



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

*Aislamiento de una cepa de *Euglena gracilis* hiper-acumuladora de metales pesados.*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Natalia Estefania González Roque



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
VOCAL: Profesor: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND
SECRETARIO: Profesor: RICARDO JASSO CHAVEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA
2° SUPLENTE: Profesor: SANDRA PAOLA SANCHEZ RODRIGUEZ

ESTA TESIS SE REALIZÓ CON EL APOYO DEL DONATIVO NÚMERO:

PICS08-5 DEL IC Y TDF

Y DEL APOYO DEL PROYECTO:

156969 CONACYT

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ricardo Jasso Chávez

SUSTENTANTE (S):

Natalia Estefania González Roque

González Roque Natalia Estefania

Realizó: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano
#1, Tlalpan Sección XVI, CP 14080,
México, DF., Tel. 55 73 29 11 ext. 1422, Fax 55 73 09 26.

Asesor: Dr. Ricardo Jasso Chávez

Vo. Bo.

*“Aquellos caminos más largos y que más esfuerzo
te suponen, son los más satisfactorios”.*

Anónimo

"La felicidad consiste en saber unir el final con el principio."

Pitágoras de Samos

INDICE

RESUMEN	VII
1.0 INTRODUCCIÓN	IX
1.1 <i>Euglena gracilis</i> como modelo biológico	X
1.2 Metabolismo energético de <i>Euglena gracilis</i>	X
1.2.1 Metabolismo aerobio	X
1.2.2 Metabolismo anaerobio	XII
1.2.3 Metabolismo fotosintético	XIII
1.3 Metales pesados	XIV
1.4 Aguas residuales	XV
1.5 Biorremediación, proceso biotecnológico.	XVIII
2.0 JUSTIFICACIÓN	XIX
3.0 HIPÓTESIS	XXIII
4.0 OBJETIVO GENERAL	XXIII
4.1 Objetivos particulares	XXIII
5.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	XXIV
6.0 METODOLOGÍA	XXV
6.1 Medio de cultivo Hutner modificado.	XXV
6.2 Condiciones de crecimiento	XXVII
6.3 Medio anaerobio	XXVIII
6.4 Medio aerobio	XXX
6.5 Cosecha de los cultivos	XXXI
6.6 Cuantificación de metales	XXXII
6.7 Consumo de etanol	XXXIII
6.8 Consumo de oxígeno y fotosíntesis	XXXIII
7.0 RESULTADOS	XXXIV
7.1 Medio anaerobio	XXXIV
7.2 Cuantificación de metal medio anaerobio	XXXVI
7.3 Medio aerobio	XLI
7.4 Cuantificación de metal medio aerobio	XLIII
7.5 Consumo de etanol	XLVII
7.6 Fotosíntesis y respiración celular	XLVIII
8.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS	XLIX

<i>8.1 Crecimiento celular</i>	XLIX
<i>8.2 Fotosíntesis y respiración</i>	L
<i>8.3 Consumo de Etanol</i>	LII
<i>8.4 Cuantificación de metal</i>	LII
9.0 CONCLUSIÓN	LIV
10.0 BIBLIOGRAFIA	LV

RESUMEN

Una problemática en las últimas décadas es la contaminación por metales pesados en aguas residuales, aire y suelos. La mayor parte está relacionada con las actividades humanas que en busca de su bienestar, desecha sustancias tóxicas, tales como los metales pesados. Para tratar de eliminar la contaminación por metales pesados, se han investigado métodos para mejorar esta situación; entre estos métodos se encuentra la biorremediación, que es la utilización de hongos, plantas, bacterias, protistas, etc. como proyectos biotecnológicos para regenerar un ecosistema alterado. En la actualidad, existe un creciente interés en determinar las bases bioquímicas de estos microorganismos así como sus mecanismos de resistencia y acumulación de metales. Por lo que *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para dilucidar estos procesos.

E. gracilis es un protista fotosintético de vida libre que posee la capacidad de compartimentalizar metales pesados y que puede ser cultivada en condiciones heterotróficas y fotoheterotróficas produciendo grandes cantidades de biomasa. Se ha establecido que la vía de síntesis de glutatión y fitoquelatinas está involucrada con el mecanismo de resistencia y acumulación de metales pesados tóxicos, en particular Cd^{2+} (bajas concentraciones). Sin embargo, no existen datos disponibles sobre el efecto de metales como el Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} entre otros, a concentraciones altas (cerca de mM), que son las que se han detectado en aguas altamente contaminadas por estos metales.

La alta toxicidad de los metales pesados es debido, entre otras cosas a que se unen fuertemente al glutatión que es una molécula encargada de neutralizar las especies reactivas de oxígeno, por lo que al formarse los complejos metal-glutatión se genera estrés oxidativo. Esto sugiere que a una concentración baja de oxígeno en el cultivo, el estrés oxidativo disminuiría, por lo que el glutatión estaría más disponible para la síntesis de moléculas con grupos tiol (cisteína, glutatión y fitoquelatinas) que son especializadas en remover metales pesados. *E. gracilis* puede duplicarse en condiciones microaerófilas, en este proyecto se evaluó la capacidad de este microorganismo para resistir concentraciones

altas de metales pesados en condiciones microaerofilicas (baja concentración de oxígeno) y así lograr una mayor acumulación del metal pesado.

E. gracilis logró adaptarse a estos medios de cultivo inoculados con metales pesados. Se observó, que de acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas en seis pases, hubo duplicación celular. También se determinó que los metales como Cd^{2+} y Cu^{2+} fueron realmente tóxicos para las células ya que no hubo duplicación celular, por lo que se sugiere que se hagan pases con menos cantidad de metal para que estas células logren adaptarse a este tipo de medios de cultivo. Respecto a fotosíntesis, aunque sí se vio afectada, se encontró que algunos cultivos fueron resistentes, por lo que se sugiere rescatar estos cultivos e inocularlos para hacerles posteriores experimentos, puesto a que los experimentos que se realizaron en este trabajo indican que *E. gracilis* está utilizando esta vía metabólica para duplicarse.

1.0 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un creciente interés en determinar las bases bioquímicas de los mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en microorganismos. El uso de microorganismos resistentes con capacidad de almacenar metales pesados ha demostrado ser una tecnología con más ventajas que los métodos físicos-químicos, ya que ofrece un menor impacto ambiental y menor costo económico (Volesky, 1990; Salt et al., 1998; Hussein et al., 2004; Mullapudi et al., 2008).

Durante las últimas décadas, en México se ha detectado una gran problemática acerca de la alteración en ecosistemas acuáticos (aguas residuales), las cuales están contaminándose con una gran cantidad de metales pesados, entre ellos Cr (VI), Cr (III), Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, y Cd²⁺ (Cervantes-García et al., 2003).

La mayoría de estos metales pesados son de alto impacto en la salud humana, ya que causan enfermedades crónicas como el cáncer. Estos elementos potencialmente tóxicos (EPTs) (Cervantes-García et al., 2003) pueden ser esenciales o no esenciales para los seres vivos, pero todos ellos en exceso, representan un riesgo latente para la salud del ser humano y las especies que habitan estos ecosistemas. Un ejemplo de la fuerte contaminación son las vertientes principales de México como el Rio Cazonen en Hidalgo, el Rio Lerma y el Rio de los Remedios en el Estado de México, que son fuentes principales tanto de energía eléctrica como de alimentación para ganados; sin embargo, zonas industriales los usan como vía de desechos de metales pesados sin ningún tipo de regulación o tratamiento previo.

Lo anterior ha generado la necesidad de desarrollar tecnologías para la remediación de ambientes acuáticos afectados por metales. Se ha propuesto el uso de microorganismos con capacidad de almacenar metales, ya que ha demostrado ser una tecnología con un mínimo impacto ambiental y menor costo económico.

1.1 *Euglena gracilis* como modelo biológico

Euglena gracilis es un protista de vida libre que ha sido usado como modelo en diferentes estudios biológicos, debido a su notable plasticidad metabólica y su capacidad de adaptación a ambientes contrastantes. Cuando crece en presencia de luz es verde y fotosintética, en cambio cuando crece en la obscuridad es blanca y heterotrófica (Buetow, 1989). *E. gracilis* puede proliferar en presencia de Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb, Cr (VI), Cr (III) y Cu^{2+} . Se puede cultivar utilizando una extensa variedad de fuentes de carbono como glucosa, DL-lactato, glutamato, malato, etanol, y acetato y en amplios valores de pH que van desde 3.0 hasta 8.0 (Jasso-Chávez et. al., 2010; Lira-Silva et.al., 2011). Habita en suelos y en una diversidad de ambientes acuáticos (Müllner et al. 2001). Estas propiedades hacen que *E. gracilis* pueda ser considerada como un organismo con potencial biotecnológico en la bioremediación de sistemas acuáticos contaminados por metales.



Euglena gracilis fotosintética vista desde un microscopio óptico 10X.

1.2 Metabolismo energético de *Euglena gracilis*

1.2.1 Metabolismo aerobio

El metabolismo energético en *E. gracilis* incluye como vías a la glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs (este último diferente al que presentan los mamíferos) así como de una cadena respiratoria con muchos componentes alternos además de los 4 complejos clásicos encontrados en mamíferos. En condiciones aerobias *E. gracilis* no tiene la capacidad de oxidar piruvato para la síntesis de acetil CoA, ya que no posee al complejo piruvato deshidrogenasa (Buetow, 1989). 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 la poza de quinonas, están unidas

a la membrana interna mitocondrial y son independientes de NAD^+ , por lo que se les conoce como lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos (D-iLDH y L-iLDH) donde la mitocondria de *E. gracilis* es capaz de oxidar L- y D-lactato, en donde estas dos enzimas transfieren electrones directamente hacia la poza de quinonas para la síntesis de ATP. (Jasso-Chávez, 2004).

Además de los componentes clásicos de la cadena respiratoria de *E. gracilis*, ésta tiene complejos respiratorios alternos, tales como: quinol:citocromo c oxido-reductasa tipo complejo III (by-pass) el cual, no bombea protones como el complejo III clásico. Otro componente es la NADH deshidrogenasa externa insensible a rotenona (Uribe & Moreno- Sánchez *et. al.*, 1992), que ayuda a reoxidar el NADH citosólico para mantener el balance redox homeostático. En el siguiente esquema se ilustran los componentes enzimáticos de la cadena respiratoria de *E. gracilis*.

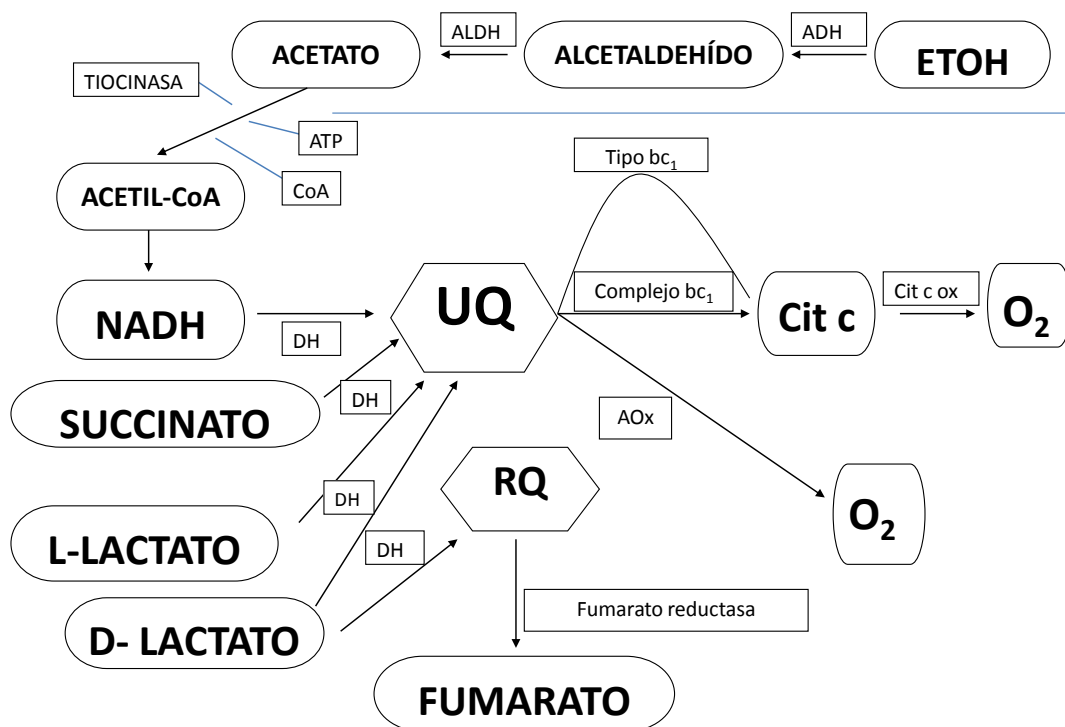


Figura A. Cadena respiratoria de *Euglena gracilis*. DH son las deshidrogenasas del respectivo sustrato previo señalado; es decir, succinato deshidrogenasa; alcohol deshidrogenasa (ADH); aldehído deshidrogenasa (ALDH); oxidasa

alterna (AOx); citocromo c (Cit c); citocromo c oxidasa (Cit c Ox); complejo bc1 (simil al Complejo III); rodoquinona (RQ); ubiquinona (UQ).

El metabolismo del etanol también ha sido ampliamente estudiado en *E. gracilis*. Se ha reportado la presencia de alcohol y aldehído deshidrogenasas citosólicas y mitocondriales (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 la cadena respiratoria para la síntesis de ATP (Jasso-Chávez *et al.*, 2001).

