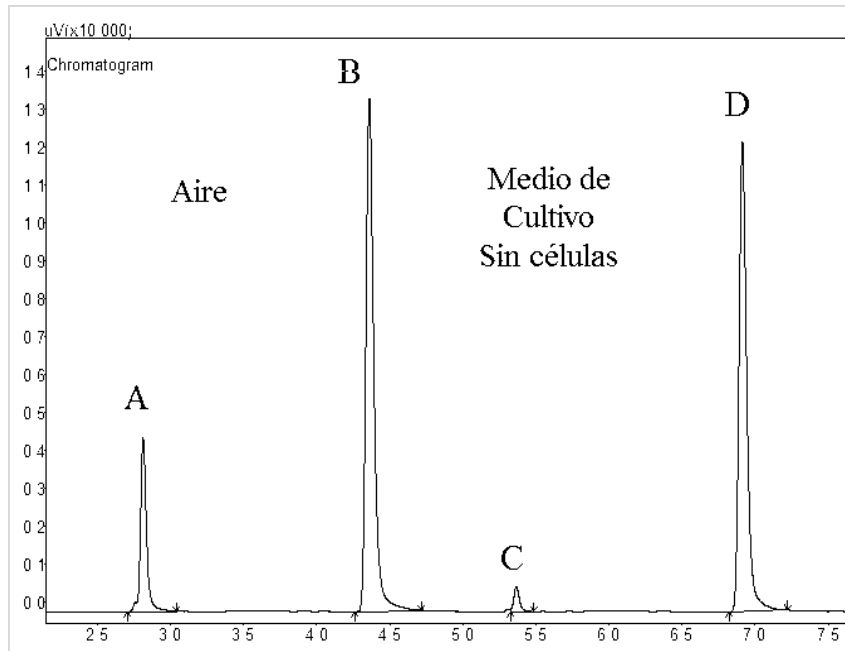
La actividad de la enzima malato deshidrogenasa fue mayor en células expuestas a cadmio, independientemente de la condición de microaerofilia o aerobiosis. En aerobiosis no hay diferencia en presencia o ausencia de cadmio. En células control se muestra una disminución importante (-5.7 veces y -16 veces, respectivamente) con respecto a la reportada anteriormente para células heterotróficas.

La glutamato deshidrogenasa resulto ser la enzima más activa, ya que su actividad fue mayor a todas las anteriores. Dicha enzima presenta su mayor actividad en células cultivadas en microaerofilia. En aerobiosis, la actividad de esta enzima disminuye en presencia de cadmio y este efecto no se observa en condiciones de microaerofilia.



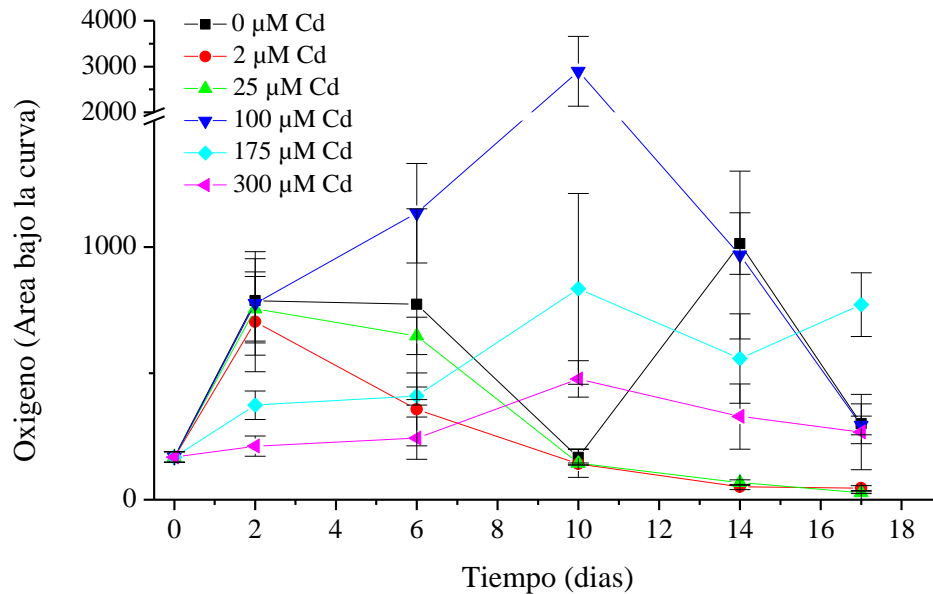
#### 6.4. Concentración de oxígeno a lo largo del cultivo

La concentración de oxígeno en los medios de cultivo fue cuantificada al inicio y durante el crecimiento celular. A continuación se muestra un cromatograma representativo de varias inyecciones.



**Figura 6.4.1. Cromatograma representativo de la concentración de oxígeno presente en los medios de cultivo.** Trazos representativos de muestras de: A) Oxígeno en aire. B) Nitrógeno en aire. C) Oxígeno en medio de cultivo sin células. D) Nitrógeno en medio de cultivo sin células.

En la figura anterior se puede observar un cromatograma representativo de inyecciones realizadas en el cromatógrafo de gases. En los pico A y B se observa la proporción de oxígeno y nitrógeno presentes en una muestra de aire. Los picos C y D representan la cantidad de oxígeno y nitrógeno presente en el espacio libre (*headspace*) del matraz que contenía medio de cultivo sin células (tiempo 0). La cantidad de oxígeno siempre fue menor a la presente en el aire ( $<5 \mu\text{M}$ ), por lo que los medios de cultivo fueron considerados anaerobios o microaerofílicos. La cantidad de nitrógeno se mantuvo constante.



**Figura 6.4.2. Concentración de oxígeno a través del tiempo de cultivo.** Los valores de área bajo la curva (UA) están normalizados a  $1 \times 10^6$  células. Los puntos representan la media de tres preparaciones independientes  $\pm$  desviación estándar.

En la figura anterior se muestran los cambios en la concentración de oxígeno a través del tiempo en cultivos de células expuestas a cadmio y células control. El medio de cultivo fue considerado anaerobio debido a que en el tiempo cero, el oxígeno estuvo prácticamente ausente, en comparación con el oxígeno ambiental, cuya área bajo la curva fue de  $27590 \pm 1248$ . En general, se pudieron observar ciclos de producción y consumo de oxígeno debido al metabolismo fotosintético y respiratorio, respectivamente. La presencia del cadmio modificó estos ciclos, posiblemente por cambios en el metabolismo energético de las células. En todas las condiciones, el oxígeno se encontró en una concentración menor al 2%, si son comparadas con el valor que representa a la concentración presente en el ambiente, aún en el pico más alto (día 10, 100  $\mu\text{M}$  Cd).

### 6.5. Actividad fotosintética y respiración celular

A fin de medir el efecto de la microaerofilia y el cadmio en el metabolismo energético, se cuantificó la actividad fotosintética y la respiración celular. A continuación se muestra una tabla comparativa de estas actividades.

