



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Generación de un consorcio mediante el co-cultivo del protista *Euglena gracilis* y la arquea *Methanosarcina acetivorans* para la producción de metano

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

PAULINA CASTAÑEDA TAMEZ



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:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>MARCO ANTONIO ORTIZ JIMENEZ</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>RICARDO JASSO CHAVEZ</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>JOSE GUADALUPE DE LA ROSA CANALES</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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.

**AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue realizada con el apoyo al proyecto #PCIS08-5 del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) y del proyecto #156969 de CONACyT.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Ricardo Jasso Chávez

**SUSTENTANTE:**

Paulina Castañeda Tamez

## 1. INDICE

1. INDICE .....	3
2. RESUMEN .....	5
3. INTRODUCCION .....	7
3.1. <i>Euglena gracilis</i> .....	8
3.1.1. Fotosíntesis .....	9
3.1.2. Oxidación de sustratos.....	11
3.1.3. Concentración de oxígeno .....	14
3.2. <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	14
3.3. Consorcio .....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVOS.....	21
7. METODOLOGIA .....	22
7.1. <i>Euglena gracilis</i> .....	22
7.1.1. MEDIO DE CULTIVO .....	22
7.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO .....	24
7.1.2.1. CONCENTRACION DE OXIGENO.....	25
7.1.2.2. CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE SODIO (NaCl) .....	25
7.1.3. PARÁMETROS .....	26
7.1.3.1. CRECIMIENTO CELULAR Y VIABILIDAD .....	26
7.1.3.2. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA.....	27
7.1.3.3. CONCENTRACION DE ACETATO .....	28
7.2. <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	31
7.2.1. MEDIO DE CULTIVO .....	31
7.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO .....	32
7.2.2.1. CONCENTRACION DE SUSTRATO.....	33
7.2.2.2. CONCENTRACION DE OXIGENO.....	33
7.2.2.3. CONCENTRACION DE NaCl.....	34
7.2.2.4. VARIACION DE TEMPERATURA .....	34
7.2.3. PARAMETROS .....	34
7.2.3.1 CRECIMIENTO CELULAR.....	34
7.2.3.1.1. DENSIDAD OPTICA .....	35
7.2.3.1.2. CONCENTRACION DE PROTEINA .....	35

7.2.3.1.3. CONSUMO DE ACETATO .....	36
7.2.3.1.4. PRODUCCIÓN DE METANO .....	36
7.3. Consorcio .....	39
7.3.1. MEDIO DE CULTIVO .....	39
7.3.2. CONDICIONES DE CULTIVO .....	40
7.3.3. PARAMETROS .....	42
7.3.3.1. CRECIMIENTO CELULAR .....	42
7.3.3.2. PRODUCCION DE METANO .....	42
8. RESULTADOS .....	44
8.1. <i>Euglena gracilis</i> .....	44
8.2. <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	50
8.3. Consorcio .....	55
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
9.1. <i>Euglena gracilis</i> .....	63
9.2. <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	65
9.3. Consorcio .....	66
10. CONCLUSIONES .....	67
11. PERSPECTIVAS.....	69
12. ANEXO .....	70
12.1. Índice de Figuras .....	70
12.2. Índice de Tablas .....	71
13. BIBLIOGRAFÍA .....	72

## 2. RESUMEN

La producción biotecnológica de gas metano se realizó a partir de la generación de un consorcio en el cual *Euglena gracilis* fue capaz de excretar acetato que *Methanosarcina acetivorans* utilizó para obtener energía mediante la vía de la metanogénesis.

Debido a sus diferencias en los ecosistemas donde se encuentran, estos dos microorganismos fueron adaptados a condiciones de cultivo diferentes a las óptimas en un medio modificado para formar el consorcio. *E. gracilis* fue expuesta a diferentes concentraciones de NaCl y cultivada en un medio anaerobio, como parámetros que indicaron la adaptación, se determinó la densidad celular y la viabilidad, el contenido de clorofila y la excreción de acetato al medio de cultivo. *M. acetivorans* fue cultivada en presencia de oxígeno (0.4 % V/V, 13.2  $\mu\text{mol O}_2$ ) y se monitoreó la densidad óptica, la producción de metano, concentración de proteína y el consumo de acetato como parámetros de crecimiento.