1.2.2 Metabolismo anaerobio

Dentro de los componentes alternos reportados en *E. gracilis* heterotrófica se encuentra la rodoquinona-9, un componente de bajo potencial (a diferencia de ubiquinona-9 de alto potencial de la cadena respiratoria en mamíferos), ésta sirve de donador de electrones para la reducción anaeróbica de fumarato para formar succinato. De esta manera, *E. gracilis* se ha considerado anaerobio facultativo, debido a que tolera bajas concentraciones de oxígeno. (Castro-Guerrero, 2008). La piruvato NADP⁺ oxidorreductasa (PNO) es una enzima para fermentación de ésteres de cera, expresada en anaerobiosis, modifica el ciclo de Krebs llegando a succinato semialdehído, el metabolismo de los ésteres de cera (condensación de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena larga) es esencial en microaerofilia, su función está relacionada con la reserva energética y protección a la célula. El acetyl CoA producido por la PNO es usado como precursor y como donador de carbono para la síntesis de ácidos grasos en la mitocondria, consumiendo electrones provenientes del catabolismo de la glucosa (Inui *et al.*, 1985; Kitaoka *et al.*, 1989). La biosíntesis de los ácidos grasos son reducidos y esterificados, generando ceras que se acumulan en el citosol (Buetow, 1989). Cuando se someten nuevamente a condiciones aeróbicas, los ésteres de cera se catabolizan por β -oxidación para sintetizar paramilo aunque también pueden generar NADH para la fosforilación oxidativa. La presencia de estas enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en la membrana mitocondrial interna podrían favorecer la

utilización de alcoholes y aldehídos, previniendo su efecto tóxico en la cadena respiratoria, ya que los alcoholes y aldehídos grasos son poco solubles en agua, por lo que interactúan preferentemente con la membrana (Yoval-Sánchez *et al.*, 2011).

1.2.3 Metabolismo fotosintético

En *E. gracilis* la fotosíntesis y la fijación de CO₂ es similar a la reportada en microalgas y plantas vasculares; su proceso ocurre en el cloroplasto el cual contiene fotosistemas I y II, pigmentos (clorofila a, y b), el complejo b₆f y las 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 CO₂ y H₂O y que de forma simultánea liberan O₂. Cuando no hay suministro de luz solar las mitocondrias de *E. gracilis* generan ATP, oxidando glúcidos producidos anteriormente en los cloroplastos en presencia de luz (Nelson & Cox, 2005).

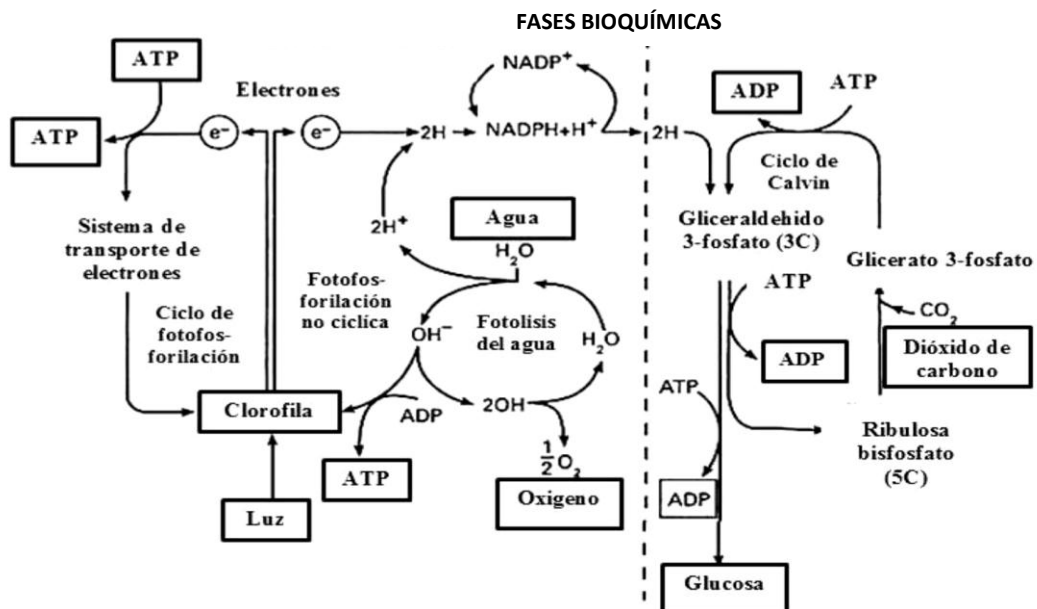


Figura B. Reacciones generales de la fotosíntesis en el cloroplasto (Nelson & Cox, 2005)

Las microalgas y otros organismos fotosintéticos han sido propuestos para el tratamiento de aire (fijación de CO₂ y NO_x) 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 estos fotobiorreactores ha sido la producción de compuestos químicos tales como enzimas, vitaminas, biocombustibles y otros metabolitos de interés biotecnológico y biomédico (Oswald, 1988; Rovirosa et, al., 1995; Sylvestre et, al., 1996; Prospero, 2000).

En biodigestores la producción de biogás (metano) es importante, ya que los metales pesados acumulados en los sedimentos anaerobios (donde se encuentran los microorganismos metanogénicos), son la principal razón por la cual anteriores procesos de síntesis de biogás no eran tan eficientes. Por lo tanto, *E. gracilis* cultivada en condiciones de anaerobiosis podría ser un modelo para remover dichos metales.

Se ha reportado que los metales pesados se acumulan en los cloroplastos, esto sugiere que a pesar de que la clorofila y la fotosíntesis se ven afectados por los metales pasados, este protista es capaz de producir ATP mediante la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

1.3 Metales pesados

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza de la tierra. No pueden ser degradados o destruidos. Se incorporan a nuestro cuerpo en pequeñas cantidades por los alimentos, agua potable y aire. Los organismos fotosintéticos son una de las principales vías de acceso a metales pesados hacia los animales y al ser humano, ya que son comúnmente utilizados como alimentos. Los metales como cobre, selenio y zinc son esenciales para mantener el metabolismo del cuerpo humano. De manera general se acepta que los metales pesados son aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g / mL porque en grandes cantidades son altamente tóxicos (Volke-Sepulveda, *et, al.* 2005).

Los metales pesados se clasifican en grupos dependiendo del autor que los refiera; por ejemplo Nieboer & Richardson (1980) los clasifican en tres grupos

de acuerdo a su afinidad y Navarro Aviño (2007) los clasifica en dos grupos en oligoelementos o micronutrientes y sin función biológica conocida. Independientemente de las clasificaciones, no hay duda de que son altamente tóxicos, y las clasificaciones de acuerdo a los autores son correctas.

Basados en la afinidad y densidad 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 en bajas concentraciones. En cambio algunos de los metales pesados como son Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , entre otras, no son esenciales para el crecimiento celular y son extremadamente tóxicos aún en bajas concentraciones (Martell, 1975; Trevors, 1986).

1.4 Aguas residuales

“La contaminación hídrica perjudica directamente a las comunidades que viven en las inmediaciones de los ríos, lagos y otros afluentes porque provoca daños a la salud e infecta las fuentes de alimentos. Además representa un alto costo para la sociedad en su conjunto; entre más agua sea contaminada en los afluentes, más costoso será potabilizarla, llevarla a las ciudades y atender los impactos que deje en las comunidades y en el medio ambiente”.

La cascada El Salto de Juanacatlán, que recibe las aguas del Río Santiago abarcando los estados de Jalisco y Nayarit, tiene un emblemático problema: la toxicidad, el olor pútrido que emite, el color, la turbidez del agua, la espuma de los detergentes que alcanza hasta medio metro de altura en el afluente, la proximidad de viviendas y la ausencia de vida silvestre en sus inmediaciones, manifiestan la grave contaminación que existe. En varios puntos del Río Santiago se detectan componentes tóxicos como mercurio, cadmio, cromo y plomo, entre otros. Existen más casos de contaminación paradigmáticos como lo son el Río Atoyac, en Puebla o el Río Blanco, en Veracruz; sin embargo, se trata de un problema generalizado en todo el país.

La industria es una de las principales fuentes de contaminación de los ríos en México y en el mundo. En México, uno de los indicadores de calidad del agua

establecidos por la Comisión Nacional del Agua (Conagua), es la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que señala que las descargas industriales generan 340 % más contaminación que las aguas residuales municipales. De hecho, la industria es generadora de componentes mucho más tóxicos como lo son metales pesados, los fluoruros y compuestos orgánicos persistentes (COP's) como los pesticidas, insecticidas, organoclorados, herbicidas etc. o Volátiles (COV's) que son producidos por la quema de combustibles, madera, gasolina etc.

Frente a la crisis hídrica de México, la Conagua es cómplice, el discurso y las acciones de las autoridades dejaron de lado el riesgo que representa la contaminación industrial con sustancias tóxicas. Hay falta de voluntad política para prevenir la contaminación de nuestros ríos, ejemplo de ello es que existen 13 diputados en la Comisión Especial para la Cuenca Lerma- Chapala- Santiago y sólo cinco inspectores encargados del cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas en toda la cuenca” (Greenpeace México, 22 marzo de 2012; <http://www.greenpeace.org/mexico/es/Noticias/2012/Marzo/Rios-mexicanos-rios-toxicos/>).

En México, la NOM-127 SSA1-1994 establece que las concentraciones máximas de metales pesados en agua potable son las siguientes (Tabla 1):

TABLA 1. Concentraciones máximas permisibles de metales y metaloides en agua potable en México.*

METAL PESADO	LIMITE PERMISIBLE (mg/L o ppm)	LIMITE PERMISIBLE (µM)
ZINC	5.000	76.488
COBRE	2.000	31.476
FIERRO	0.300	5.372
CROMO TOTAL	0.050	0.962
ARSENICO	0.050	0.667

PLOMO	0.025	0.12
CADMIO	0.005	0.044
MERCURIO	0.001	0.005

*Datos mostrados en la NOM. Tabla complementada.

Algunas de las variables que presenta el agua son: la densidad orgánica, que reduce la disponibilidad de metales y cambia a distribución de las especies a causa de la adsorción sobre las superficies celulares y/o acomplejamiento de los exudados de la biota; también varía la concentración de partículas y coloides, donde los metales son secuestrados por partículas de los óxidos de hierro, manganeso, aluminio y de las arcillas. El potencial redox afecta el estado de oxidación de los metales. Los metales en el agua son diferentes, están solubles o en partículas, como ion, complejo, quelato en forma coloidal, precipitado o adsorbido (Botello y Rendon 2005; Devars-Ramos, 2008). La presencia de otros metales también afecta la toxicidad del agua, ya sea por precipitación o por competencia. Sin embargo, otros factores ambientales como el aumento de la densidad de protozoarios y microalgas, disminuye la toxicidad del metal. En la tabla 2 se muestra la cantidad de metales pesados, en aguas residuales de México.

TABLA 2. Contaminación por metales pesados en aguas residuales de industrias y algunos cuerpos de agua en México. (García-García, 2008).

Localidad, industria ó sistema	Metales y metaloides (µg/L)							
	Zn	Cu	Fe	Cr total	As	Pb	Cd	Hg
León Gto				50000				
Laguna Sn Andrés Tamps.	5.12	1.82	23.4			1.38	0.33	
Matamoros, Tamps.		50-340			400	50- 400		
Textil	100	300	5600	300				
Curtidora				260-780				
Río Blanco	20-120	10-50		50-400	2-18	35		2-8

Metal mecánica		600	1500	280		120	
Galvanoplastia	1260	6400	125000	73000		220	4
Polímeros sintéticos				40		16	20 89
Petroquímica sec.		70		120			157

1.5 Biorremediación, proceso biotecnológico.

La biorremediación es el uso de microorganismos para degradar y/o mineralizar residuos peligrosos, ya sea por reducción, por oxidación de metal o por alquilación; precipitación y atrapamiento por secreción de compuestos en el medio extracelular. La definición más aceptada para este término es “la aplicación ingenieril de los procesos biológicos para la limpieza de suelos, aguas continentales y aire contaminado” (Gómez-Bermejo, 2010). En general, los microorganismos que participan en esta actividad presentan diferentes mecanismos de resistencia, así como de tolerancia hacia los metales tóxicos. Entiéndase por “resistencia” la capacidad del microorganismo por sobrevivir a la toxicidad de metales pesados, con base en mecanismos producidos como respuesta directa, según los tipos de metal involucradas. Como ejemplos de estos mecanismos, son la reducción de transporte a través de la membrana celular, la expulsión activa por medio de la cual sale una mayor cantidad de metal que la que entra, acumulación y compartimentalización, en la cual el metal queda secuestrado en una vacuola en el interior celular por acción quelante, ya sea por moléculas con grupos tiol (metalotioninas, fitoquelatinas cisteína y glutatión), compuestos orgánicos (citrato, malato, oxalato-acetato) o por moléculas inorgánicas (sulfuro, fosfato, polifosfato)(Devars-Ramos, 2008).