Muestra	Fotosíntesis nat g O/ min x10 <sup>7</sup> células		Respiración nat g O/ min x10 <sup>7</sup> células	
	Microaerofilia	Aerobiosis	Microaerofilia	Aerobiosis
0 µM Cd	120 ± 48	319± 68	109 ± 34	190 ± 20
2 µM Cd	129± 61	214± 83	162 ± 45	119± 27
25 µM Cd	91 ± 17	462± 98	108 ± 15	272 ± 63
100 µM Cd	119± 49	202 ± 34	65 ± 33	162 ± 27
175 µM Cd	119 ± 33	332 ± 31	ND	229 ± 47

**Tabla 6.5. Efecto de la microaerofilia y el cadmio en la actividad fotosintética y la respiración celular.** Media ± desviación estándar. ND. No detectable

En general, en microaerofilia no se observaron cambios en la actividad fotosintética debido a la presencia de cadmio y el efecto es similar en aerobiosis. La actividad fotosintética en condiciones aerobias fue aproximadamente dos veces mayor con respecto a las condiciones de microaerofilia e incluso hasta de 4 veces en la condición 25 µM Cd.

En microaerofilia se determinó un patrón de inhibición de la respiración celular en presencia de cadmio. En aerobiosis no hubo inhibición de la respiración celular.

Mendoza-Cozatl *et al* (2006) reportaron una inhibición de la actividad fotosintética y la respiración celular en presencia de cadmio, sin embargo, en estos experimentos se utilizó un medio de cultivo modificado, al cual se le adicionó cisteína y sulfuro, compuestos que podrían estar provocando una disminución del efecto tóxico del metal, promoviendo la formación de complejos de cisteinato de cadmio y sulfuro de cadmio.

## Segunda Parte. Mecanismos de resistencia y tolerancia

Como mecanismos de tolerancia y resistencia a cadmio, se evaluó la bioadsorción y acumulación del cadmio, así como su efecto en el contenido de moléculas con grupos tiol.

### 6.7. Acumulación y remoción de cadmio

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la remoción de cadmio en condiciones de microaerofilia.

Tabla 6.7. Remoción de cadmio por *E. gracilis* en microaerofilia

Muestra	Cadmio teórico (nmoles)	Cadmio acumulado (nmolesx10 <sup>7</sup> cels)	Cadmio total acumulado (nmoles)	Cadmio bioadsorbido (nmoles)	Cadmio removido (nmoles)	% Remoción
0 µM Cd	0	0	0	0	0	0
2 µM Cd	30	1.9 ± 0.13	13 ± 1.4	24.3 ± 8.6	37 ± 5.2	120 ± 17.2
25 µM Cd	375	21 ± 7.8	139 ± 7.4	52 ± 27.8	191 ± 33	51 ± 8.7
100 µM Cd	1500	60 ± 10.2	275 ± 24	284 ± 12.3	560 ± 26	37 ± 1.7
175 µM Cd	5250	50.7 ± 8.5	165 ± 21	1373 ± 194	1538 ± 185	29 ± 3.5
300 µM Cd	15000	12 ± 2	25 ± 4	ND	25 ± 4	0.17 ± 0.03

Los valores son el promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar. ND: No determinado

En la tabla anterior, la primera columna hace referencia a las muestras analizadas en cultivos control y la concentración de cadmio añadida en células tratadas.

La segunda columna muestra la concentración de cadmio teórico añadida a los medios de cultivo. Este valor se obtiene considerando el volumen de la solución calibrada de cloruro de cadmio añadida y el volumen total del medio de cultivo en el que fueron crecidas las células. Para los cultivos control, 2, 25 y 100 µM de Cd se utilizaron 15 mL de medio. Para el cultivo con 175 µM de Cd se utilizaron 30 mL de

medio y para el cultivo de 300  $\mu\text{M}$  de Cd se utilizaron 50 mL de cultivo. Los volúmenes utilizados del medio fueron ajustados para obtener cantidades similares de células al final del cultivo.

La tercera y cuarta columna presentan los valores de cadmio total acumulado intracelularmente, expresados en  $\text{nmoles} \cdot 10^7$  de células y nmoles por cultivo total.

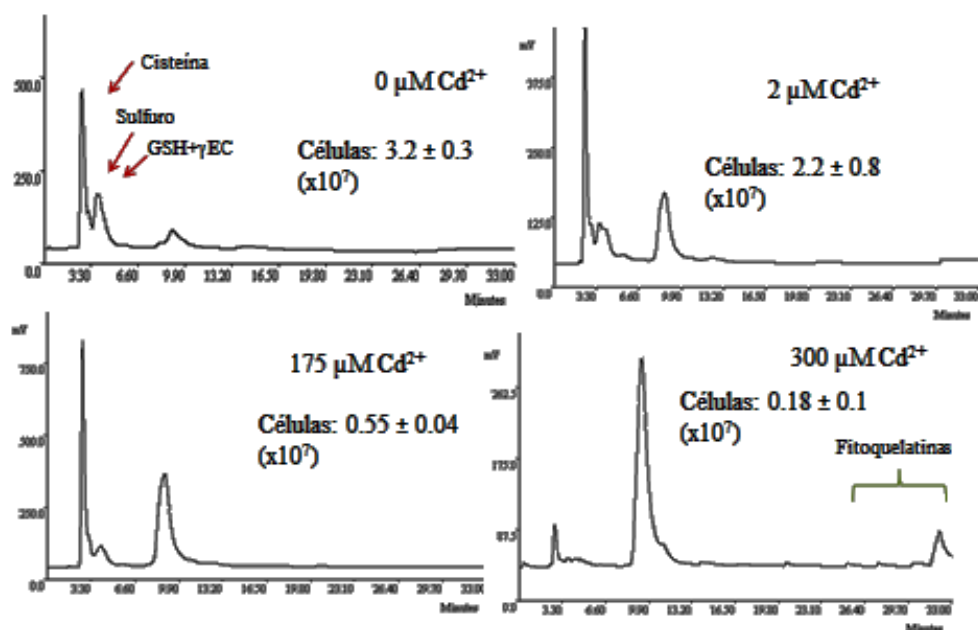
En la quinta columna se muestran los valores de cadmio total bioadsorbido, expresado en nmoles por cultivo total. Estos valores representan al cadmio que se unió a la superficie celular y que fue removido por el EGTA durante el primer lavado con buffer KME pH 7.2 para cosechar las células. El cadmio del tiempo cero, del tiempo final y del primer lavado fueron medidos y considerados para el rendimiento y la remoción total.

En las últimas dos columnas se muestra el cadmio total removido expresado en nmoles por cultivo total y en porcentaje de remoción.

En condiciones de microaerofilia, *E. gracilis* fue capaz de remover cadmio. Una parte importante de cadmio total se acumuló intracelularmente, posiblemente en el cloroplasto y la mitocondria. El cadmio bioadsorbido parece ser el mejor mecanismo de remoción, ya que este se pegó a las células en mayor proporción, obteniendo un porcentaje de remoción mayor que si solo se considera el cadmio acumulado intracelularmente.

### **6.8. Efecto del cadmio en el contenido de moléculas con grupos tiol.**

A continuación se muestran cromatogramas representativos de HPLC donde se evaluaron los cambios en el contenido celular de moléculas con grupos tiol.



**Figura 6.8.** Cromatogramas representativos del efecto del cadmio en moléculas con grupos tiol. En las cuatro figuras se muestran los valores obtenidos directamente de la inyección. El pico no señalado es el DTT en la muestra.