El NaCl afectó el crecimiento y la duplicación de *E. gracilis*, siendo más evidente su efecto a 0.2 y 0.3M NaCl donde no se observó duplicación celular, aunque la composición del medio modificado favoreció la duplicación celular, la cual aumentó de 3 a 5  $\times 10^6$  cél/ mL en el cultivo control y con 0.1 M de NaCl al final de la curva, respectivamente. Otro efecto del estrés salino fue la estimulación en la síntesis de clorofila con un aumento proporcional a la concentración de NaCl. En la excreción de acetato no se observó ningún efecto directo por la salinidad, sino que al no duplicarse en las concentraciones altas de sal la concentración de acetato en el medio disminuyó. En condiciones de baja salinidad, la excreción de acetato aumentó a partir del día 5, lo que coincidió con la fase exponencial de crecimiento. En la condición control la excreción de acetato presentó una fluctuación de 0 a 3 mM a lo largo del cultivo.

Las modificaciones al medio de cultivo con 100 mM de acetato no afectaron de forma significativa a *M. acetivorans* ya que en todas las condiciones produjo una cantidad similar de metano (5 mmol), pero en cuanto a la concentración de proteína y densidad óptica de los cultivos en los medios modificados no alcanzaron los valores de los cultivos en el medio óptimo (medio HS). La cepa preadaptada a aire igualó los resultados establecidos por la cepa control en casi todas las condiciones.

Los consorcios realizados fueron capaces de producir metano de forma continua por al menos 30 días donde la mejor condición de cultivo fue con 0.1 M de NaCl, produciendo hasta 1.1 mmol de metano, y de forma interesante, sus resiembras continuaron produciendo hasta 0.2 mmol de metano en el cultivo con 0.2 M NaCl y 0.2 mmol de metano en el cultivo control.

Se puede concluir que estos microorganismos tienen la capacidad para contender contra condiciones de estrés, tales como diferentes concentraciones de NaCl (*E. gracilis*) y a la presencia de oxígeno (*M. acetivorans*), y para generar un consorcio exitoso.

### 3. INTRODUCCION

La mayor parte de la energía para uso humano es obtenida a partir de combustibles fósiles, como el carbón, petróleo y gas natural, estos como lo indica su nombre, son restos de seres vivos sepultados hace millones de años y son considerados recursos no renovables, esto quiere decir que se encuentran en cantidades limitadas por lo que evidentemente llegará el momento en el que estos recursos se acaben, esto da pie a investigaciones para buscar nuevos recursos o nuevas fuentes para obtener combustibles. El gas natural está conformado en su mayor parte por metano (> 80%) y como sabemos en nuestro país está destinado principalmente al uso domestico e industrial. Datos afirman que aproximadamente un 80 u 85% de la producción mundial de metano proviene de origen biológico (*Global Methane Initiative*).

Muchos miembros del phylum *Euryarchaeota* producen metano como el principal producto final de su metabolismo. El metano es el último paso en la biodegradación anaerobia de compuestos orgánicos y ocupa como aceptor de electrones al CO<sub>2</sub> (generalmente). El metano y su producción biológica fueron descubiertos en el siglo XVIII, cuando el físico italiano Alessandro Volta recolectó gas de sedimentos anaerobios de pantanos y humedales y mostró que era flamable, es decir combustible (*Reay et al, 2010*).