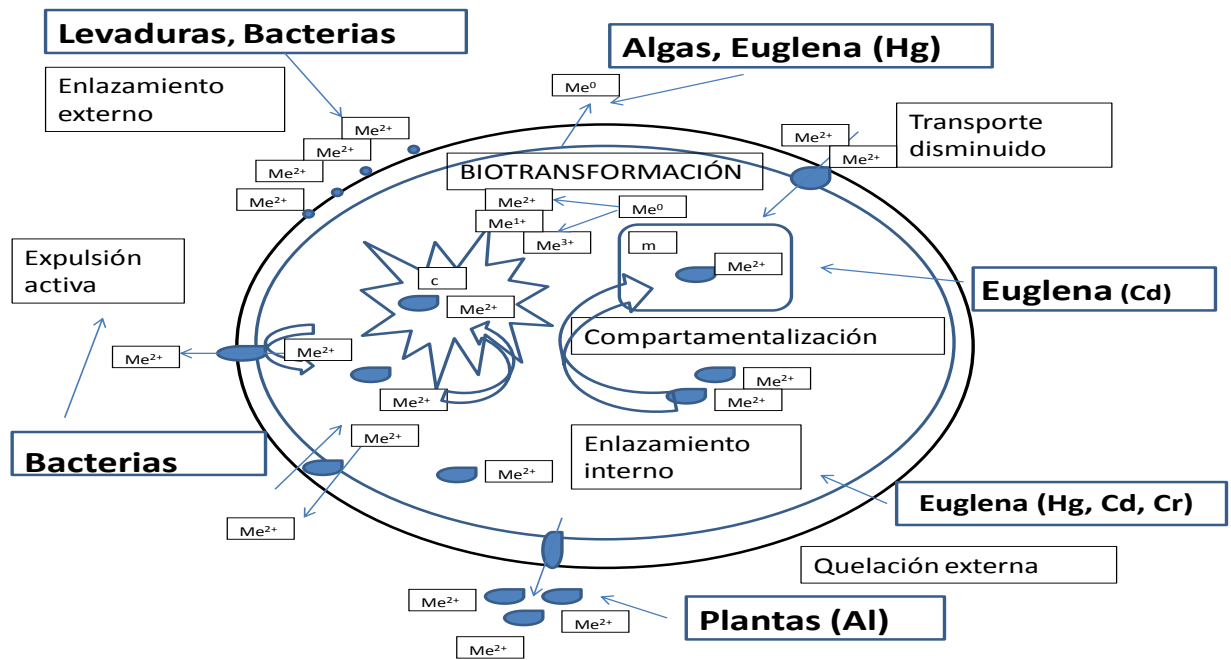


Figura C. Mecanismo de resistencia a metales pesados que se han reportado para diferentes organismos. Modificado de Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Euglena gracilis es un protista de vida libre que forma parte del plancton de aguas dulces. Puede ser cultivada de manera eficiente en condiciones controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono (glucosa, etanol, ácidos orgánicos, peptonas etc.). Además presenta propiedades metabólicas que le permiten desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales esenciales, no esenciales y a diferentes valores de pH, bajo un régimen heterotrófico o fotosintético (Cervantes y Moreno-Sánchez., 1999). Sus mecanismos de resistencia a metales pesados nos dan la oportunidad de estudiar las posibilidades de reducir los contaminantes de alto impacto en el medio ambiente como en las aguas residuales de México y ampliando el campo de estudio, se puede decir también que la del mundo ya que ha sido ampliamente estudiada en condiciones aerobias. Sin embargo, poco se sabe acerca de su metabolismo en ausencia de oxígeno, aun cuando hay evidencias que sugieren la presencia de un metabolismo energético anaerobio alterno o

posiblemente simultáneo (microaerófilico) como parte de su plasticidad metabólica intrínseca (Santiago-Martínez, 2011).

Lo esencial de este microorganismo radica en que acumula estos componentes tóxicos en las mitocondrias y/o en cloroplastos así como en el citosol (Avilés et. al, 2003; Mendoza-Cozatl y Moreno-Sánchez 2005; Jasso-Chávez et.al., 2010; Lira-Silva et. al., 2011). Uno de los principales cambios es que, cuando se cultivan bajo condiciones fotosintéticas, la acumulación se lleva a cabo principalmente en los cloroplastos, mientras que en la oscuridad el metal se compartimenta principalmente en las mitocondrias (Cervantes-García et al., 2003).

Las condiciones microaerófilicas en las que se pretende cultivar a *E. gracilis*, ofrecerá propuestas interesantes en cuanto a su forma de vida y adaptación a diferentes ambientes. En condiciones aerobias este protista alcanza una densidad celular de hasta 20×10^6 céls /mL.

Por otro lado, los metales pesados pueden llegar a provocar un aumento en la concentración del anión superóxido el cual es luego neutralizado dentro del organismo por la enzima superóxido dismutasa (SOD, en el citosol y mitocondrias) o induciendo estrés oxidativo a través de mecanismos diferentes, dependiendo de sus propiedades físicas y químicas. Los metales pueden ser tóxicos por medio de tres mecanismos: (a) la producción de especies de oxígeno reactivas (EROS) por autooxidación y la reacción de Fenton; esta reacción es típica para los metales de transición tales como el hierro o cobre, (b) el bloqueo de grupos funcionales esenciales en las biomoléculas (proteínas y glutatión), esta última ha sido reportada para metales pesados no reductores como el cadmio y mercurio (c) el desplazamiento de los iones metálicos básicos como zinc y selenio de las biomoléculas (proteínas), que se produce con diferentes tipos de metales pesados (Castro-Guerrero, N.A. et. Al. 2008). Wang y colaboradores (2008) demostraron que en células epiteliales de pulmón, el Cr (VI) provoca un aumento en la cantidad de SOD, en respuesta al estrés oxidativo desencadenado por este metal. En otros estudios realizados con *E. gracilis*, encontraron que el Cr (VI) produce ROS en las mitocondrias

(Jasso-chávez et al., 2010) y cambios tanto al nivel morfológico como metabólico (Rochetta et.al., 2003).

Cuando *E. gracilis* se expone a concentraciones altas del Cr (III), se activan de forma simultánea diversos mecanismos moleculares entre ellos se encuentran la unión intracelular del Cr (III) con los grupos tiol de la cisteína y glutatión y la secreción de malato para inactivar al Cr (III). Además, se ha reportado la actividad de una cromato reductasa para la reducción extracelular del Cr (VI) (Lira-Silva, et. al. 2011).

En otro estudio exponiendo las células a mercurio, los resultados mostraron que el crecimiento celular se inhibe parcialmente y que éste metal se acumula en las membranas, y su acumulación induce a las síntesis de las fitoquelatinas que son derivados de la polimerización del glutatión (Devars *et.al.*, 2000). Con respecto al Cr (VI) se reporta que en forma de CrO_4^{2-} puede usar los transportadores de SO_4^{2-} y entrar en las mitocondrias y en los cloroplastos (García-García, et al., 2009).

Por lo tanto, el objetivo de cultivar células en microaerofilia es que logre duplicarse en microaerofilia y acumule cantidades mayores de metal.

Entre los elementos potencialmente tóxicos se encuentra el cobre. En relación al cobre y sus efectos tóxicos en *E. gracilis* se encuentra reportado que, la producción de clorofila a, y b y carotenoides presentan un comportamiento dosis-dependiente ya que hubo una disminución significativa, a mayores dosis del metal se utilizó el parámetro de la capacidad de producción de pigmentos fotosintéticos para valorar la capacidad de la adaptación. La reducción en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos puede ser el resultado del efecto directo de los iones de Cu^{2+} , ocasionan una rápida inactivación del fotosistema II, posiblemente como resultado de una disminución de los pigmentos fotosintéticos (Cervantes *et al.*, 2011; Perales Vela *et al.*, 2007). En cuanto al cadmio, su principal efecto tóxico es el aumento de 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) (Cervantes-G. D. *et al.*,

2011). Con respecto al consumo de sustratos bajo microaerofilia (no realizados en este trabajo, ya que el enfoque es obtener un cultivo anaerobio hiperacumulador), se ha determinado que *E. gracilis* tiene la capacidad de utilizar los sustratos de diferente manera, pues el malato es consumido preferentemente en los primeros días de cultivo tanto en aerobiosis como en microaerofilia, esta relación también es aplicable para el consumo de glutamato. En aerobiosis, el malato y el glutamato son consumidos en su mayor proporción, por lo que se infiere que estos sustratos están favoreciendo la duplicación celular y el aumento de biomasa (Santiago-Martínez, 2011).

3.0 HIPÓTESIS

El cultivo de *E. gracilis* en condiciones de microaerofilia disminuirá el estrés oxidativo generado por la cadena transportadora de electrones y el oxígeno, entonces las moléculas con grupos tiol estarán más disponibles para neutralizar a los metales pesados permitiéndole a las células soportar altas concentraciones de metales pesados y una mayor remoción del medio de cultivo.

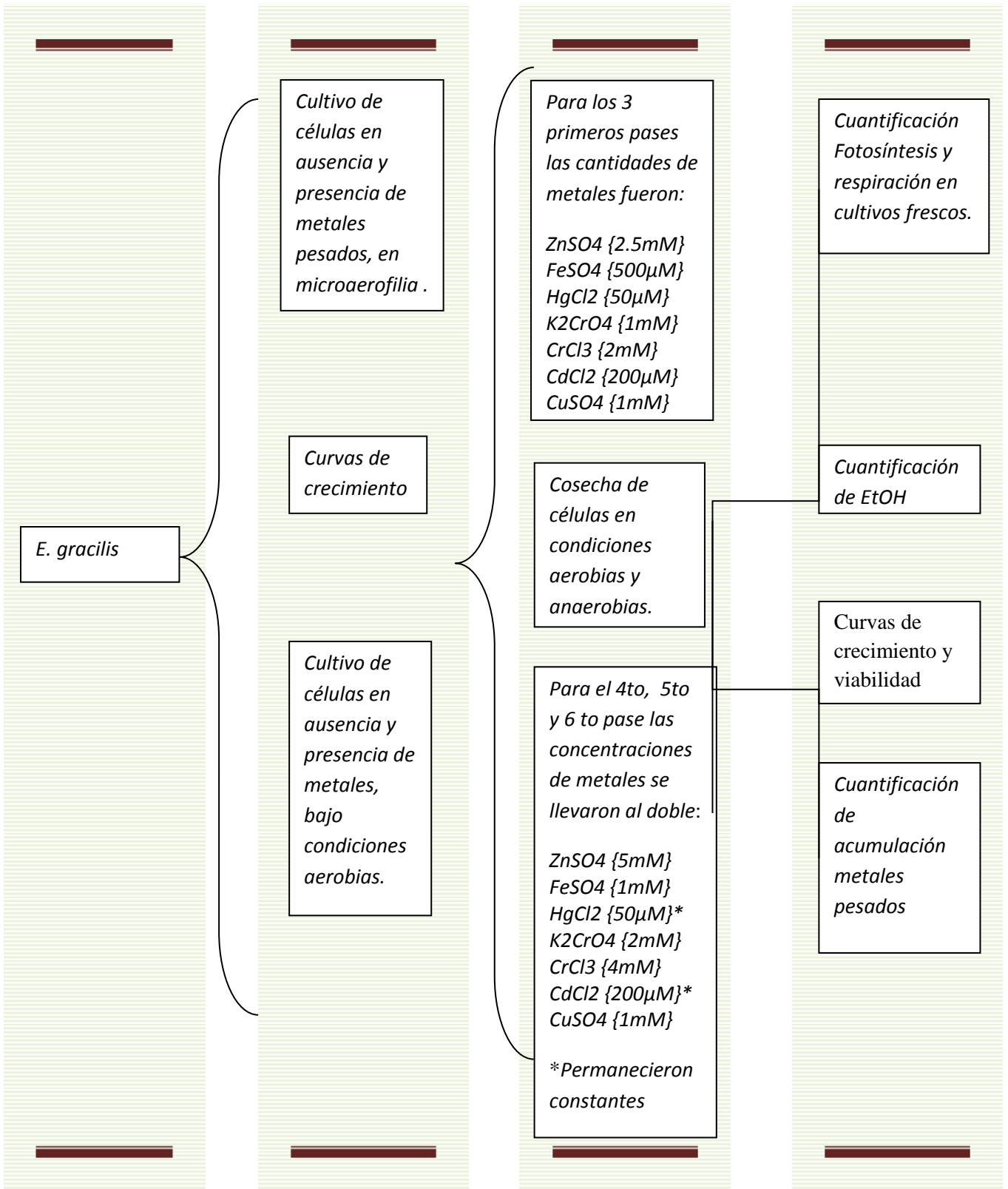
4.0 OBJETIVO GENERAL

Obtener un cultivo de *E. gracilis* híper resistente e híper acumulador de metales pesados.

4.1 Objetivos particulares

- *Realizar* curvas de crecimiento en condiciones de microaerofilia y de aerobiosis, en ausencia y presencia de metales (Hg^{2+} , Cr (VI), Cr (III), Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+}).
- Determinar el consumo del etanol en cultivos microaerofílicos.
- Determinar el efecto de los metales pesados sobre la fotosíntesis.
- Medir la acumulación de metales pesados en las células.

5.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.0 METODOLOGÍA

6.1 Medio de cultivo Hutner modificado.

Se preparó medio de cultivo aerobio y anaerobio. Los componentes del medio han sido clasificados en cuatro tipos de acuerdo a su función en el medio de cultivo. Los componentes tipo I (fosfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, sulfato de zinc, sulfato de manganeso molibdato de sodio, cloruro de cobalto, sulfato de cobre y ácido bórico) son metales y minerales traza esenciales para el crecimiento de *E. 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 II (Etanol, malato y glutamato) son las fuentes carbono. Los componentes tipo III (L-cisteína, sulfuro de sodio y rezarsurina) son componentes característicos de los medios anaerobios; ya que el sulfuro de sodio y la L-cisteína son agentes reductores (reaccionan con el oxígeno y generan un ambiente reductor) y la rezarsurina es un indicador de estado óxido-reducción (Lira-Silva, 2011). Finalmente, los componentes tipo IV (cloruro de calcio y vitaminas) son una mezcla de tiamina 0.03 mM, cianocobalamina 0.2 µg/mL, FeCl₃ 0.2 mM y CaCl₂ que son esenciales para el crecimiento. La Tabla 3 se muestra la composición del mismo.