**Tabla 6.8.** Efecto del cadmio en el contenido de moléculas con grupos tiol en microaerofilia

Muestra	Cisteína	GSH+γEC	Fitoquelatinas totales
0 μM Cd	18.8 ± 8.3	3.1 ± 1.1	0.33 ± 0.1
2 μM Cd	21.1 ± 16.6	4.9 ± 3.0	1.32 ± 0.6
25 μM Cd	31.8 ± 18.7	5.8 ± 4.3	1.70 ± 0.6
175 μM Cd	80.5 ± 48.1	30.2 ± 16.3	2.33 ± 0.9
300 μM Cd	84.5 ± 55.7	7.2 ± 5.3	17.2 ± 4.3

Media ± desviación estándar (n=3). Unidades: nmol tiol/10<sup>7</sup> células.

La técnica permitió cuantificar el contenido de moléculas con grupos tiol involucradas en la respuesta celular frente a una exposición a cadmio, según resultados previamente descritos.

El contenido de cisteína aumentó en presencia del cadmio, en comparación con células control. La GSH+γEC presentó un aumento en células expuestas a 2, 25 y 175

$\mu\text{M}$  de Cd y una disminución importante en células expuestas a  $300 \mu\text{M}$  de Cd. La técnica no permitió la separación de estas dos moléculas, por lo cual el valor fue expresado como la suma. La síntesis de fitoquelatinas se indujo en presencia de cadmio. Debido a la ausencia de estándares para cada una de las fitoquelatinas, los picos fueron identificados por los intervalos de los tiempos de retención anteriormente reportados por Mendoza-Cózatl *et al* (2006) y agrupados como fitoquelatinas totales.

Se observó una disminución en los niveles de glutatión en células expuestas a  $300 \mu\text{M}$  de cadmio debido a que esta molécula es un precursor de las fitoquelatinas.

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

### Crecimiento celular y consumo de sustratos

En este trabajo se ha evaluado el efecto del cadmio y la microaerofilia en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica, desde una perspectiva microbiológica y bioquímica.

La exposición a cloruro de cadmio y el crecimiento en microaerofilia generaron cambios en el crecimiento y la duplicación celular de *E. gracilis*, sin embargo, su viabilidad celular no se afectó de manera significativa (>85%).

El retraso en la fase exponencial de crecimiento celular en células en microaerofilia podría deberse a cambios en el metabolismo celular, principalmente a la actividad fotosintética y el consumo de sustratos (figuras 6.1.1 y 6.1.2).

Las células fueron expuestas a cloruro de cadmio, debido a que es la especie química evaluada con mayor frecuencia; sin embargo, en la naturaleza el cadmio no solo se encuentra en forma de cloruro, en ambientes dulceacuícolas, está íntimamente asociado con la materia coloidal y está presente como  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{CdSO}_4$ . En el mar el 66% de este metal está presente como ión  $\text{Cd}^{2+}$  junto con  $\text{CdCO}_3$  (26%),  $\text{CdOH}_2$  (5%),  $\text{CdCl}_2$  (1%) y  $\text{CdSO}_4$  (1%). (Whitfield *et al.*, 1981).

Basado en estudios previos (Devars *et al.*, 1998, 2000; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2002, 2006), la disminución en la densidad celular se atribuye al efecto tóxico del cadmio, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la microaerofilia posea un papel importante en la disminución de la densidad y la duplicación celular, ya que en condiciones heterotróficas, el oxígeno es un factor metabólico limitante. Para este trabajo, *E. gracilis* fue cultivada con una mezcla de sustratos oxidables y no oxidables, por lo que su consumo no es completamente dependiente de la presencia de oxígeno.

Se ha reportado que los requerimientos de oxígeno para el crecimiento óptimo de *Euglena* dependen de la fuente de carbono utilizada; por ejemplo, el crecimiento con acetato o etanol consume de tres a cinco veces más oxígeno durante la fase logarítmica, en comparación con el crecimiento con glucosa, soportando la misma tasa de crecimiento (Cook & Heinrich, 1965). Experimentos de Boehler & Danforth (1964) sugieren que la glucosa reduce el consumo de oxígeno por represión catabólica. Asimismo, la degradación de algunos sustratos no estimula la respiración celular a niveles significativamente mayores que la tasa endógena (Cook & Carver, 1966; Wilson *et al.*, 1959).



Wilson *et al.* (1959) han sugerido que las fuentes anaerobias de energía pueden ser importantes durante el crecimiento en sustratos que no estimulan la respiración celular. De aquí la importancia de cultivar a *E. gracilis* con una mezcla de sustratos, tanto oxidables (glutamato-malato), como sustratos cuyo consumo sea independiente de la concentración de oxígeno (glucosa, vía Embden-Mayerhof-Parnas).

Por otro lado, Cook & Heinrich (1966) reportaron que en *E. gracilis* la tasa de división celular cambia sutilmente cuando se genera anaerobiosis por flujo constante de nitrógeno a 30° C; sin embargo, las condiciones de cultivo no son comparables, ya que en este trabajo la sustitución de gases (O<sub>2</sub> por mezcla de N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>) no es constante, se realiza en una sola ocasión antes de la inoculación. Además, se ha reportado que *E. gracilis* es sensible a la temperatura (crecimiento óptimo a 25° C), por lo que un incremento en este parámetro podría tener un efecto importante en la división celular y no necesariamente por la ausencia de oxígeno.

En este trabajo, la densidad celular alcanzada supera el valor reportado para *E. gracilis* fotoheterotrófica cultivada en ausencia de cantidades de oxígeno. La densidad de células del cultivo en aerobiosis es similar a la reportada anteriormente por Mendoza-Cózatl *et al.* (2002). En estudios previos se han obtenido densidades superiores a 30x10<sup>6</sup> células/mL para células cultivadas en obscuridad y aerobiosis utilizando glutamato-malato- etanol como fuentes de carbono (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011). Resulta difícil comparar la densidad celular en condiciones de microaerofilia, debido a la carencia de valores reportados. Aún en condiciones de aerobiosis resulta complicado comparar la densidad celular, debido a que este valor está íntimamente relacionado con las condiciones de cultivo y los sustratos utilizados (fotoheterotrofía vs. heterotrofía).

*E. gracilis* posee gran plasticidad metabólica, lo que le permite sobrevivir en condiciones adversas. Su mixotrofía le permite consumir gran cantidad y variedad química de sustratos, inclusive realizar fotosíntesis.

Los resultados de este trabajo sugieren que *E. gracilis* tiene la capacidad de utilizar los sustratos de diferente manera. El malato es consumido preferentemente en los primeros días de cultivo (Figura 6.2.1) tanto en aerobiosis como en microaerofilia; sin embargo, si este consumo es ajustado con la densidad celular en un tiempo t se observa que no es consumido en la misma proporción (consumo real= mM malato consumido/10<sup>6</sup> células). Esta relación también es aplicable para el consumo de glutamato y glucosa (figuras 6.2.2 y 6.2.3).

En aerobiosis, el malato y el glutamato son consumidos en mayor proporción, por lo que se infiere que estos sustratos están favoreciendo la duplicación celular y el aumento de la biomasa. En microaerofilia estos sustratos son consumidos en menor proporción.

Por otro lado, la glucosa no es buen sustrato ya que se consume preferentemente en condiciones de estrés (presencia de cadmio) y en menor cantidad con respecto al malato y glutamato. Resulta importante realizar un análisis del contenido y actividad de enzimas involucradas en el metabolismo glucolítico, así como evaluar la degradación de su principal reserva de energía, el paramilo.