El biogás metano es producido de forma casi exclusiva por arqueas metanogénicas. Los microorganismos que generan metano se les conoce como metanogénicos. Se sabe que al menos dos tercios del metano en la naturaleza se derivan de acetato, de forma interesante, solo los methanosarcinales y las methanosaetas son los órdenes de los metanogénicos que tienen la capacidad de utilizar este sustrato. Uno de los microorganismos capaces de llevar a cabo la metanogénesis es *Methanosarcina acetivorans* que fue aislada de sedimentos en el Scripps Canyon en San Diego, California, EU. Esta arquea marina se caracteriza por generar metano a partir de fuentes de carbono como lo son

acetato, metanol y metilaminas, esto en condiciones de anaerobiosis estricta (Sowers et al., 1984).

En este proyecto se propone que para la obtención biotecnológica del metano se genere un consorcio en el cual *M. acetivorans* reciba como fuente de carbono acetato por parte de otro microorganismo, que en este caso es *Euglena gracilis*, un protista de vida libre que reside comúnmente en cuerpos de agua dulce y con gran contenido de materia orgánica en descomposición. Debido a la gran diferencia que existe entre las condiciones óptimas de cultivo de estos dos microorganismos se pretende adaptarlos a condiciones similares en las que puedan ser co-cultivados para formar el consorcio.

### **3.1. *Euglena gracilis***

Las características taxonómicas que posee el género *Euglena* (parecidas a algunas presentes en plantas, bacterias y animales y algunas únicas) la establecen como un protista (Johnson, 1968). El género *Euglena* es caracterizado por tener una gran diversidad de formas y habitar una gran diversidad de nichos ecológicos incluyendo aguas dulces, salobres, ácidas, alcalinas y tropicales tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Johnson, 1968). Estos microorganismos pueden ser cultivados bajo estrictas condiciones controladas de concentración de sal, fuente de carbono, intensidad luminosa, pH y temperatura (Kempner, 1982).

*Euglena gracilis* es un organismo mixótrofo, es decir, que tiene la capacidad de crecer usando la luz y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (fotosintética), en esta condición presenta una coloración verde característica por la presencia de cloroplastos y también puede crecer en oscuridad (incolora) con una variedad de sustratos orgánicos tales como glucosa, peptona, etanol y ácidos como glutámico, málico, láctico, acético y succínico (heterotrófica) (Buetow, 1968).

*Euglena gracilis* puede sobrevivir en un intervalo amplio de pH de 3 a 8 y de temperatura, 19 a 30°C; no requiere NaCl necesario para su crecimiento, ya que estos iones son suplementados de otras sales. Es un organismo flagelado, carece de pared celular pero cuenta con una película semirrígida que realiza funciones similares a la pared y puede realizar “movimiento euglenoide”. Se encuentra presente un producto de reserva llamado paramilo que es un polímero de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3-glucosídicas que es típico en los euglenoides (Buetow, 1989). Cuenta con pigmentos tales como clorofilas a y b,  $\beta$ -caroteno, anteroxantina y neoxantina que se encuentran en numerosos cloroplastos (Bravo-Sierra; 2004), estos pigmentos son utilizados para el transporte de electrones tanto en la cadena respiratoria como en la fotosíntesis. *E. gracilis* es capaz de vivir en condiciones tanto aerobias como microaerobias (Castro-Guerrero; 2005).