TABLA 3. Medio de cultivo Hutner (Modificado)

REACTIVO	Cantidad de reactivo por 1L	[CONCENTRACIÓN]
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.2 g	0.002 mM
Glutamato	5 g	34 mM
Malato	2 g	17mM
Stock N:(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 mL	1.5 M
Stock M:(MgSO ₄)	1 mL	2.08 M
Stock K:(KH ₂ PO ₄)	4 mL	1.47 M
Solución mineral A:(ZnSO ₄ *7H ₂ O, MnSO ₄ *4H ₂ O,	2 mL	0.422 M

Na ₂ HO ₄ *H ₂ O, CaCl ₂ *6H ₂ O)		
Solución mineral B: CuSO ₄ *5H ₂ O, H ₃ BO ₃)	1 mL	0.12 M
L-cisteína	0.2 g	1.6mM
Vitaminas: (Tiamina, FeCl ₃ y cianocobalamina).	1 mL	
Rezarsurina	100 µL	0.001% p/v
EtOH	10 mL	175mM
Na ₂ S (2.5 % p/v)	2 mL	0.45mM

Para iniciar con el cultivo de *E. gracilis* en los medios anaerobios y aerobios se adicionó el metal utilizando una jeringa estéril con las concentraciones indicadas en la tabla 4. Se adicionó la cantidad de células de un cultivo anterior o pre-inóculo, al cual se le determinó la densidad celular de la siguiente forma: se tomaron 0.5 mL del cultivo con una jeringa estéril, de éstos, 25 µL se pusieron en un tubo eppendorf de 1.7 mL y se adicionaron 975 µL de agua destilada (obteniéndose una dilución 1:40). Se adicionaron 25 µL a una cámara de Neubauer y se realizó el conteo al microscopio con el objetivo de 10 x. El cultivo se inició con una densidad celular de 0.2×10^6 cel/mL. Se realizaron dos muestras controles en las cuales no se adicionó metal.

Inoculadas las muestras con células más sus respectivas cantidades de metal, se llevaron a incubación a 25°C con ciclos de 12 h de luz; aplicando luz blanca (1/683 vatios por estereorradián) (Figura D). La viabilidad celular se determinó adicionando azul tripano al 1 % (p/V) Se adicionaron 15 µL por 0.5mL de medio, este es un colorante vital, se contaron 100 células por campo y se determinó cuales estaban de color azul, lo que representa porcentaje de muerte celular.

En periodos de 15 a 25 días (período de duración de cada pase), se realizaron curvas de crecimiento. Los 3 primeros pases se realizaron con las mismas concentraciones iniciales mencionadas en la tabla 3; sin embargo cuando se realizó el cuarto pase se duplicó la cantidad de metal con el objetivo de incrementar la adaptación de *E. gracilis* frente a metales pesados, y obtener un cultivo de células más resistente. Las siguientes concentraciones fueron:

TABLA 4. Condiciones de metales al 4º pase (la cantidad de metal se duplicó, sin embargo para Cd y Cu las concentraciones permanecieron constantes).

Cepa + metal	ZnSO ₄	FeSO ₄	HgCl ₂	K ₂ CrO ₄	CrCl ₃	CdCl ₂	CuSO ₄	Control A	Control B
[metal µL]	10mM	1mM	100 µM	2mM	3mM	200 µM	1mM	--	--
Cant. (mL)	1.0	5.0	0.05	1.0	1.5	0.1	0.1	--	--

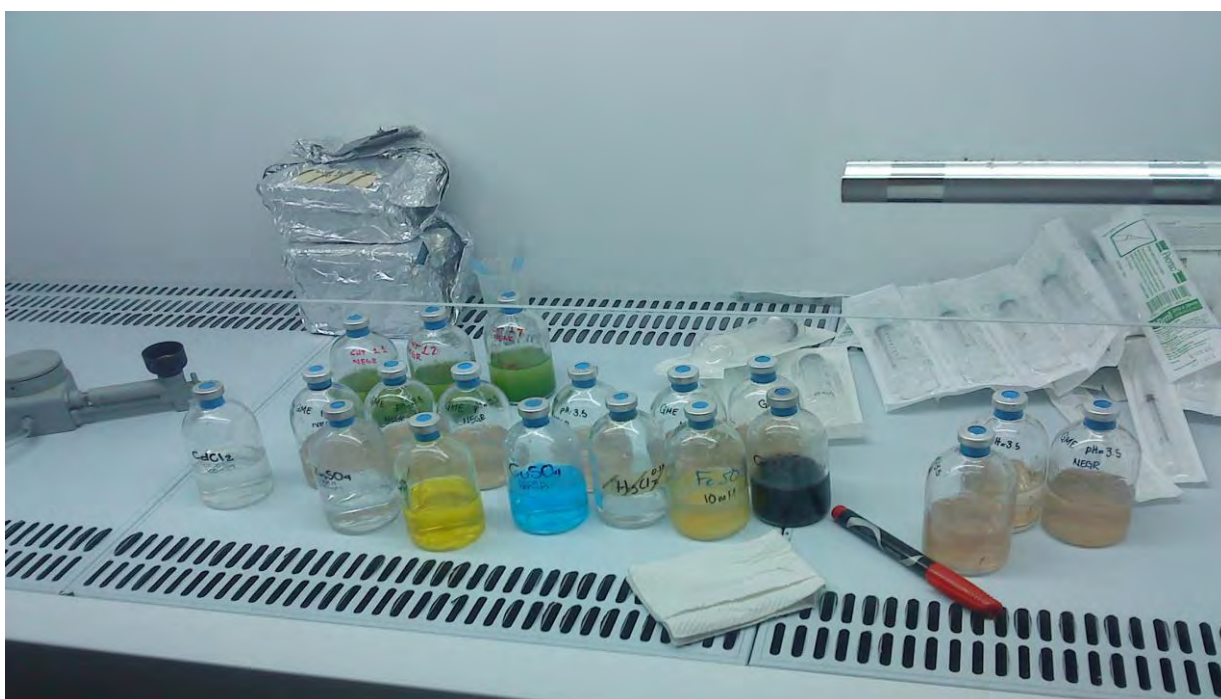


FIGURA D. Frascos inoculados con células fotosintéticas en condiciones de microaerofilia y frascos con metales pesados para inocular las células.

6.2 Condiciones de crecimiento

Se utilizaron cultivos axénicos de *E. gracilis* Klebs fotosintética (Cepa Z). Para evaluar el efecto del metal, en matraces con medio aerobio o anaerobio se añadieron diferentes concentraciones de metal pesado descrita en la tabla 5 a partir de un stock calibrado de cada uno de ellos.

TABLA 5. Concentración del stock teórico y experimental de cada uno de los metales pesados.

METAL	ZnSO ₄	FeSO ₄	HgCl ₂	K ₂ CrO ₄	CrCl ₃	CdCl ₂	CuSO ₄
[STOCK]	500	10 Mm	0.1 M	100	100	100	500
TEORICA	Mm			mM	mM	mM	mM
[STOCK]	5 Mm	500 μM	50 μM	1 mM	2 mM	200	1 mM
Experimental						μM	

6.3 Medio anaerobio

El medio de cultivo se preparó utilizando una cámara de anaerobiosis (COY Laboratory products inc. Michigan, USA. Figura E) que contiene un indicador que muestra la concentración de oxígeno [0.00 ppm], en la cámara se sustituye el aire por una mezcla de gases con la siguiente composición (v/v): N₂ 80%, CO₂ 15%, y H₂ 5%). Se ajustó el pH a 3.5 con NaOH y se dejó en constante agitación y burbujeó con una bomba peristáltica durante 2h. Después se adicionó la L-cisteína y 20 min después el sulfuro de sodio anaerobio; inmediatamente en cada uno de los frascos serológicos (cap. 100 mL) se adicionaron 50 mL del medio, se sellaron primero con tapones de goma a presión y en seguida con un arillo metálico. Al sacarlos de la cámara de anaerobiosis se llevaron a esterilizar en autoclave a 120°C durante 45 min a 120 lb/in², después se almacenaron a temperatura ambiente, en un lugar alejado de la luz solar.

Después en un cuarto de cultivo el cual cuenta con campana de flujo laminar y mechero (figura F) se procedió a inocular (tabla 6):

TABLA 6. Condiciones iniciales de los metales en cada uno de los frascos serológicos.

Cepa + metal	ZnSO ₄	FeSO ₄	HgCl ₂	K ₂ CrO ₄	CrCl ₃	CdCl ₂	CuSO ₄	Control A	Control B
[metal]	5 mM	500 μM	50 μM	1 mM	2 mM	200 μM	1 mM	--	--
Cant. (mL)	0.5	2.5	0.025	0.5	1.0	0.1	0.1	--	--

*la cantidad de CO₂ dentro de cada frasco es igual a la cantidad presente en la cámara de anaerobiosis (15% v/v).



Figura E. Cámara de anaerobiosis (monitor de oxígeno e hidrógeno)

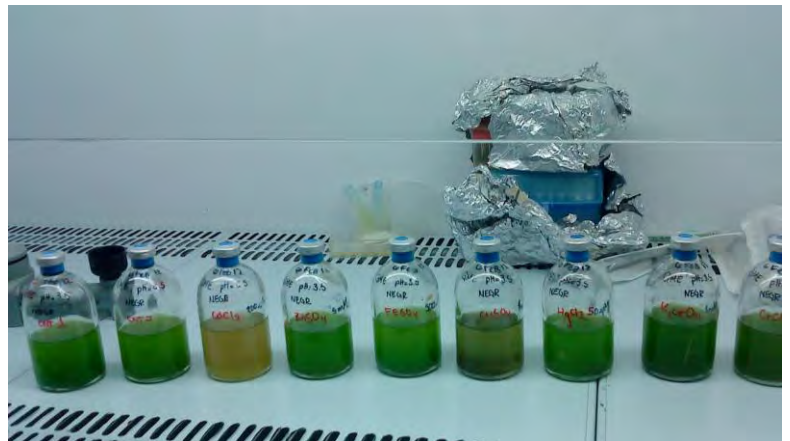


FIGURA F. Frascos serológicos inoculados con *E. gracilis* y metales pesados en condiciones de microaerofilia.

El metabolismo activo de la fotosíntesis de las células generó oxígeno transformando el medio de cultivo anaerobio en microaerófilico; sin embargo, la concentración en el espacio del frasco no llegó a ser más de 2 % (v/v) y el oxígeno disuelto en el medio fue de $5 \pm 2 \mu\text{M}$ (Santiago-Martínez, 2012). Por esta razón, cuando se adicionaron las células al medio anaerobio a este tipo de cultivo se le nombró microaerófilico.

6.4 Medio aerobio

El medio aerobio se preparó fuera de la cámara de anaerobiosis. En agua destilada se mezclaron los componentes de la tabla 3 ajustando el pH a 3.5 manteniendo una agitación constante sin burbujeo. Posteriormente 50 mL de

este medio fueron vertidos en matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL los cuales fueron cerrados con tapones de rosca. Los frascos fueron esterilizados en autoclave por 45 min a una presión de 120 lb/in² y 120°C y se almacenaron a temperatura ambiente, en un lugar alejado de la luz solar. Debido a que en los matraces hay intercambio gaseoso, la cantidad de CO₂ dentro de cada frasco es igual a la presente en el ambiente (Figura G).



Figura G. Matraces con medio de cultivo aerobio inoculado con células fotosintéticas.

6.5 Cosecha de los cultivos

Al final de cada una de las curvas de crecimiento, se cosecharon las células por centrifugación utilizando frascos con tapa de rosca de 250 mL y centrifugando a 5000 rpm (4955 x g) durante 10 min en una centrifuga de piso. En seguida se procedió a tomar 1 mL del sobrenadante del cultivo para determinar el metal remanente, el resto del sobrenadante se desechó. Las células se lavaron con 100 volúmenes de un medio que contenía 250 mM Sacarosa, 10 mM HEPES (4 -2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico ácido) como amortiguador y 2 mM EGTA (ácido etilenglicol tetracético) que es un componente quelante similar a [EDTA](#), sin embargo tiene una afinidad mucho mayor para los cationes divalentes a pH 7.5 (Buffer SHE) y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. Se tomó 1mL del sobrenadante para cuantificar el metal adherido inespecíficamente y las células se resuspendieron de 1-2 mL del buffer SHE y se guardaron en congelación (-23°C) para determinar la cantidad de metal acumulado intracelularmente.

6.6 Cuantificación de metales

Para la cuantificación de metales se utilizó un Espectro de Absorción Atómica Varian Spectra AA 640 usando una mezcla de aire/acetileno con un flujo de $13.5/4.5 \text{ Lmin}^{-1}$ (Lira-Silva *et al.*, 2012). Utilizando lámparas de cátodo hueco con las que se pueden cuantificar cada uno de los metales de la experimentación. La concentración de cada uno de estos metales se obtuvo por la interpolación de curvas patrón construidas por stocks estandarizados de cada uno de los metales expuestos.

Para la determinación de Zn, Fe, Hg, Cr, Cd y Cu, se utilizaron células cosechadas por centrifugación y almacenadas a -23°C : de las células cosechadas se tomaron entre 0.6mL y 0.8mL de muestra y se colocaron en tubos de ensaye de 19 x 160 mm, las muestras fueron: sobrenadante del cultivo (metal remanente), sobrenadante del lavado con buffer SHE (metal adsorbido inespecíficamente por las membranas celulares) y botón de células (metal acumulado intracelularmente); después por cada 1mL de muestra se adicionaron 3mL de una mezcla de ácidos (400mL HNO_3 : 250mL H_2SO_4). Las muestras se digirieron por mezcla de ácidos y por la incubación de 12h a 100°C en un block térmico, con la finalidad de eliminar trazas orgánicas en cada una de las muestras. Se procedió a aforar cada uno de los tubos a 5mL totales con agua ultra pura (milli Q) y por último se procedió a la elaboración de las curvas patrón de cada uno de los metales, adecuándolas a una medida determinada en proyectos anteriores, se tomaron 20 μL de cada uno de estos STOCK y se llevaron a 5mL con agua milli Q después de haber digerido las muestras con una mezcla de ácidos ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$). Esta mezcla de ácidos se preparó en una campana de flujo 1:2 ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) respectivamente; el volumen que se adicionó se hizo con la siguiente relación matemática:

$$X \text{ mL de muestra experimental } \left(\frac{3\text{mL de mezcla de ácidos}}{1\text{mL de muestra teorica}} \right)$$

Dando como resultado la siguiente curva:

METAL	ZnSO ₄	FeSO ₄	K ₂ CrO ₄	CrCl ₃
μmol/20μL Stock	5.11	0.198	1.43	1.7

6.7 Consumo de etanol

Para calcular el EtOH consumido en el medio se utilizó un cromatógrafo de gases (GC-2010 SHIMADZU, Japón) con dos tanques de gas comprimido uno de He₂ y otro de H₂, equipado con una columna capilar de 30 m de largo y 0.32 mm de diámetro interno (HP-PLOTU, Agilent, USA) con un detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés).