Los resultados no permiten concluir si el cadmio genera cambios en el consumo de sustratos, ya que solo se evaluaron células control y una concentración de cadmio. Si el cadmio tiene un efecto en la densidad celular, posiblemente también genere cambios a nivel metabólico.

La actividad específica de las enzimas que intervienen en el consumo de sustratos fue inferior a la reportada previamente para *E. gracilis*, aunque cabe mencionar que la metodología utilizada en este trabajo para obtener los extractos celulares podría haber modificado los resultados, ya que el protocolo de sonicación fue suave en comparación con otros reportados. Posiblemente las actividades enzimáticas dependerán del estado metabólico de la célula, es decir, el día de cultivo/ fase de crecimiento y la presencia del sustrato. Además, se ha reportado que la localización subcelular y la actividad de enzimas involucradas en el consumo de malato esta regulada en gran medida por las condiciones de cultivo (pH y concentración de fuentes de carbono). A pesar de esto, se encontraron cambios importantes en las actividades enzimáticas de células cultivadas en microaerofilia y en células tratadas con cadmio, con respecto a los controles (Tabla 6.3).

Bajo las condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo, *E. gracilis* presentó un metabolismo fotoheterotrófico, al usar fuentes de carbono orgánico y energía luminosa como fuente de electrones. Lo anterior resulta importante, ya que a nivel industrial, la productividad de los cultivos de organismos fotosintéticos se ve afectada por la heterotrofia, fotoautotrofia y mixotrofia. Se ha reportado que *Haematococcus pluvialis* (microalga) puede sintetizar astaxantina en heterotrofia y mixotrofia utilizando acetato de sodio como fuente de carbono, en ambos casos la concentración del pigmento es mayor a la obtenida en condiciones de fotoautotrofia, debido en parte a que el acetato promueve la obtención de un mayor rendimiento celular (Kobayashi *et al.*, 1992).

También se ha estudiado la producción de  $\alpha$ -tocoferol con *E. gracilis* usando etanol como sustrato y la producción de este compuesto antioxidante aumentó hasta 2,9 veces con relación a lo obtenido en fotoautotrofia (Ogbonna y Tanaka, 1998). La investigación acerca de la capacidad de las microalgas y otros organismos fotosintéticos para utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico es importante, debido a que permitiría su cultivo en biorreactores más convencionales, en los que el aprovechamiento óptimo de la energía luminosa se encuentra limitada, ya sea técnica o económicamente; sin embargo este es un campo de la biotecnología que se encuentra en su fase de desarrollo inicial.

Otro punto importante en el estudio de microorganismos cultivados en altas densidades, es la tolerancia a cambios en el pH a través del tiempo de cultivo. Se ha demostrado que *E. gracilis* puede sobrevivir en un amplio intervalo de pH (2.3 a 11), pero presenta cambios principalmente en el crecimiento celular y la motilidad (Buetow, 2011). Por una parte, el pH modifica la disponibilidad de algunos sustratos (malato y glutamato) debido a sus valores de pKa. Por otro lado, el pH se ve afectado por la presencia de CO<sub>2</sub> (a mayor concentración menor pH). En un sistema cerrado (cultivo en microaerofilia), la actividad fotosintética modifica la cantidad de H<sup>+</sup> libres debido a los ciclos de consumo y producción de CO<sub>2</sub>. A nivel industrial, el pH y la concentración de CO<sub>2</sub> pueden ser fácilmente monitoreados y controlados (Camacho *et al.*, 1999).

### **Actividad fotosintética y respiración celular**

En este trabajo se demostró que *E. gracilis* puede crecer en microaerofilia, pero ¿el medio de cultivo se mantuvo en microaerofilia a pesar de la actividad fotosintética? Para responder esta pregunta se determinaron los niveles de oxígeno en el *headspace* de matraces sin células y matraces con células y si bien hay una diferencia en la concentración de oxígeno, en todas las condiciones de cultivo el oxígeno se encontró en una concentración menor al 2%, pudiéndose observarse ciclos de producción y consumo de oxígeno debido al metabolismo fotosintético y respiratorio, respectivamente.

La acumulación de O<sub>2</sub> disuelto puede representar un fuerte obstáculo para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos. Altos niveles de O<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo provocan inhibición de la fotosíntesis (Camacho *et al.*, 1999) y en condiciones extremas pueden incluso causar la muerte de las células por daño oxidativo.

A nivel industrial, en cultivos de microalgas mantenidos en exteriores en reactores planos inclinados, se pueden alcanzar concentraciones de O<sub>2</sub> de hasta 9,5mg/l

durante las horas de mayor energía radiante, lo que representa 30% más que la concentración de saturación de O<sub>2</sub> (Hu *et al.*, 1996a). En los reactores tubulares horizontales, la concentración alcanzada puede ser aún mayor (Camacho *et al.*, 1999), por lo que usar la longitud de la tubería como único parámetro de escalamiento de fotobiorreactores puede conducir a una falla total de las plantas diseñadas (Richmond, 2000). La remoción del O<sub>2</sub> producido fotosintéticamente es una necesidad al escalar reactores cerrados. En los reactores tubulares horizontales, una estrategia común es instalar etapas de aireación para remover por adsorción el O<sub>2</sub> del medio de cultivo. Después de estar en contacto con el medio de cultivo, el aire enriquecido con O<sub>2</sub> puede separarse del líquido con un desgasificador. El tiempo entre etapas de aireación depende de la velocidad lineal de crecimiento del medio de cultivo, de la distancia entre etapas de aireación y de la velocidad de fotosíntesis (Richmond *et al.*, 1993). Sin embargo, estos procesos resultan altamente costosos e innecesarios cuando se cuenta con organismos facultativos.

Debido a su plasticidad metabólica aquí demostrada, *E. gracilis* podría ser utilizada en cultivos masivos de microalgas sin necesidad de utilizar sistemas de aeración para remover el oxígeno generado, evitando así el posible daño mecánico a las células generado por los procesos de mezclado (Sánchez *et al.*, 2000).

Además, *E. gracilis* puede crecer y adaptarse fácilmente a microambientes con gradientes de concentración de nutrientes y condiciones ambientales generados comúnmente en biorreactores de grandes dimensiones.

La densidad celular es importante en el metabolismo, ya que si esta aumenta es posible evitar la fotoinhibición, aún a altas intensidades de luz incidente, pero por otro lado los efectos de sombreado entre las células se vuelven más severos debido a que la luz penetra menos en cultivos densos que en cultivos de menor densidad. En organismos fotoheterotróficos, las altas densidades celulares solo son posibles mediante una combinación de alta intensidad de luz y gran cantidad de sustratos.

### **Mecanismos de resistencia**

En la actualidad existen pocos estudios bioquímicos sobre la capacidad de *E. gracilis* para remover metales pesados a partir de cuerpos de agua, ya que gran parte de los estudios existentes solo se enfocan en el área microbiológica.