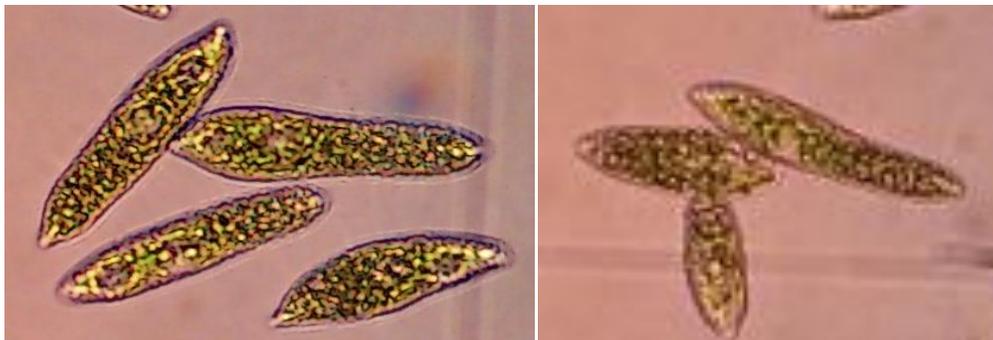


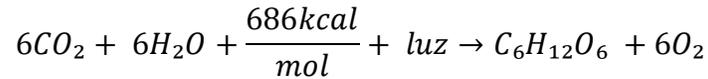
Figura 1. Fotografías de *E. gracilis* mixótrofa (40x). Paulina Castañeda, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”

La cepa fotoheterotrófica tiene la capacidad de realizar fotosíntesis y también oxidar diferentes fuentes de carbono para obtener energía.

### 3.1.1. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso de reacciones de oxido-reducción, en el que el carbono presente en el dióxido de carbono se reduce a carbono orgánico (glucosa) ocupando como donador de electrones al agua, mediante el aprovechamiento de la energía luminosa y con desprendimiento de oxígeno

(García-Breijo, 2006). El proceso global puede expresarse mediante la siguiente reacción:



El proceso de fotosíntesis se efectúa en dos etapas de reacción, en la primera (reacciones dependientes de la luz) se convierte la energía luminosa en energía química (ATP), a partir de la ATP sintasa que mediante el paso de protones genera energía cinética que permite la fosforilación del ADP. (Figura 2). Las moléculas de agua se separan y el NADP<sup>+</sup> acepta los electrones liberados en forma de hidruro, transformándose en NADPH + H<sup>+</sup>, mientras los átomos de oxígeno son liberados. Este proceso se lleva a cabo en los organelos llamados cloroplastos.

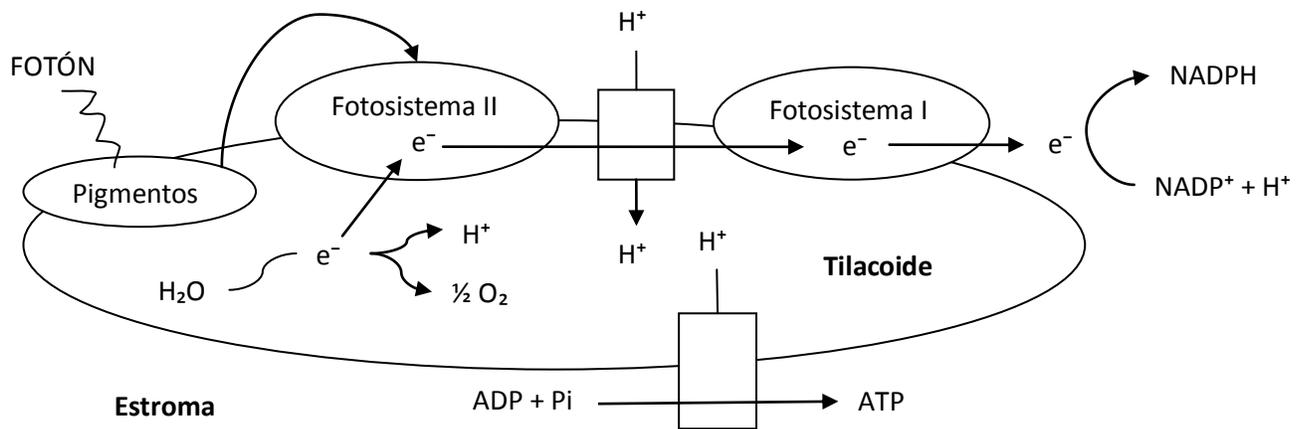


Figura 2. Producción de ATP y NADPH en la primera etapa de la fotosíntesis (dependiente de luz). Esquema de una sección transversal de los pliegues en forma de disco de la membrana tilacoidal.