Para su medición se tomó 1mL de cada una de las muestras de la siguiente manera: con una jeringa de 1mL se tomó una muestra del medio sin células (tiempo cero), otra de medio con células al tercer pase (dos muestras control A y B) y otro al quinto pase (dos muestras control A y B), se colocaron en tubos eppendorf de 1.7 mL y se etiquetaron, se centrifugaron a 4500 rpm durante 2 min en una microcentrífuga refrigerada de mesa y se filtraron con un filtro de microporo (0.45μm), después se procedió a inyectar 2 μL de muestra en el cromatógrafo de gases. El consumo de etanol fue determinado usando las áreas bajo la curva del pico de etanol para cada condición.

6.8 Consumo de oxígeno y fotosíntesis

Se utilizó un oxímetro que consta de una celda conectada a un electrodo de oxígeno tipo Clark (YSI, modelo 53, USA) equipado con un graficador de papel para registrar los cambios en la producción o generación de oxígeno. Con el fin de determinar si se ve afectado el metabolismo de las células fotosintéticas frente a los metales, se determinó la actividad fotosintética y respiratoria de las células. Para la medición se tomó 0.7 mL del buffer SHE y se colocaron en la celda de 1.7 mL del oxímetro, bajo agitación constante; después de un minuto en el cual se estabilizó la señal, se adicionó directamente 1 mL de los medios con células control (A y B), Fe, Zn, Cr (III) y Cr (VI). Después de estabilizada la señal (2 min aproximadamente) se incidió un rayo de luz blanca (1,000 μmol

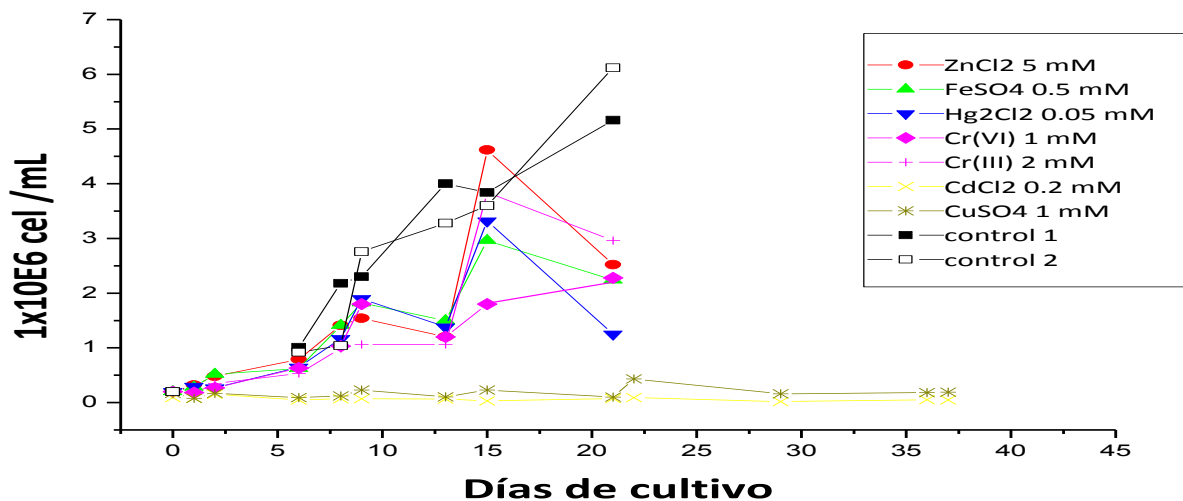
quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se determinó la generación de oxígeno (fotosíntesis); después de 3 min se retiró el pulso luminoso y se determinó el consumo de oxígeno (respiración) celular (Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez, 2003).

7.0 RESULTADOS

A continuación se muestran las gráficas que resumen los datos obtenidos durante el crecimiento celular de *E. gracilis* en 6 pases. Para las células de medio anaerobio de entre 13- 19 días de cultivo y de entre 8-19 días para las células de medio aerobio.

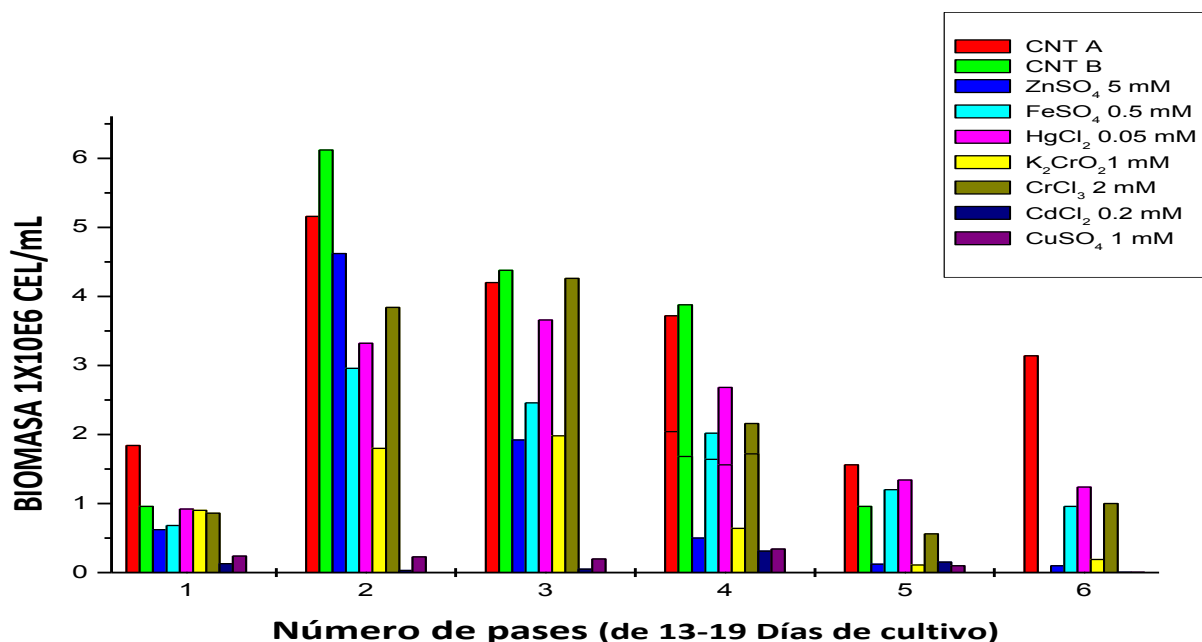
7.1 Medio anaerobio

En la Gráfica 1 se muestra una curva de crecimiento representativa del segundo pase realizado en el laboratorio, en el cual se grafican los días de duración del pase y la densidad celular obtenida.



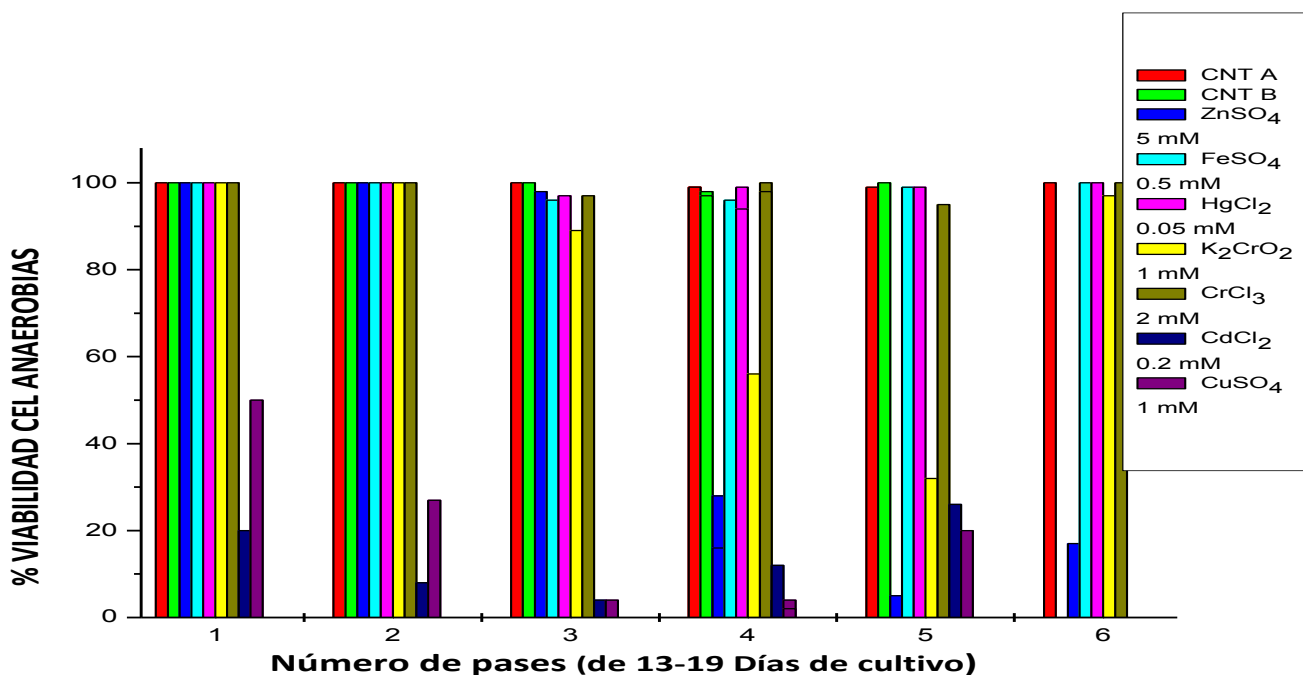
Gráfica 1. Curva de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en ausencia (control) o presencia de metales pesados representativa del segundo pase.

Con excepción de los cultivos con cadmio y cobre, *E. gracilis* se adaptó a las condiciones de estrés a las que fue. A tiempos más largos se determinó un decremento en la densidad celular.



Grafica 2. Densidad celular de *E. gracilis* en un medio de cultivo anaerobio. A partir del cuarto pase se duplicó la concentración de metal pesado.

En las células control la densidad celular fue significativamente mayor con respecto a las células que contenían algún metal pesado. La densidad celular determinada es interesante ya que, trabajos anteriores reportaron que en microaerofilia en presencia de 110 mM glucosa la densidad celular fue aproximadamente de 1×10^6 células/mL (Buetow, 1964). De esta forma nuestras condiciones de cultivo nos permitieron obtener una alta densidad celular aún en presencia de metales pesados. En la gráfica 2 se muestra como *E. gracilis* fue capaz de crecer en presencia de concentraciones sub- y milimolares de metales pesados con una alta viabilidad celular en la mayoría de las diferentes condiciones (Gráfica 3).



Grafica 3. Porcentaje de viabilidad de las células de *E. gracilis* en un medio de cultivo anaerobio.

En condiciones anaerobias en células cultivadas en CdCl₂ y CuSO₄ sí se afectó el crecimiento y la viabilidad de las células, pues la cantidad de células por mL al pase 3, fue menor a 0.5×10^6 células /mL; sin embargo, se logró un buen crecimiento en los metales fisiológicos como FeSO₄ y ZnSO₄ ya que alcanzaron hasta 2.5×10^6 células/mL, mientras que los controles alcanzaron aproximadamente 5×10^6 cél/mL, las células en metales no fisiológicos alcanzaron una densidad celular de hasta 1×10^6 cél/mL (HgCl₂, K₂CrO₄, CrCl₃).

7.2 Cuantificación de metal medio anaerobio

En la Tabla A se describen los metales a determinar en el AAS. En la columna 1 está el metal a determinar, en la columna 2 la condición del medio y número de pase (anaerobiosis). La columna 3 describe la cantidad de metal que se inoculó a cada frasco de 50 mL de medio y la cuarta columna describe la cantidad teórica de metal para cada condición. También se determinó la concentración real, con los Stocks de cada metal.

TABLA A: Concentración de metal teórica en cada uno de los pases del medio anaerobio.

Metal	Condición/ # pase	[Metal teórico] ($\mu\text{mol/L}$)	Cant. de metal (μmol) en 50 mL de cultivo
Fe	anaerobio/ 2	500	25
Fe	anaerobio /3	500	25
Fe	anaerobio /4	1 mM	50
Fe	anaerobio /4-2	1 mM	50
Fe	anaerobio/ 5	1 mM	50
Fe	anaerobio /6	1 mM	50
STOCK Fe		10 mM	0.198-20 μL
Zn	anaerobio /2	5 mM	250
Zn	anaerobio /3	5 mM	250
Zn	anaerobio /4	10 mM	500
Zn	anaerobio /4-2	10 mM	500
Zn	anaerobio/ 5	10 mM	500
Zn	anaerobio /6	10 mM	500
STOCK Zn		500 mM	5.11-20 μL
Cr (III)	anaerobio /2	2 mM	100
Cr (III)	anaerobio /3	2 mM	100
Cr (III)	anaerobio /4	4 mM	200
Cr (III)	anaerobio /4-2	4 mM	200
Cr (III)	anaerobio /5	4 mM	200
Cr (III)	anaerobio /6	4 mM	200
STOCK Cr (III)		100 mM	1.7-20 μL
Cr (VI)	anaerobio /2	1 mM	50
Cr (VI)	anaerobio /3	1 mM	50
Cr (VI)	anaerobio /4	2 mM	100
Cr (VI)	anaerobio /4-2	2 mM	100
Cr (VI)	anaerobio /5	2 mM	100
Cr (VI)	anaerobio /6	2 mM	100
STOCK Cr (VI)		100 mM	1.43-20 μL

En la Tabla B se muestran las células por mL cuantificadas al día de su cosecha (columna 3). La columna 5 muestra el total de células obtenido en 50

mL del cultivo inicial y la última columna nos describe el total de células digeridas disponibles para ser medidas en AAS.