En muchos experimentos relacionados con la remoción de metales pesados se utilizan organismos de vida libre y solo se prueba un metal pesado (Kaplan *et al.*, 1995;

Carr *et al.*, 1998; Matsunaga *et al.*, 1999); sin embargo, si el organismo evaluado es propuesto para procesos de Biorremediación, resulta conveniente que este organismo sea sometido a condiciones que semejen la realidad, ya que comúnmente los cuerpos de agua están contaminados por una mezcla heterogénea de metales pesados y otros contaminantes que podrían afectar dichos procesos (Guerinot, 2000; Williams *et al.*, 2000). Se ha observado que la capacidad de transporte y unión a la célula es diferente cuando hay competencia de metales pesados o cuando hay modificaciones en la composición del medio (pH, temperatura, presencia de iones, presencia de materia orgánica, etc.).

Las células pueden utilizar diferentes mecanismos de resistencia y tolerancia dependiendo de la concentración de metales pesados, además de presentar efectos antagónicos o sinérgicos. La presencia de un metal pesado específico puede producir un efecto negativo en la desintoxicación de otro, afectando la capacidad de un organismo de acumular ambos metales pesados simultáneamente. Por el contrario, la exposición de un metal pesado específico puede estimular la respuesta de defensa ante el estrés oxidativo inducido por otro metal tóxico, mejorando condiciones desfavorables (Devars *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 2002). Debido a esto, resulta de gran importancia evaluar el efecto de otros metales pesados en cultivos microaerofílicos de *E. gracilis*.

Para fines de biorremediación, resultan de mayor importancia los mecanismos relacionados con la acumulación e inactivación celular, ya que estos procesos minimizan el efecto tóxico del metal y permiten su posterior extracción y recuperación.

Devars *et al* (1998) demostraron que células completas de *E. gracilis* Z cultivadas en fotoheterotrofia tienen la capacidad de acumular cantidades significativas de cadmio. Mendoza-Cózatl *et al* (2002) determinaron la distribución intracelular del cadmio y algunos otros metabolitos relacionados con la respuesta al estrés por cadmio en *E. gracilis*, cuyos resultados son similares a los valores reportados por Coppellotti (1989) y otros grupos (Devars *et al.*, 1998). En dicho estudio se demostró la acumulación de cadmio en el cloroplasto y el efecto en su metabolismo, donde se remarca la inhibición de la fotofosforilación, principalmente. Además, se ha reportado la acumulación de cadmio en la mitocondria de *E. gracilis* cuando es cultivada en oscuridad, con glutamato y malato como fuentes de carbono (Áviles *et al.*, 2001).

En este trabajo se determinó el cadmio total acumulado intracelularmente, cuyos valores son menores a los reportados por Mendoza-Cózatl *et al* (2002); es decir, bajo estas condiciones de cultivo, *E. gracilis* acumula un menor porcentaje de cadmio

intracelularmente. Por el contrario, en este trabajo se comprobó que las células de *E. gracilis* tienen una mayor capacidad de adsorción del metal. Resulta de gran importancia evaluar el mecanismo de adsorción del cadmio, ya que posiblemente, la membrana celular o la película de *E. gracilis* está compuesta por elementos con capacidad de secuestrar al metal.

Por otro lado, es posible que la síntesis de ésteres de cera en condiciones de microaerofilia tenga un papel importante en la remoción del metal pesado y no solo en la generación de reservas energéticas. Los ésteres de cera podrían estar modificando de manera importante el transporte intracelular del cadmio y la composición de la membrana, favoreciendo la bioadsorción del metal. Además, debido a la falta de estudios en la composición de estas moléculas no se descarta su capacidad para unir o quelar metales.

El incremento en la síntesis de moléculas con grupos tiol es un mecanismo ampliamente descrito en *E. gracilis* frente a una exposición a cadmio y otros metales (Avilés *et al.*, 2001; García-García *et al.*, 2008). El cadmio y el cromo pueden formar enlaces coordinados con grupos químicos donadores de electrones, como la cisteína, el GSH, la  $\gamma$ -EC y T (SH)<sub>2</sub> para inactivar al metal.

Los niveles de cisteína y GSH- $\gamma$ -EC en células cultivadas en microaerofilia son similares a los reportados por Lira-Silva (2011) para células cultivadas en glutamato-malato-etanol, como fuentes de carbono ( $12.5 \pm 5$  y  $3.8 \pm 1.1$  nmol tiol/ $10^7$  células, respectivamente), por lo que la presencia de oxígeno no está relacionada con la formación de moléculas con grupos tiol.

La síntesis de fitoquelatinas (PC) es un mecanismo propuesto para contrarrestar la toxicidad de los metales pesados en plantas, levaduras y algas (Gekeler *et al.*, 1988; Clemens *et al.*, 1999; Cobbett, 2000). La síntesis de PCs inducidas por cadmio en *Euglena* fueron descritas originalmente por Gekeler *et al.* (1988), pero su distribución subcelular no fue analizada. Mendoza-Cózatl *et al.* (2002) reportaron la inducción por cadmio de péptidos con grupos tiol, presuntamente PCs, presentes tanto en el citosol como en el cloroplasto. La identidad de las moléculas con grupos tiol inducidas por cadmio no fue comprobada con estándares, sin embargo, por los tiempos de retención probablemente corresponda a fitoquelatinas 2 y 3 (Mendoza- Cózatl *et al.*, 2002).

Este es el primer trabajo en donde se demuestra que el cadmio induce la síntesis de fitoquelatinas en condiciones de microaerofilia. Además, se propone que el cadmio no entra solo a la célula, sino que forma complejos con moléculas con grupos tiol, como

se ha reportado anteriormente. Debido a las condiciones de cultivo, las principales especies químicas que entran a la célula y que provocan los efectos descritos en este trabajo son el cisteinato de cadmio y el sulfuro de cadmio.

Por sí sola, la microaerofilia genera cambios a nivel celular y modifica los mecanismos de defensa contra el efecto tóxico del metal, sin embargo, los componentes químicos adicionados al medio de cultivo podrían tener mayor relevancia en contrarrestar el efecto tóxico del cadmio.

## 8. CONCLUSIONES

- *Euglena gracilis* cultivada en microaerofilia, fue capaz de contender con el efecto tóxico del cadmio, alcanzando una gran densidad celular.
- El cadmio generó un retraso en la fase exponencial en células en microaerofilia con respecto a las células en aerobiosis.
- El malato y glutamato fueron consumidos preferentemente (> 90%) y de manera similar en ambas condiciones, mientras que la glucosa parece no ser un buen sustrato.
- La presencia de cadmio generó fluctuaciones en los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, posiblemente debido a modificaciones en el metabolismo.
- La actividad fotosintética en condiciones aerobias fue aproximadamente dos veces mayor con respecto a las condiciones de microaerofilia e incluso hasta de cuatro veces en la condición 25 μM Cd. En microaerofilia se determinó un patrón de inhibición de la respiración celular en presencia de cadmio.
- Los niveles de cisteína aumentaron proporcionalmente en células tratadas con CdCl<sub>2</sub> y en altas concentraciones de cadmio se indujo la síntesis de fitoquelatinas.
- En condiciones de microaerofilia, la adhesión del metal a la superficie celular parece ser el principal mecanismo de remoción de cadmio en comparación con la acumulación intracelular.
- La adaptación a diferentes condiciones de estrés (cambios en la concentración de oxígeno y presencia de cadmio) es una característica de *E. gracilis*.
- Este es el primer reporte de un microorganismo fotosintético con capacidad de acumular metales pesados en presencia y ausencia de oxígeno
- *Euglena gracilis* podría ser considerado como un microorganismo apto para procesos de biorremediación de aguas contaminadas (cadmio) en bioreactores anaerobios.