Los cloroplastos tienen dos membranas externas que contienen una matriz semilíquida llamada estroma, una membrana tilacoidal plegada dentro del estroma y tilacoides conectados por canales. En los tilacoides se encuentran los pigmentos que son los encargados de captar la luz y transferir los fotones a los fotosistemas (II y I). En la segunda etapa (reacciones independientes de la luz) se utiliza la

energía (ATP) para la síntesis de glucosa y otros carbohidratos ocupando los átomos de hidrógeno, los electrones donados por el NADPH, el carbono y oxígeno extraídos del dióxido de carbono y el agua (Figura 3) (Starr, 2008).

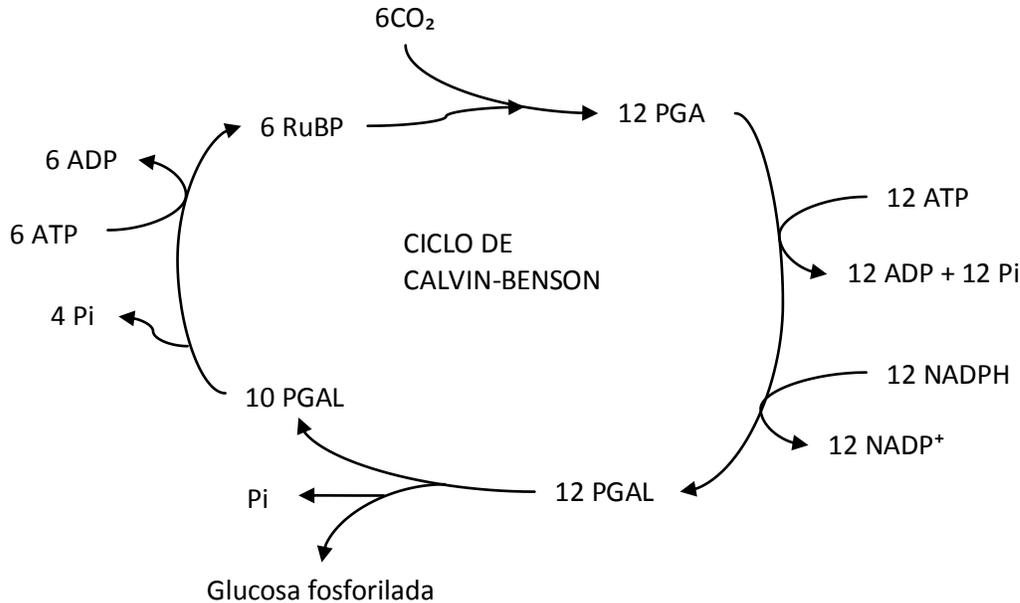


Figura 3. Producción de Glucosa en el ciclo de Calvin-Benson. Reacciones de la segunda fase de la fotosíntesis (independiente de luz). Para formar cada molécula de Glucosa el ciclo da 6 vueltas. Abreviaturas:  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono; PGA, ácido fosfoglicérico; ADP y ATP, adenosin di y trifosfato, respectivamente;  $\text{NADP}^+$  y NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada y reducida, respectivamente; PGAL, fosfogliceraldehído; Pi, fosfato inorgánico; RuBP, ribulosa bisfosfato.

### 3.1.2. Oxidación de sustratos

El metabolismo de los sustratos exógenos es un proceso de asimilación oxidativa en el que un solo sustrato proporciona tanto energía como carbono para su crecimiento. La principal vía de oxidación y de asimilación oxidativa de la glucosa es la de Embden-Meyerhof-Parnas (Glucólisis) cuya presencia ha sido demostrada tanto para glucosa exógena como endógena (paramilo) en *E. gracilis*. Otras fuentes de carbono utilizadas para su cultivo controlado en el laboratorio son ácido málico (malato) y ácido glutámico (glutamato). El malato es metabolizado por dos