TABLA B: Células totales y digeridas de *E. gracilis*.

METAL	Condición/ #pase	Células (1X10 ⁶)	Día de cosecha	Número de céls en 50 mL (x10 ⁶)	Células digeridas (1X10 ⁶)
Fe	anaerobio /2	2.96	15	148	88.8
Fe	anaerobio /3	2.46	190/15	123	73.8
Fe	anaerobio /4	2.02	19	101	60.6
Fe	anaerobio /4-2	1.64	20	82	49.2
Fe	anaerobio /5	1.2	14	60	36
Fe	anaerobio /6	0.96	13	48	28.8
Zn	anaerobio /2	4.64	15	232	92.8
Zn	anaerobio /3	1.92	190/15	96	57.6
Zn	anaerobio /4	0.19	19	9.3	7.4
Zn	anaerobio /4-2	0.5	20	25	15
Zn	anaerobio /5	0.12	14	6	3.6
Zn	anaerobio /6	0.1	13	25	3
Cr (III)	anaerobio /2	3.84	15	192	115
Cr (III)	anaerobio /3	4.26	190/15	213	127
Cr (III)	anaerobio /4	2.16	19	108	64.8
Cr (III)	anaerobio /4-2	1.72	20	86	51.6
Cr (III)	anaerobio /5	0.56	14	28	16.8
Cr (III)	anaerobio /6	1	13	50	30
Cr (VI)	anaerobio /2	1.8	15	90	54
Cr (VI)	anaerobio /3	1.98	190/15	99	59.4
Cr (VI)	anaerobio /4	0.22	19	11	6.6
Cr (VI)	anaerobio /4-2	0.64	20	32	19.2
Cr (VI)	anaerobio /5	0.11	14	5.5	3.3
Cr (VI)	anaerobio /6	0.19	13	9.5	5.7

En la Tabla C se describen los resultados del AAS. La columna 3 muestra la cantidad de metal remanente en el medio de cultivo al final de la curva de crecimiento (sobrenadante), la columna 4 la cantidad de metal que está adherida en la pared celular de *E. gracilis* es decir, la cantidad adsorbida inespecíficamente. La columna 5 muestra la cantidad de metal que está dentro

de las células, es decir, la cantidad absorbida. En la columna número 8 se indicó la suma de la cantidad adsorbida y la absorbida en las células, esta cantidad es la de nuestro interés porque nos muestra el verdadero valor de metal removido por las células.

TABLA C: Cuantificación de metales pesados por espectrofotometría de absorción atómica

METAL	Condición/ #pase	$\mu\text{mol}/$ metal en Fracc.(A)	μmol en Fracc.(B)	μmol de metal Fracc.(C)	μmol metal total (A+B+C)	μmol de metal removido (B+C)	% μmol removido (B+C)
Fe	anaerobio /2	8.1	1.6	6.9	16.6	8.5	12.8
Fe	anaerobio /3	8.6	2.3	23	34	25	18.6
Fe	anaerobio /4	10.4	2	12.2	24.6	14.2	29
Fe	anaerobio /4-2	28.6	1.7	4.6	35	6.3	9
Fe	anaerobio /5	18.1	1.6	3	22.7	4.6	10
Fe	anaerobio /6	32.8	2.2	1.5	36.5	3.7	5
Zn	anaerobio /2	0.47	34.5	12.8	47.8	47.3	247
Zn	anaerobio /3	41.8	4	19.8	65.6	24	91
Zn	anaerobio /4	0.26	5.4	5.5	11.2	11	488
Zn	anaerobio /4-2	21.2	136	0.3	157	136	432
Zn	anaerobio /5	172	24	0.6	197	24.6	62
Zn	anaerobio /6	189	2	0.85	192	2.8	7.4
Cr (III)	anaerobio /2	137	1.1	0.14	138	1.2	0.9
Cr (III)	anaerobio /3	95.2	2.3	7.8	105	10.1	9.6
Cr (III)	anaerobio /4	66.	1	0.09	67	1.1	3
Cr (III)	anaerobio /4-2	136	2	0.92	139	2.9	4.2
Cr (III)	anaerobio /5	187	3	0.4	190	3.4	3.5
Cr (III)	anaerobio /6	177	3.8	0.34	181	4.1	4.5
Cr (VI)	anaerobio /2	34.9	3.8	0.06	39	3.8	5
Cr (VI)	anaerobio /3	52.8	1.4	1.33	55.5	2.7	2.4
Cr (VI)	anaerobio /4	51.2	1	0.01	52	1	1.9
Cr (VI)	anaerobio /4-2	34.3	3	0.017	37	3.	8
Cr (VI)	anaerobio /5	84.1	1	0.05	85	1	1
Cr (VI)	anaerobio /6	78.5	2	0.06	81	2	2.5

Fracción A= medio de cultivo, fracción B= el lavado, fracción C= acumulado en la célula

En la Tabla D se determinó la cantidad de metal que se adicionó a cada medio de cultivo (columna 3); la cantidad que se detectó en las células (columna 4); y el metal que se perdió al momento de la cosecha.

En algunos de los casos el resultado es inverso esto es posible porque algunos de estos metales se encuentran como parte del medio de cultivo.

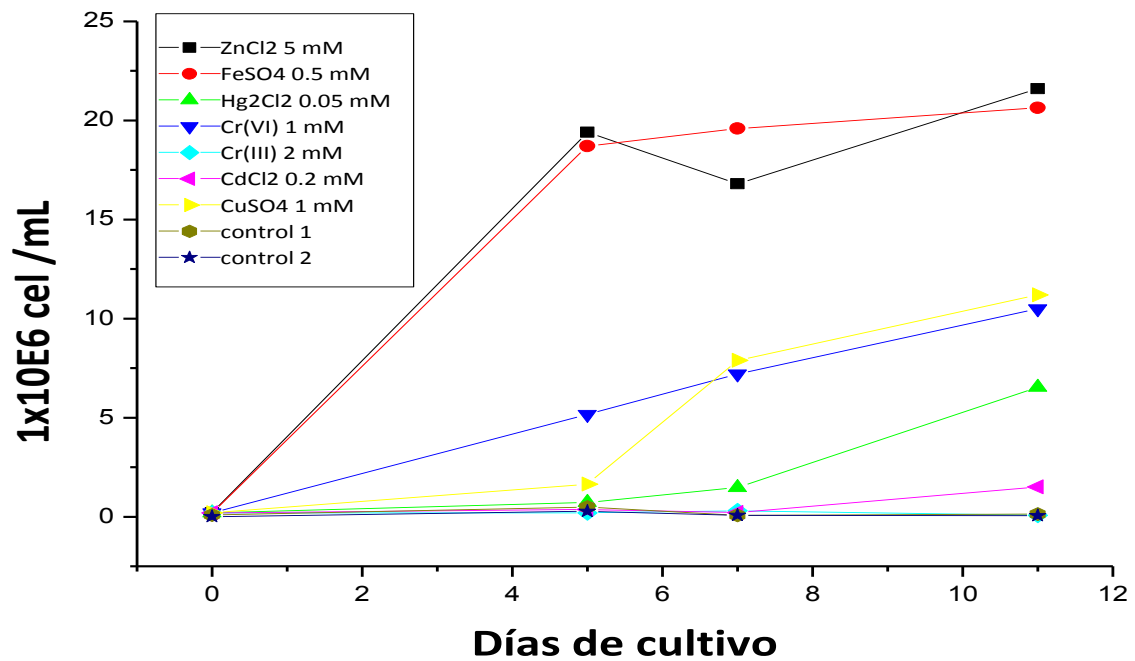
TABLA D: Cantidad de metal en cada uno de los cultivos anaerobios.

Metal	Condición/ # pase	Cantidad de metal total teórico (μmol)	(A+B+C) μmol (Tabla C columna 6)	Metal perdido μmol
Fe	anaerobio /2	25	16.6	8.4
Fe	anaerobio /3	25	34	-8.9
Fe	anaerobio /4	50	24.6	25.4
Fe	anaerobio /4-2	50	35	15.1
Fe	anaerobio /5	50	22.7	27.3
Fe	anaerobio /6	50	36.5	13.5
Zn	anaerobio /2	250	47.8	202.2
Zn	anaerobio /3	250	65.6	184.4
Zn	anaerobio /4	500	11.2	488.8
Zn	anaerobio /4-2	500	157	342.5
Zn	anaerobio /5	500	197	303.2
Zn	anaerobio /6	500	192	308.2
Cr (III)	anaerobio /2	100	138	-38.5
Cr (III)	anaerobio /3	100	105	-5.3
Cr (III)	anaerobio /4	200	67	32.8
Cr (III)	anaerobio /4-2	200	139	60.6
Cr (III)	anaerobio /5	200	19	9.8
Cr (III)	anaerobio /6	200	181	19.2
Cr (VI)	anaerobio /2	50	39	11.2
Cr (VI)	anaerobio /3	50	55.5	-5.5
Cr (VI)	anaerobio /4	100	52	47.8
Cr (VI)	anaerobio /4-2	100	37	62.7
Cr (VI)	anaerobio /5	100	85	14.8

Cr (VI)	anaerobio /6	100	81	19.4
---------	--------------	-----	----	------

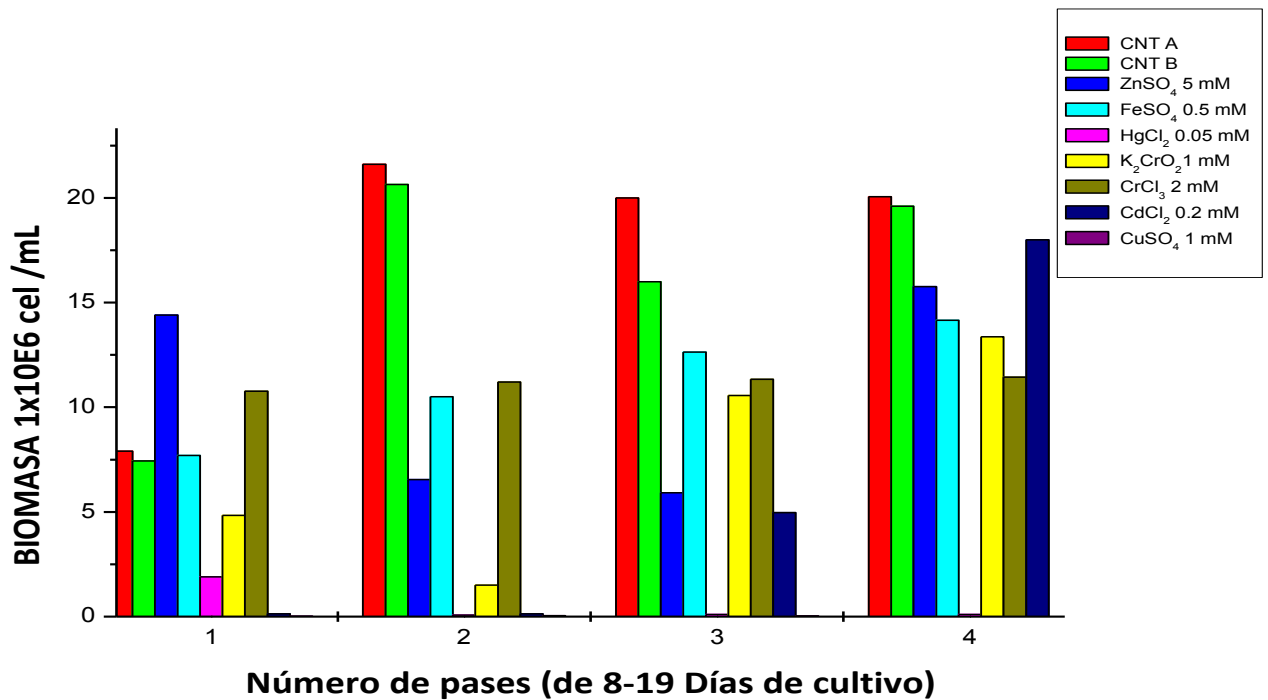
7.3 Medio aerobio

En la gráfica 4 se muestra una curva representativa de la densidad celular en células expuestas a metales en condiciones aerobias.



Grafica 4. Curva de crecimiento representativa del segundo pase aerobio.