## 9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se determinó el efecto del cadmio en *E. gracilis* fotoheterotrófica cultivada en medio anaerobio, desde una perspectiva microbiológica y bioquímica. Los resultados obtenidos permiten proponer un seguimiento de este trabajo en varios aspectos a fin de complementarlo y conocer más acerca de la plasticidad metabólica de *E. gracilis* y su capacidad para adaptarse a gran cantidad de ambientes adversos y contrastantes.

Con base en antecedentes de diversos grupos de trabajo, resultaría interesante enfocarse en un futuro próximo en los siguientes puntos:

- Determinar el efecto de otros metales pesados ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ , entre otros) en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica bajo condiciones de microaerofilia y dilucidar los mecanismos de tolerancia y resistencia involucrados, así como evaluar efectos antagónicos o sinérgicos de estos metales y su efecto en células pretratadas con ellos.
- Probar otras fuentes de carbono para determinar cuál es la más adecuada para el crecimiento óptimo de *E. gracilis* en condiciones de microaerofilia, por ejemplo, etanol, acetato o lactato.
- Evaluar la participación de los ésteres de cera en la adaptación a ambientes adversos y contrastantes, más allá de su utilización como reserva de energía. Estas moléculas posiblemente modifiquen la composición de la membrana celular o el transporte interno del metal a fin de inactivarlo o expulsarlo, debido a que en este trabajo se encontró que el mecanismo más importante de tolerancia a cadmio es su bioadsorción.
- Caracterizar y evaluar la participación de los componentes de la película y la membrana celular de *E. gracilis* en los mecanismos de resistencia a metales pesados.
- Evaluar a fondo la participación del cloroplasto en los mecanismos de resistencia a metales pesados, así como los cambios a nivel molecular y celular frente a una exposición.

Existen muchos aspectos que podrían ser tomados en cuenta para estudios posteriores, los cuales podrían ayudar a comprender aspectos celulares y evolutivos de *E. gracilis* y generar aplicaciones biotecnológicas de grandes dimensiones.

## 10. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Avilés RC. 2001. Mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena gracilis* heterotrófica. Tesis de Maestría en Ciencias (Especialidad en Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM.
2. Avilés RC, Loza-Tavera H, Terry N, Moreno-Sánchez R. 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch Microbiol 180:1–10
3. Avilés RC, Torres-Márquez ME, Mendoza-Cózatl D & Moreno-Sánchez R. 2005. Time-course development of the Cd<sup>2+</sup> hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 184, 83–92.
4. Babich H & Stotzky G. 1978. Effect of cadmium on the biota: Influence of environmental factors. Appl. Environ. Microbiol. 23: 55-117
5. Bariaud A, Bury M, Mestre JC. 1985. Mechanism of Cd<sup>2+</sup> resistance in *Euglena gracilis*. Physiol Plant 63:382–386
6. Bruins MR, Kapil S & Oehme FW. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 45: 198–207.
7. Buetow, DE (Ed.) 1989. The Biology of Euglena, vol. III. Academic Press, New York.
8. Buetow, DE (Ed.) 1989. The Biology of Euglena, vol. IV. Academic Press, New York, pp. 247–314.
9. Castro-Guerrero NA, Jasso-Chávez R & Moreno-Sánchez R, 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1710: 113–121.
10. Castro-Guerrero NA, Rodríguez-Zavala JS, Marín-Hernández A, Rodríguez-Enriquez S, Moreno-Sánchez R. 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd<sup>2+</sup> stress in *Euglena*. J. Bioenerg. Biomembr. 40: 227-235.
11. Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzman JC, et al. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol Rev 25:335–347
12. Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez IL, Rivera-Cano ME, Ávila-Rodríguez A, Wróbel-Kaczmarczyk K, Wróbel-Zasada K, Gutiérrez-Corona JF, Rodríguez-Zavala JS & Moreno-Sánchez R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. Rev Latinoam Microbiol. 48 (2): 203-210.
13. Cheniae GMI. 1963. Lipid metabolism of photosynthetic tissues. I. Fatty acid synthesis by extracts of *Euglena*. Biochim. Biophys. Acta 70:504-516.
14. Coleman LW, Rosen BH & Schwartzbach SD. 1988. Environmental control of carbohydrate and lipid synthesis in *Euglena*. Plant Cell Physiol 29:423–432

15. Coppellotti O. 1989. Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 94: 35-40.
16. Cunninghamm & Ow, 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* (110) 715- 719.
17. Devars S. 2008. Mecanismos de tolerancia a metales pesados en *Euglena gracilis*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias.
18. Devars S, Torrez-Márquez E, Gonzalez-Halpen D, Uribe A & Moreno-Sánchez. 1992. Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 82: 37-46.
19. Devars S, Hernández R, Moreno-Sánchez R. 1998. Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by pre-exposure to mercury or cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34:128- 135.
20. Devars S, Avilés RC, Cervantes C, Moreno-Sánchez R. 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 174: 175-180.
21. Dhankher P, Li Y, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA & Meagher RB. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology.* 20: 1140-1145.
22. Duffus JH. 2002. “Heavy metals” a meaningless term? IUPAC technical report. *Pure Appl Chem.* 74: 793-807.
23. Einicker- Lamas M, Oliveira AJF & Oliveira MM. 1995. Presence of multidrug resistance P-glycoprotein in *Euglena gracilis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 90. (Suppl.I) 274.
24. Einicker-Lamas M, Soares MJ, Soares MS & Oliveira MM. 1996. Effects of cadmium on *Euglena gracilis* membrane lipids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 941–948.
25. Einicker-Lamas M, Morales MM, Miranda K, García-Abreu J, Oliveira AJF, Silva FLS & Oliveira MM. 2003. P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *J. Comp. Physiol. B* 173: 559-564.
26. Fernández-Leborans G & Novillo A. 1996. Protozoa communities and contamination of several fluvial systems. *Water Environ Res* 68(3): 311-319.
27. Flores CC, Peña-Castro JM, Flores-Cotera LB *et al.* 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *INCI.* Vol.28, no.8, p.450-456.
28. Foltinova P & Grones J. 1997. *Euglena gracilis* as an eukaryotic test organism for detecting mutagens and antimutagens. *Mutation Research.* 393: 1-6
29. García-García JD, Rodríguez-Zavala JS, Jasso-Chávez R, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez. 2009. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 191: 431-440.