enzimas: la malato deshidrogenasa y la enzima málica que catalizan las reacciones de malato utilizando  $\text{NAD}^+$  hasta oxaloacetato y  $\text{NADH}$  y de malato utilizando  $\text{NADP}^+$  hasta piruvato,  $\text{CO}_2$  y  $\text{NADPH}$ , respectivamente. La presencia de estas enzimas fue medida y se determinó que en condiciones de microaerofilia la enzima que presenta mayor actividad es la enzima málica (Santiago, 2012). Por su parte, el glutamato es introducido a la célula y la enzima glutamato deshidrogenasa cataliza la reacción de glutamato a 2-oxoglutarato en presencia de  $\text{NADP}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Los productos de estas reacciones pueden ser utilizados en el ciclo de Krebs de Euglena para terminar con su degradación y contribuir con carbonos para el crecimiento, generar energía (ATP) y poder reductor ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADPH}$ ), estas reacciones se generan en presencia de  $\text{O}_2$ , mientras que en condiciones anaeróbicas la degradación de estos sustratos tienen como destino la producción de ác. Láctico (Lactato) y etanol. En la cepa fotoheterotrófica los dos procesos se llevan a cabo. En la Figura 4 se muestra como el piruvato formado a partir de la fuente de carbono externa al ser transformado en Acetil-CoA se introduce al ciclo de Krebs, esta transformación la realiza el complejo piruvato: $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa (PNO), ya que *E. gracilis* no cuenta con piruvato deshidrogenasa (Buetow, 1989).

*E. gracilis* se ha utilizado en diversos estudios por su potencial biotecnológico ya que cuenta con la capacidad de resistir y de acumular metales pesados, como el cadmio, zinc, mercurio y cromo (Mendoza-Cózatl, 2002; Mendoza-Cózatl 2006; Devars, 2000; Jasso-Chávez, 2010; Lira-Silva, 2011), también es utilizado en estudios sobre evolución porque posee una historia de múltiples eventos de transferencia horizontal y adición de genes a su genoma (Matsui, 2003; Ahmadinejad, 2007).