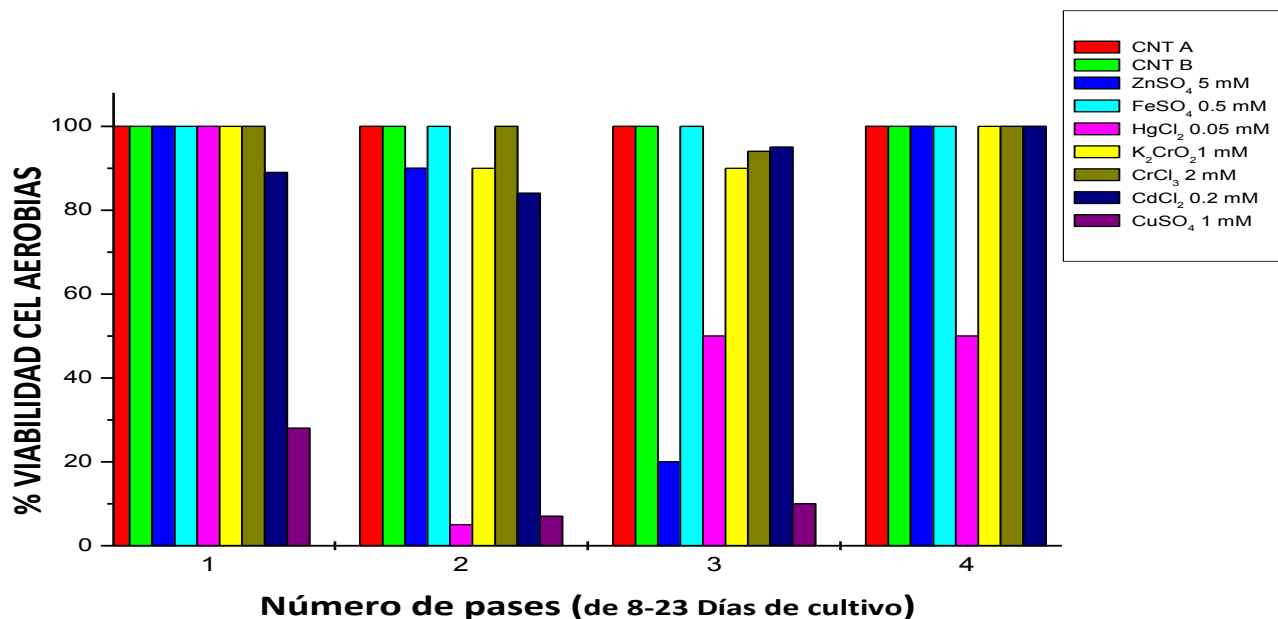
El crecimiento en condiciones aerobias de las células control fue mayor que para los controles en condiciones de anaerobiosis, ya que estas duplicaron la densidad celular. En aerobiosis los cultivos fueron altamente sensibles a Cu Hg y Cd.



Grafica 5. Densidad celular de *E. gracilis* cultivada en un medio aerobio (cabe mencionar que la concentración de metales para los cuatro pases siempre fue la descrita en la Tabla 5).

En la gráfica 5 se muestra que el crecimiento de las células en los medios de cultivos aerobios es mayor a 5×10^6 cél/mL tanto para los metales fisiológicos como para los no fisiológicos; sin embargo, las células cultivadas en HgCl₂ y CuSO₄ en condiciones oxigénicas no crecen, inclusive se observó que perecen desde el primer pase.

Si hacemos una comparación con los medios de cultivo anaerobios, el estrés oxidativo no ayudó en el crecimiento de las células cultivadas en HgCl₂ ya que es el único metal que en presencia de oxígeno es mortal para la célula. También podemos destacar que a pesar de que la densidad celular fue menor, en los medios anaerobios existe un porcentaje de viabilidad significativo para este metal.



Gráfica 6. Viabilidad de células de *E. gracilis* en un medio de cultivo aerobio.

La gráfica 6 determina que a partir del segundo pase hay un decremento significativo en las células de HgCl₂ y CuSO₄, con respecto a las células control, inclusive con las células de cadmio. Sin embargo las células de mercurio permanecen viables en un 50%.

7.4 Cuantificación de metal medio aerobio

En la siguiente tabla se describen (columna 1 y 2) el metal a medir en el AAS y las condiciones en que fueron medidos, para la columna 3 se ilustra la cantidad de metal que se inoculó a cada frasco de 50 mL de medio para cada uno de los medios aerobios; y para la cuarta columna está la cantidad de metal que se debió inocular para cada condición. También se describe cada uno de los STOCK de cada uno de los metales medidos para saber la cantidad real en cada frasco.

TABLA E: Concentración de metal teórica en cada uno de los pases del medio aerobio.

Metal	Condición/ #pase	[Metal teórico] ($\mu\text{mol/L}$)	Cantidad de metal (μmol) en 50 mL de cultivo
Cd	aerobio /1	200	10
Cd	aerobio /2	200	10
Cd	aerobio /3	200	10
Cd	aerobio /4	200	10
STOCK Cd		100 mM	1.97-20 μL
Fe	aerobio /1	500	25
Fe	aerobio /2	500	25
Fe	aerobio /3	500	25
Fe	aerobio /4	500	25
STOCK Fe		10 mM	0.198-20 μL
Zn	aerobio /1	5 mM	250
Zn	aerobio /2	5 mM	250
STOCK Zn		500 mM	5.11-20 μL
Cr (III)	aerobio /1	2 mM	100
Cr (III)	aerobio /2	2 mM	100
Cr (III)	aerobio /3	2 mM	100
STOCK Cr (III)		100 mM	1.7-20 μL
Cr (VI)	aerobio /1	1 mM	50
Cr (VI)	aerobio /3	1 mM	50
STOCK Cr (VI)		100 mM	1.43-20 μL

En la Tabla F se muestran las células por mL cuantificadas al día de su cosecha (columna 3). La columna 5 muestra el total de células obtenido en 50 mL del cultivo inicial y la última columna nos describe el total de células digeridas disponibles para ser medidas en AAS.

TABLA F: Células totales y digeridas de *E. gracilis*.

Metal	Condición/#pase	Células 1X10 ⁶	Día de cosecha	Número de células totales en 50 mL	Células Digeridas (1X10 ⁶)
Cd	aerobio /1	0.13	8	6.5	3.25
Cd	aerobio /2	0.134	11	6.7	4.02
Cd	aerobio /3	4.96	19	248	148.4
Cd	aerobio /4	18	19	900	540
Fe	aerobio /1	7.74	8	387	232.2
Fe	aerobio /2	10.48	11	524	314.4
Fe	aerobio /3	12.64	19	632	379.2
Fe	aerobio /4	14.16	19	708	424.8
Zn	aerobio /1	14.46	8	723	578.4
Zn	aerobio /2	6.54	9	327	261.6
Cr (III)	aerobio /1	10.76	8	538	322.8
Cr (III)	aerobio /2	11.2	9	560	336
Cr (III)	aerobio /3	11.36	19	568	340.8
Cr (VI)	aerobio /1	4.84	8	242	145.2
Cr (VI)	aerobio /3	10.56	19	528	316.8

En la tabla G se describe los datos de adsorción y acumulación de los metales. La columna 3 muestra la cantidad de metal en el sobrenadante del medio de cultivo, la columna 4 la cantidad de metal adherida en la pared celular de *E. gracilis*, es decir, la cantidad adsorbida, en la columna 5 la cantidad de metal dentro de las células, es decir, la cantidad absorbida. En las columnas 6 y 7 se muestra la suma de los valores obtenidos y el porcentaje de los mismos, en la columna número 8 únicamente es la suma de la cantidad adsorbida y la absorbida en las células ya que es la cantidad que realmente nos interesa saber que se acumuló en las células.

TABLA G: Resultados obtenidos por el espectro de absorción atómica (AAS)-

Metal	Condición/ #pase	μmol de metal en cultivo Fracc.(A)	μmol de metal en el Lavado Fracc.(B)	μmol metal acumulado en células Fracc.(C)	μmol de metal total (A+B+C)	μmol de metal Removido (B+C)
Cd	aerobio /1	7.6	0.9	0.1	8.6	1
Cd	aerobio /2	4.1	0.4	2.9	7.5	3.32
Cd	aerobio /3	7.42	0.54	0.38	8.3	0.92
Cd	aerobio /4	0.4	0.4	11.3	12.1	11.7
Fe	aerobio /1	3	3.3	31.6	38	34.9
Fe	aerobio /2	7.2	3.1	22	32.4	25.2
Fe	aerobio /3	0.6	1.3	11.7	13.5	12.95
Fe	aerobio /4	3	4.2	23	30.2	27.2
Zn	aerobio /1	130	2.6	44	177	46.8
Zn	aerobio /2	21	8	19	47.2	26.5
Cr (III)	aerobio /1	25.5	1	1	27.5	2
Cr (III)	aerobio /2	0.77	0.13	1.2	2.1	1.34
Cr (III)	aerobio /3	66	0.8	1.6	68.3	2.42
Cr (VI)	aerobio /1	312	0.6	0.02	32.5	0.65
Cr (VI)	aerobio /3	26	1	8	34.7	9

En la Tabla H se muestra la cantidad de metal que se está perdiendo. Es importante tomarlo en cuenta pues al restar esta cantidad nos da un dato más certero.

Las razones pueden ser que al momento de la cosecha se perdieran células, y en el caso de los números negativos quiere decir que se está ganando metal, lo cual es un tanto ilógico, pues en Cd no puede haber un aumento del metal porque está matando a las células; sin embargo, en Fe es de gran importancia, ya que en el medio pudieran haber trazas de este metal, porque en el mismo medio se le adicionó. La cuantificación de metal arrojó la suma de la remoción, y las pérdidas significativas.

TABLA H: Cantidad de metal en cada uno de los cultivos anaerobios.

Metal	Condición/#pase	Cantidad de metal total teórico(μmol)	μmol (Tabla G columna 6) (A+B+C)	Metal perdido μmol
Cd	aerobio /1	10	8.6	1.4
Cd	aerobio /2	10	7.5	2.5
Cd	aerobio /3	10	8.3	1.7
Cd	aerobio /4	10	12.1	-2.1
Fe	aerobio /1	25	38.0	-13.0
Fe	aerobio /2	25	32.4	-7.4
Fe	aerobio /3	25	13.5	11.5
Fe	aerobio /4	25	30.2	-5.2
Zn	aerobio /1	250	177	73.0
Zn	aerobio /2	250	47.2	208.8
Cr (III)	aerobio /1	100	27.5	72.5
Cr (III)	aerobio /2	100	2.1	97.9
Cr (III)	aerobio /3	100	68.3	31.7
Cr (VI)	aerobio /1	50	32.5	17.5
Cr (VI)	aerobio /3	50	34.7	15.3

7.5 Consumo de etanol

En la tabla 8 se muestra el consumo del etanol por las células de *E. gracilis* en los diferentes pases. Se determinó que en los cultivos microaerofílicos se consumió una menor proporción con respecto a los cultivos aerobios donde se ha reportado que el etanol se consume por completo a los dos días de cultivo (Jasso-Chávez et al., 2010).

TABLA 7. Consumo de etanol por las células *E. gracilis*. En los diversos pases de cultivo, los valores son el promedio de 2 experimentos independientes.

MUESTRA	% EtOH	Etanol teórico [mM]
tiempo cero	100	175
pase 3 (control a)	30	52
pase 3 (control b)	24	42
pase 5 (control a)	62	109
pase 5 (control b)	57	100

El descenso en el consumo de etanol en los cultivos microaerófilos seguramente es la razón por la cual la densidad celular en los cultivos control disminuyó conforme el número de pases aumentaron (gráfica 2).

7.6 Fotosíntesis y respiración celular

Se determinó el efecto de los metales pesados sobre la actividad fotosintética y la respiración celular en las células *E. gracilis* cultivadas en microaerofilia y aerofilia expuestas a diferentes concentraciones de metales se cuantificó, en la siguiente tabla se describen las actividades de las mismas.

TABLA 8. Efecto de los metales pesados sobre la fotorespiración en *E. gracilis* cultivada en condiciones de microaerofilia.

#PASE /CONDICIÓN	FOTOSÍNTESIS	RESPIRACIÓN
	nat g O /min x 10 ⁷ cels	nat g O /min x 10 ⁷ cels
CONTROL (PASE 4)	133	143
10 mM ZnSO ₄ (4 pase)	45	315
1 mM FeSO ₄ (4 pase)	584	459
2 mM K ₂ CrO ₄ (4 pase)	14	1578
4 mM CrCl ₃ (4 pase)	977	676
CONTROL (PASE 6)	136	86
10 mM ZnSO ₄ (6 pase)	1947	0
1 mM FeSO ₄ (6 pase)	223	469
2 mM K ₂ CrO ₄ (6 pase)	752	394

4 mM CrCl ₃ (6 pase)	242	322
200 µM HgCl ₂ (6 pase)	345	91

En general, observamos que en condiciones de microaerofilia del pase 4 al pase 6 en donde las concentraciones de metal pesado están descritas en la tabla 6, sí hubo cambios significativos en la fotosíntesis y respiración conforme al tiempo. Para los cultivos con Zn²⁺ se vio un aumento en la fotosíntesis mientras que para la respiración fue al contrario, ya que no hubo); para las células con Fe²⁺ ciertamente hubo una disminución en la fotosíntesis, pero el consumo de oxígeno se mantuvo constante; para las células que contienen Cr (VI) se determinó que células del 4o pase había una disminución en la fotosíntesis pero para el pase 6 al contrario, hubo un aumento.

Por último, las células que contenían HgCl₂ sobrevivieron 6 pases en perfectas condiciones por lo que se tomó la decisión de medir estas dos actividades haciendo comparación con las células control del pase 6 y se observó que su cantidad es mayor a las control, tanto en fotosíntesis como en respiración y que inclusive los números que en fotosíntesis para células cultivadas en Fe²⁺ es similar, pero en el consumo de oxígeno sí es menor en las células que están cultivadas en Hg²⁺ que en las de Fe²⁺.

8.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Crecimiento celular

En los cultivos realizados en ausencia de oxígeno se mostró una curva de crecimiento típica, con fase exponencial a los 8-9 días tanto en cultivos control y expuestos a metales pesados (Grafica 1), a excepción de Cd²⁺ y Cu²⁺ que fueron altamente tóxicos, debido probablemente al estrés oxidativo generado, lo que condujo a una disminución en la producción de biomasa (gráfica 2), mientras que las células se duplicaron al menos una vez, mientras que la viabilidad no se vio afectada (gráfica 3). Se sugiere que la densidad celular se vio afectada por la acumulación de los metales; para los metales fisiológicos

Fe y Zn fue al contrario, se observó que las células no detuvieron su proceso de duplicación aunque el crecimiento estuvo por debajo de las células cultivadas en aerobiosis.