30. González- Moreno S, Gómez-Barrera J, Perales H & Moreno-Sánchez R. 1997. Multiple effects of salinity on photosynthesis of protist *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 101: 777-786.
31. Grobbelaar JU. 2000. Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* 12: 201-206.
32. Gudin C & Chaumont D. 1983. Cell fragility - the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Biores. Technol.* 38: 145-151.
33. Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. 2002. Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 159:445- 448.
34. Hernández Navarro A. 2003. Expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a cadmio: análisis diferencial por la técnica de AFLP. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
35. Hurlbert RE & Rittenberg SC. 1962. Glucose metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; growth and enzymatic studies. *J. Protozool.* 9: 170-182.
36. Inui H, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1982. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett* 150:89–93
37. Inui H, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1984. Occurrence of oxygen-sensitive, NADP<sup>+</sup>-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 96: 931-934.
38. Inui H, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1985. The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 270-276.
39. Inui H, Ohya O, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1986. Assimilation and metabolism of fatty alcohols in *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 875:543–548
40. Inui H, Ono K, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1987. Purification and characterization of pyruvate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 262: 9130-9135.
41. Inui H, Yamaji R, Saidoh S, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1991. Pyruvate: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *Euglena gracilis*: limited proteolysis of the enzyme with trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 270- 276.
42. Inui H, Miyatake K, Nakano Y & Kitaoka S. 1992. Synthesis of reserved polysaccharide from wax esters accumulated as the result of anaerobic energy generation in *Euglena gracilis* returned from anaerobic to aerobic conditions. *Int J Biochem* 24:799–803
43. Iverson WP & Brickman FE. 1978. En: Trevors *et al.*,
44. Jasso-Chávez R, Torres-Márquez ME & Moreno-Sánchez R. 2001. The membrane-bound L- and D- lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 390: 295-303.

45. Jasso-Chávez R & Moreno-Sánchez R. 2003. Cytosol –mitochondria transfer of reducing equivalente by lactate shuttle in heterotrófic *Euglena*. J. Europ. Biochem. 270: 4942-4951.
46. Jasso-Chávez R, García-Cano I, Marín-Hernández A, Mendoza-Cózatl D, Rendon JL & Moreno-Sánchez R. 2005. The bacterial-like lactate shuttle components from heterotrophic *Euglena gracilis*. Biochim Biophys Acta 1709:181–190
47. Jasso-Chávez R, Pacheco-Rosales A, Lira-Silva E, Gallerdo-Pérez JC, García N, Moreno-Sánchez R. 2010. Toxic effects pf Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. Aquat. Toxicol. 100: 329-338.
48. Kitaoka, S., Y. Nakano, K. Miyatake, & A. Yokota. 1989. Enzymes and their functional location. Pp. 2-135 in D. E. Buetow, ed. The biology of *Euglena*. Vol. 4. Subcellular biochemistry and molecular biology. Academia Press, San Diego.
49. Krebs HA & Kornberg HL. 1957. Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle. Nature 179: 988 – 991.
50. Leander, B.S., Esson, H.J. and Breglia, S.A. 2007. Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. BioEssays. 29:987-1000. Leedale, 1982
51. Linton EW, Hittner, D, Lewandowski C, Auld T & Triemer RE. 1999. A molecular study of euglenid phylogeny using small subunit rDNA. J Eukaryot Microbiol 46, 217–223.
52. Lira-Silva E, Ramírez-Lima IS, Olín-Sandoval V, García-García JD, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R & Jasso-Chávez R. 2011. Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. J Hazard Mater. 193: 216-24.
53. Lira-Silva. 2011. Mecanismos de resistencia a cromo en *Euglena gracilis* heterotrófica. Tesis de Licenciatura (Químico en Alimentos). Facultad de Química, UNAM.
54. Marker AFH, Crowther CA, & Grunn RJM. 1980. Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. Archiv für Hydrobiologie Beiheft (Ergebnisse der Limnologie) 14: 52–69.
55. Martell AE. 1975. The influence of natural and synthetic ligands on the transport and funtion of metal ions in the enviroment. Pure Appl. Chem. 44: 81-113.
56. Mendoza-Cozatl D, Devars S, Loza-Tavera H, Moreno-Sánchez R. 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol. Plant. 115:276-283.
57. Mendoza- Cózatl D, Moreno-Sánchez R. 2005. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Bioch Biophysic 1706: 88-97.
58. Mendoza-Cozatl D, Rangel-González E. Moreno-Sánchez R. 2006a. Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch Environ Contamin Toxicol 51: 521- 528.
59. Mendoza-Cozatl D. Rodríguez-Zavala JS, Rodríguez-Enríquez S, Mendoza-Hernández G. Briones-Gallardo R. Moreno-Sánchez R. 2006b. Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complex of *Euglena gracilis*. J FEBS 273: 5703-5713.

60. Montrichard F, Le Guen F, Laval-Martin DL & Davioud-Charvet E. 1999. Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis* Z. FEBS Lett. 442(1): 29-33
61. Moreno-Sánchez R & Raya JC. 1987. Preparation of coupled mitochondria from *Euglena gracilis* by sonication. Plant Sci. 48: 151-157.
62. Moreno-Sánchez R, Covián R, Jasso-Chávez R, Rodríguez-Enríquez S, Pacheco- Moisés F & Torres-Márquez ME. 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. Biochim. Biophys. Acta 1457, 200–210.
63. Morita M, Watanabe Y & Saiki H. 2002. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditons. Biotechnol. Bioeng. 77: 155-162.
64. Navarro L, Torres-Márquez ME, González-Moreno S, Devars S, Hernández R, Moreno-Sánchez R. 1997. Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. Comp. Biochem. Physiol. 116C: 265-272.
65. Navarro-Aviñó, JP, Aguilar Alonso I, López-Moya JR. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas 16 (2) 10-25.
66. Nedelkoska TV & Doran PM. 2000. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. Biotechnol Bioeng. 67(5): 607-615.
67. Nelson DL & Cox MM. 2005. Lehninger's Principles of Biochemistry, 4th Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
68. Nieboer E. & Richardson DHS. 1980. The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. (Ser. B) 1:3-26.
69. Nordnes S, Krauss S & Johansen T. 1994. cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1 alpha: molecular phylogeny of eukaryotes based on elongation factor-1 alpha protein sequences. Biochim Biophys Acta. 1219(2):529-32
70. Nriagu JO & Pacían JM. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. Nature 333:134-139.
71. Ohkawa I, Shiga S & Kageyama M. 1979. An esterase on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* for the hydrolysis of long chain acyl esters. J. Biochem. 86(3):643-56.
72. Ohmann E. 1964. Acetate activation in green algae. I. Oxidation and activation of acetate in *Euglena gracilis*. Biochim Biophys Acta. 82:325-35.

73. Ono K, Kawanaka Y, Izumi Y, Inui H, Miyatake K, Kitaoka S & Nakano Y. 1995. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis*. J Biochem 117:1178– 1182
  74. Oswald WJ. 1988. Micro-algae and waste-water treatment. En Borowitzka MA, Borowitzka LJ (Eds.) Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. Reino Unido. pp. 304-327.
  75. Palma-Gutiérrez HN, Rodríguez-Zavala JS, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R & Saavedra E. 2008. Gene cloning and biochemical characterization of an alcohol dehydrogenase from *Euglena gracilis*. J Eukaryot Microbiol 55:554–561
  76. Park KY, Byung-Ran L & Lee K. 2009. Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. Waste Science & Technology 59(11) 2111-2116.
  77. Pirt SJ. 1983. Maximum photosynthetic efficiency: a problem to be resolved. Biotechnol Bioeng. (8):1915-22.
  78. Prakash JS, Baig MA & Mohanty P. 1999. Age dependent alterations in photosystem II acceptor side in *Cucumis sativus* cotyledonary leaf thylakoids: analysis of binding characteristics of herbicide [<sup>14</sup>C]-atrazine. Indian J Biochem Biophys. 36(1):10-3
  79. Prospero CH. 2000. Cyanobacteria in human affairs. Interciencia 25: 303-306
  80. Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA & Moreno-Sánchez R. 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. J. Eukaryot. Microbiol. 53: 36-42.
  81. Rodríguez-Zavala JS, García- García JD, Ortiz-Cruz MA & Moreno-Sánchez R. 2007. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subs. Environ. Eng. 42: 1365–1378.
  82. Roviroso N, Sánchez F, Benítez L, Travieso L & Pellón A. 1995. An integrated system for agricultural wastewater treatment. Water Sci. Tech. 32: 165-171.
  83. Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I & Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnol. 13: 468-474.
  84. Smillie RM. 1968. Enzymology of *Euglena*. In: Buetow, D.E. (Ed.). The Biology of *Euglena*, vol. II. Academic Press, New York, pp. 2–54.
  85. Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R & Florenzano G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. Biomass 11: 61-64.
  86. Trevors JT, Stratton GW & Gadd GM. 1986. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. Can. J. Microbiol. 32: 447-464.
  87. Tucci S, Vacula S, Krajcovic J, Proksch P & Martin W. 2010. Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet. J Eukaryot Microbiol 57:63–69
- Uribe *et al.*, 1994