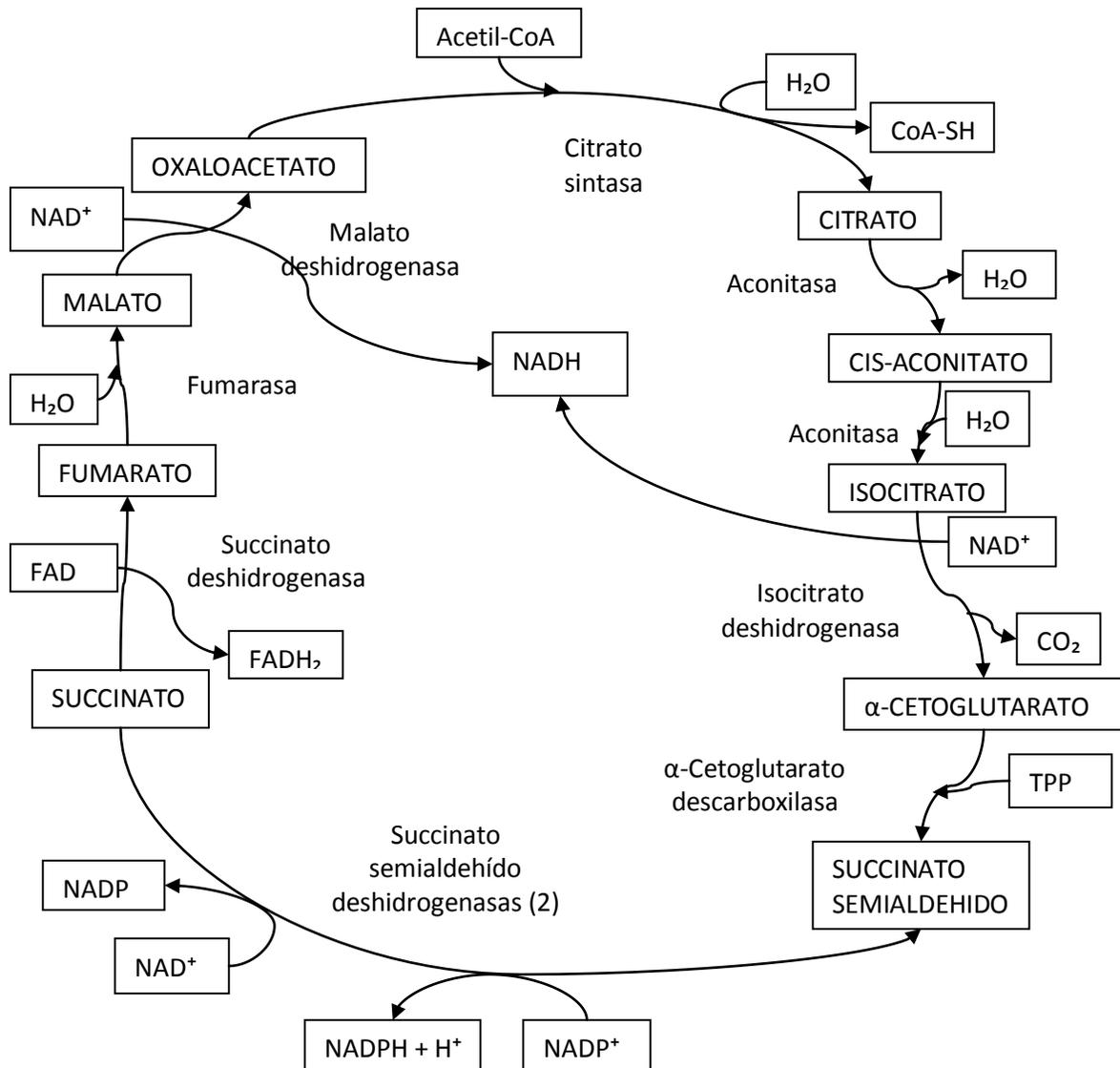


Figura 4. Ciclo de Krebs en *Euglena gracilis*. Abreviaturas: Acetil-CoA, acetil coenzima A; CoA-SH, coenzima A; H<sub>2</sub>O, agua; CO<sub>2</sub>, dióxido de carbono; TPP, pirofosfato de tiamina; NADP<sup>+</sup> y NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado y reducido; NAD<sup>+</sup> y NADP, nicotinamida adenina dinucleótido oxidado y reducido; FADH<sub>2</sub>, flavin adenin dinucleótido (Buetow, 1989).

### 3.1.3. Concentración de oxígeno

Un gran número de especies de *Euglena* se encuentra en situaciones donde están expuestas a grandes cantidades de oxígeno; sin embargo, pueden ser tolerantes a bajas concentraciones de oxígeno cerca de su condición óptima (aerobiosis), lo que sugiere que *Euglena* puede adaptarse a una amplia gama de concentraciones de oxígeno (Lackey, 1968).

La mitocondria que posee *E. gracilis* es capaz de utilizar como aceptor terminal de electrones a diferentes elementos a parte del oxígeno, por lo que se puede considerar a este microorganismo como anaerobio facultativo. La mitocondria es la principal productora de ATP, en condiciones aerobias se realiza la fosforilación oxidativa asociada con el ciclo de Krebs modificado y la cadena respiratoria, pero en condiciones de anaerobiosis la piruvato-NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa constituye la enzima clave para la fermentación única de ésteres de cera, de este modo, la acetil-CoA formada a partir de la descarboxilación del piruvato funciona como aceptor terminal de electrones en la oxidación de la glucosa, haciendo posible la duplicación y sobrevivencia de este microorganismo en ambas condiciones (aerobia y anaerobia) (Hoffmeister, 2004)

### 3.2. *Methanosarcina acetivorans*

Los estudios realizados por Carl Woese dieron como resultado la clasificación del dominio *Archaea*. Las investigaciones definieron tres grupos fisiológicamente distintos: metanogénicos, haloarchaeas y termófilos azufre-dependientes. Los metanogénicos son aquellos que producen metano como último paso de su metabolismo para la obtención de energía. Dentro de las principales arqueas que producen metano se encuentra el género *Methanosarcinaceae*. Este género se considera de los principales metanogénicos, ya que cuentan con una gran versatilidad ambiental, metabólica y fisiológica y son las únicas arqueas que pueden formar complejas estructuras multicelulares (Galagan et al. 2002).