En el transcurso del tiempo, en las células expuestas a Fe, Zn, Hg, Cr (IV) y Cr (III) el crecimiento celular se vio afectado; sin embargo, esto no impidió la duplicación celular y con el paso de los días sí se incrementó la biomasa. En los pases 4, 5 y 6 donde se mostró que se duplicó la cantidad de metal, ésta no afectó mayormente la densidad celular con la excepción de las células expuestas a Zn, donde seguramente el exceso en la concentración del metal fue muy alta (5 mM) y también a que las células están dejando de consumir oxígeno (Tabla 7).

Para el resto de los medios de cultivo con metales pesados (Cd, Hg, y Cu) se observó una disminución de biomasa comparadas con el cultivo control (en medio anaerobio), ya que en las células aerobias, se determinó que el tiempo en el que tardan en duplicarse las células, es de aproximadamente el doble y esto pudiera deberse a que las capacidades del microorganismo para acumular el metal o retenerlo son diferentes en condiciones microaerofílicas, lo que sugiere que la condición aerobia, no es un factor limitante para buscar una cepa que sea tanto hiper-resistente como hiper-acumuladora puesto que en esta condición se obtiene además, grandes cantidades de biomasa.

8.2 Fotosíntesis y respiración

En la Tabla 8 se observa que para los controles (A y B), Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cr (III) del pase 4 sí hubo tanto fotosíntesis como consumo de oxígeno (respiración), lo que sugiere que *E. gracilis* es capaz de vivir en un medio microaerofílico sin que se vea afectado el mecanismo metabólico de la fotosíntesis aunque el metabolismo mitocondrial puede verse disminuido. Es interesante que las células cultivadas en Fe estén produciendo una mayor cantidad de oxígeno con respecto al control; atribuible a que la clorofila puede contener en su centro Fe o Mg, y de aquí que se estén ligando los compuestos presentes en las células para hacer más centros clorofílicos. Los cultivos con Zn presentaron una disminución en la fotosíntesis con respecto al control, pero con respiración

similar a la de Fe, esto podría sugerir que al ser parte de los metales fisiológicos no todas sus actividades se ven afectadas.

Por otro lado, en la tabla 8 para las células cultivadas en Cr (VI) se determinó que no hubo fotosíntesis, pero sí respiración, lo que sugiere una inhibición específica del Cr (VI) sobre la vía fotosintética como se ha reportado previamente para *E. gracilis* (Rocchetta *et. al.*, 2006). Sin embargo, cuando analizamos los metales al pase 6 de cultivo, de manera significativa el control mostró que tanto fotosíntesis como respiración están totalmente afectados y comprándolos con las células de Fe y Zn e inclusive Hg es muy bajo; sin embargo, cabe destacar que para las células que estuvieron expuestas a Zn no hay consumo de oxígeno pero sí fotosíntesis lo que sugiere que estas células probablemente si contengan un inhibición específica de acuerdo con su actividad de consumo. Las células expuestas a Fe por el contrario hacen fotosíntesis y respiran de forma significativa en el pase 6 sí se observa la respiración más grande que en el pase 4, cabe mencionar que no hay estudios de este tipo de células. Para las células con Cr (VI) y Cr (III) el consumo de oxígeno se observa la afectación en el pase 4; aunque las células expuestas a Cr (VI) en el pase 6 se recuperan en cuanto al mecanismo de fotosíntesis. En el pase 6 las células expuestas a mercurio se observó que además de ser un metal no fisiológico y de los más tóxicos, las células sobrevivieron a más de 10 meses de exposición por lo que era necesario obtener resultados del efecto de este metal sobre la fotosíntesis y la respiración con respecto al control. Se Observó que sí hubo una velocidad importante en la fotosíntesis, inclusive es similar a los dos controles así como para los cultivos con Fe pases 4 y 6. Aunque para los cultivos con Zn, la respiración es baja. Con respecto al Cr (III) el análisis es similar al de las células expuestas a Fe^{2+} , lo que sugiere que las condiciones de microaerofilia estuvieron a favor de las actividades para células expuestas a una cantidad excesiva de este metal.

Algunos de los componentes del medio de cultivo son el sulfuro y la L-cisteína (la finalidad es quelar a los metales, así estos entran a la célula con facilidad y una menor toxicidad, es ahí cuando *E. gracilis* pueden crear mecanismos de resistencia o de acumulación en sus cloroplastos.

8.3 Consumo de Etanol

El etanol entra en la célula por difusión libre, se oxida a acetaldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa; después éste es oxidado por la acetaldehído deshidrogenasa formando acetato que es sustrato de la acetato tiokinasa quien lo condensa con una molécula de coenzima A para formar acetil coenzima A (acetil-CoA) que entra ciclo de Krebs (Jasso Chávez, *et al*, 2001). Con base a esto y a los resultados obtenidos en la Tabla 8, se observa que en el pase 3 la concentración de etanol fue menor (70 % del etanol consumido) que en la del pase 5 (40 % del etanol consumido) lo que sugiere que las células cultivadas en menor tiempo en microaerofilia (pase 3) tienen todavía los mecanismos para utilizar al etanol de una forma tan eficiente como en condiciones de aerobiosis, ya que en esta condición el etanol se consume totalmente (Rodríguez-Zavala et al., 2006; Jasso-Chávez et al., 2010). Sin embargo, en el pase 5 cuando las células se han adaptado más a la microaerofilia, las células han reducido su capacidad para consumir el etanol. De esta forma, el malato y el glutamato, de la mano de la fotosíntesis, son las fuentes de energía que utiliza *E. gracilis* para duplicarse en condiciones de microaerofilia. El porqué de la represión catabólica de la enzima alcohol deshidrogenasa por la ausencia de oxígeno puede deberse a una menor cantidad de mitocondrias en estas condiciones, pero esto se encuentra aún en investigación.

8.4 Cuantificación de metal

Para analizar esta serie de tablas es importante tomar en cuenta que no todos los metales fueron cuantificados pues no se contaba con cada una de las lámparas para la medición de los metales.

En los resultados se observó que el metal más acumulado fue el Zn, las razones que pudieran explicar el proceso son muy variadas. Se ha reportado previamente que *E. gracilis* es un gran acumulador de zinc, probablemente

debido a una gran cantidad de transportadores y de proteínas estructurales y enzimas que requieran este metal. Se observó que las gráficas de densidad y viabilidad de las células de *E. gracilis* expuestas a Zn fueron muy semejantes a las de los controles. Las siguientes células en (orden decreciente) mayor acumulación fueron las células expuestas a Fe, se mencionó que en el medio habían trazas de este metal dado que la concentración de Fe es de 10 mM. y aumentó el contenido de la clorofila de las células ya que éstas cuentan con un centro metálico, las gráficas demuestran que tanto en densidad como en viabilidad se mantuvieron constantes con respecto a las células expuestas a Zn.

El metal que menos se acumuló de acuerdo a las gráficas fue el Cu, que al parecer en condiciones aerobias, este metal fue muy tóxico por lo que no se consiguió el material biológico suficiente para determinar la acumulación de metales.

De acuerdo a la tabla C, se observa que el Cr(VI) y Cr(III) son los que menos acumularon, estudios previos demostraron que las células son afectadas directa y largo plazo por exposición a este metal pesado pues la acumulación se lleva a cabo en las mitocondrias (Pacheco Rosales, 2011). Por otro lado, para las células expuestas a Zn y Fe los porcentajes de remoción son altos con respecto a las células cultivadas en aerobiosis, lo que sugiere que cultivarlas y someterla a pequeñas cantidades de oxígeno es un buen experimento de duplicación celular, se genera una ventaja en cuanto a las células que se cultivan en aerobiosis, pues los biorreactores utilizados generalmente están en condiciones anaerobias. *E. gracilis* es considerado un microorganismo apto para procesos de biorremediación de aguas contaminadas por metales pesados (residuales) en biorreactores anaerobios.

9.0 CONCLUSIÓN

Se obtuvieron cultivos resistentes que lograron duplicarse en altas concentraciones de metales pesados (híper-resistentes) tanto en condiciones de microerofilia como de aerobiosis.

10.0 BIBLIOGRAFIA

- Avilés C, Loza-Tavera, H, Terry N, Moreno-Sanchez R 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch Microbiol 180: 1-10
- Avilés C. 2001. Mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena gracilis* heterotrófica. Tesis de Maestría en Ciencias (Especialidad en Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Avilés C, Torres-Márquez ME, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R. 2005. Time course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 184, 83–92.
- Buetow, DE (Ed.) 1989. The Biology of Euglena, vol IV. Academic Press, New York, pp. 247-314.
- Castro-Guerrero NA, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R, 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1710: 113–121.
- Castro-Guerrero NA, Rodríguez-Zavala JS, Marín-Hernández A, Rodríguez-Enriquez S, Moreno-Sánchez R. 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*. J. Bioenerg. Biomembr. 40: 227-235.
- 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
- 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-Sanchez R 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. Rev Latinoam Microbiol. 48 (2): 203-210. Cervantes-García D; González-Mendiola D. 2003. Respuesta fisiológica de *Euglena gracilis* al estrés por cobre. Quim. Nova, Vol. 34, No. 7, pp.1-2
- Coleman LW, Rosen BH & Schwartzbach SD. 1988. Environmental control of carbohydrate and lipid synthesis in *Euglena*. Plant Cell Physiol 29:423–432

- Devars-Ramos S, 2008. Mecanismos de tolerancia a metales pesados en *E. gracilis*. UNAM, tesis de doctorado (Biología). Facultad de Ciencias-Biologicas. México D.F.
- Devars S, Avilés C, Cervantes C, Moreno-Sánchez R. 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 174: 175-180.
- 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.
- 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.
- Fernández-Leborans G, Novillo A. 1996. Protozoa communities and contamination of several fluvial systems. Water Environ. Res. 68: 311-319.
- García-García, JD. 2008. Mecanismo de resistencia y acumulación de cromo en el protista *E. gracilis* Tesis de Maestría UNAM Facultad de Química. México D.F: Pag. 8.
- García-García JD, Rodríguez-Zavala JS. Jasso-Chávez R. Mendoza-Cózatl D. Moreno-Sánchez R. 2009. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 191: 431-440.
- Gómez Bermejo, RJ. 2010. Uso de plantas silvestres para fitorremediación de sitios contaminados con cromo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias –Biologicas. UNAM. México D.F. Pp. 21.
- 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.
- 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.

- I.Q Vidal Álvarez Montserrat. Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb²⁺), en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia minima*. Tesis de Maestría. Instituto de ecología. Xalapa Veracruz, México 2009. Pp 2
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. 1982. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. FEBS Lett. 150:89–93
- 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
- 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
- Inui H, Ono K, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. 1987. Purification and characterization of pyruvate: NADP⁺- oxidoreductase in *Euglena gracilis*. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135.
- Inui H, Yamaji R, Saidoh S, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. 1991. Pyruvate: NADP⁺-oxidoreductase from *Euglena gracilis*: limited proteolysis of the enzyme with trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 286: 270- 276.
- 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
- Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R. 2003. Cytosol –mitochondria transfer of reducing equivalente by lactate shuttle in heterotrófic *Euglena*. J. Eur. Biochem. 270: 4942-4951.
- 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.
- Jasso-Chávez R, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. 2001. The membrane-bound L- and D- lactate dehidrogenase activities in

- mitochondria from *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 390: 295-303.
- 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.
 - Krebs HA, Kornberg HL. 1957. Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle. Nature 179: 988 – 991.
 - Lira Silva, Elizabeth. 2011. Mecanismos de resistencia a Cromo en *E. gracilis* heterotrófica. Tesis de Licenciatura UNAM, Facultad de Química (Químico de alimentos). México D.F.
 - 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.
 - 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.
 - Mendoza- Cózatl D, Moreno-Sánchez R. 2005. Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. 1706: 88-97.
 - Mendoza-Cózatl D, Rangel-González E. Moreno-Sánchez R. 2006a. Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 51: 521- 528.
 - Mendoza-Cozatl D. Rodríguez-Zavala JS, Rodríguez-Enríquez S, Mendoza-Hernández G. Briones-Gallardo R. Moreno-Sánchez R. 2006b. Phytochelatin-cadmium-sulfide highmolecular-mass complex of *Euglena gracilis* 273: 5703-5713.
 - 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.

- Moreno-Sánchez R, Raya JC. 1987. Preparation of coupled mitochondria from *Euglena gracilis* by sonication. *Plant Sci.* 48: 151-157.
- 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: 10-25.
[<http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/488.pdf>].
- 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.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. *Lehninger's Principles of Biochemistry*, 4th Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- 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.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Norma Oficial Mexicana NOM-AA-51-1981 Análisis de aguas, determinación de metales, método espectrofotométrico de absorción atómica.
- Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Moreno-Sánchez R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Latinoam Microbiol.* 48 (2): 203-210
- 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.
- Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Moreno-Sánchez R. 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 36-42.

- Sánchez E, Vargas M, Mora M, Ortega JM, Serrano A, Freer E, Sittenfeld A Descripción ultraestructural de *Euglena pailasensis* (Euglenozoa) del Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica.
- Trevors JT, Stratton GW, Gadd GM. 1986. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. Can. J. Microbiol. 32: 447-464.
- Uribe A, Moreno-Sánchez R. 1992. Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. Plant Sci. 86, 21–32.
- Uribe A, Chávez E, Jiménez M, Zazueta C, Moreno-Sánchez R. 1994. Characterization of Ca²⁺ transport in *Euglena gracilis* mitochondria. Biochim Biophys Acta 1186: 107- 116.
- 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: 261- 354.
- <http://www.greenpeace.org/mexico/es/Noticias/2012/Marzo/Rios-mexicanos-rios-toxicos/22-marzo-2012>
- <http://www.lenntech.es/metales-pesados.htm>