88. Valle BL & Ulmer DD. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41:91-28
89. Uribe A, Chávez E, Jiménez M, Zazueta C & Moreno-Sánchez R. 1994. Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1186: 107- 116.
90. Uribe A & Moreno-Sánchez R. 1992. Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Sci.* 86, 21–32.
91. Vásquez-Alarcón A, Justin-Cajuste L, Siebe-Grabach C, Alcántar –González G, de la Isla de Bauer ML. 2001. Cadmium, Nickel and Lead concentrations in wastewater, soil and crops in the Mezquital Valley, Hidalgo, México. *Agrociencia.* 35 267-274.
92. Wong KL & Klaassen CD. 1981. Relationship between liver and kidney levels of glutathione and metallothionein in rats. *Toxicology.* 19(1):39-47.
93. Volke Sepúlveda T & Velasco Trejo JA. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: INE-SEMARNAT. 64 pp.
94. Yoval-Sánchez B, Jasso-Chávez R, Lira-Silva E, Moreno-Sánchez R & Rodríguez-Zavala JS. 2011. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *J Bioenerg Biomembr.* 42(4): 261- 354.



## 11. ANEXOS

### 11.1. Abreviaturas

$\gamma$ -EC	Gama glutamil cisteína	Hg	Mercurio
$\mu$ g	Microgramos	I	Yodo
$\mu$ M	Micromolar	K	Potasio
As	Arsénico	Kg	Kilogramo
ATP	Adenosin trifosfato	Mg	Magnesio
B <sub>1</sub>	Vitamina B <sub>1</sub>	mg	Miligramos
B <sub>12</sub>	Vitamina B <sub>12</sub>	mM	Milimolar
Ba	Bario	Mn	Manganeso
Ca	Calcio	Na	Sodio
Cd	Cadmio	Ni	Niquel
Co	Cobalto	ng	nanogramo
CoA	Coenzima A	nM	nanomolar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	N <sub>2</sub>	Nitrógeno
Cu	Cobre	NO <sub>x</sub>	Óxidos de nitrógeno
Cys	Cisteína	O <sub>2</sub>	Oxígeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico	P	Fósforo
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico	Pb	Plomo
DTT	Ditiotreitól	PCA	Ácido perclórico
EGTA	Ácido etil glicol-bis ( $\beta$ -aminoetiléter)- N, N, N', N'-tetraacético.	ppm	Partes por millón (mg/L)
F	Fluor	ROS	Especies reactivas del oxígeno (ERO <sub>s</sub> )
Fe	Hierro	Se	Selenio
FQ	Fitoquelatinas	-SH	Grupo sulfhidrilo
g/mL	Gramos por mililitro	S-S	Enlace disulfuro
GMG	Glutamato-malato-glucosa	Sn	Estaño
Gly	Glicina	T (SH) <sub>2</sub>	Tripanotión reducido
GSH	Glutatión reducido	V	Vanadio
H	Hidrogeno	Zn	Zinc

## **11.2. Componentes anaerobios**

El agua miliQ es agua destilada que se hace pasar por un filtro (diámetro de poro 0.22  $\mu\text{m}$ ) con el fin de eliminar toda impureza química y biológica. El agua filtrada se vierte en un matraz de bola, el cual es sellado herméticamente con un tapón de hule y se esteriliza en la autoclave a 20 libras de presión por 45 minutos. Cuando la autoclave ha llegado a esas condiciones, la válvula se abre y se libera toda la presión necesaria para poder sacar el matraz. Con la debida precaución, del matraz con agua hirviendo se extrae todo el aire, utilizando una aguja de jeringa estéril y manteniendo una agitación manual constante. Cuando el aire deja de salir y se genera una presión negativa dentro del matraz, la aguja es retirada y se deja enfriar. El matraz es almacenado en la cámara de anaerobiosis.

Los stocks de sulfuro de sodio y de  $\text{CdCl}_2$  fueron preparados con agua miliQ y almacenados en frascos sellados herméticamente. Para eliminar el oxígeno disuelto en el agua, se utilizó un sistema de reemplazo de gases. Se inyectó  $\text{N}_2$  y vacío durante 15 ciclos de 5 minutos cada uno, en agitación manual. Los frascos fueron esterilizados en la autoclave a 20 libras de presión por 45 minutos y almacenados en la cámara de anaerobiosis.

### 11.3. Índice de Figuras

Figura 1.1. <i>Euglena gracilis</i> vista en el microscopio óptico (40x)	02
Figura 1.2. <i>E. gracilis</i> vista en el microscopio electrónico	03
Figura 1.3. Micrografía electrónica de <i>E. gracilis</i> expuesta a $Hg^{2+}$	06
Figura 1.4. Fotobiorreactores industriales utilizados para la producción de biocombustibles	11
Figura 1.6.1. Reacciones generales de la fotosíntesis en el cloroplasto	12
Figura 1.6.2. Cadena respiratoria de <i>Euglena gracilis</i>	13
Figura 1.6.3. Esquema del metabolismo energético en <i>E. gracilis</i>	15
Figura 5.1.1. Elaboración de medio de cultivo	20
Figura 5.1.2 Esquema general de los métodos y técnicas	27
Figura 6.1.1. Efecto del cadmio en el crecimiento celular de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica en microaerofilia	28
Figura 6.1.2. Efecto del cadmio en el crecimiento celular de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica en aerobiosis	29
Figura 6.2.1. Consumo de malato por <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica	30
Figura 6.2.2. Consumo de glutamato por <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica	31
Figura 6.2.3. Consumo de glucosa por <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica	32
Figura 6.4.1. Cromatograma representativo de la concentración de oxígeno presente en los medios de cultivo	34
Figura 6.4.2. Concentración de oxígeno a través del tiempo de cultivo	35
Figura 6.8. Cromatogramas representativos del efecto del cadmio en moléculas con grupos tiol.	39

### 11.5. Índice de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación de los metales pesados	04
Tabla 1.4.1. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación	08
Tabla 5.1. Composición química del medio anaerobio y aerobio	19
Tabla 6.3. Actividad específica de enzimas citosólicas	33
Tabla 6.5. Efecto de la microaerofilia y el cadmio en la actividad fotosintética y la respiración celular	36
Tabla 6.7. Remoción de cadmio por <i>E. gracilis</i> en microaerofilia	39