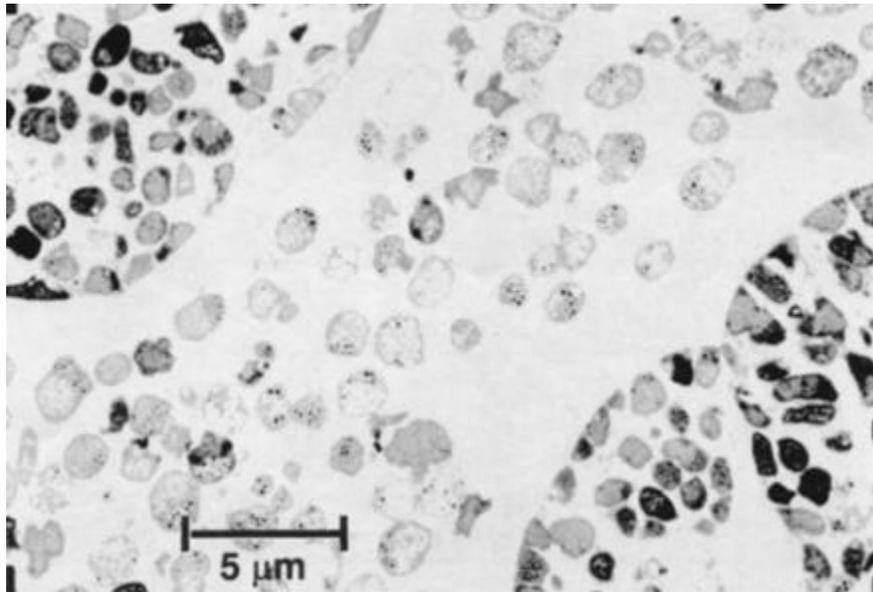


Figura 5. *Methanosarcina acetivorans*. Diferentes formas morfológicas, al centro células individuales y en la parte superior izquierda e inferior derecha agregados multicelulares. Micrografías electrónicas tomadas con microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM 100B (Galagan et al. 2002)

El género *Methanosarcinaceae* habita en sedimentos marinos y lodos residuales de digestores anaerobios. Una de las especies más importantes es *Methanosarcina acetivorans*, esta arquea es anaerobia estricta, el rango de temperatura al que se registra su mayor crecimiento es de 35 a 40°C mientras que el pH óptimo oscila entre 6.5 y 7. Los principales sustratos que consume este microorganismo son acetato, metanol y metilaminas (Kletzin, 2006). Tiene forma cocoide y a menudo forman agregados en forma de racimos (dependiendo de la presión osmótica del medio, ya que en concentraciones de 0.05 M NaCl se encuentran en forma de racimos y cuando hay concentraciones de 0.4 a 1.0 M NaCl se encuentran como células individuales (Sowers, 1984). Cuando se presentan en forma de racimos o agregados se encuentra rodeada por una capa exterior y una monocapa interna adyacente a la membrana celular; la capa exterior relativamente gruesa se compone principalmente de ácido glucurónico y un heteropolisacárido de galactosamina y la capa interna delgada o capa-S está

compuesta principalmente por proteínas (Sowers, 1993). Las células individuales carecen de la capa exterior. En cuanto a las condiciones de crecimiento necesarios se encuentran: la concentración de NaCl, al haber sido aislada de un medio marino la presencia de NaCl es indispensable para el metabolismo de *M. acetivorans*, el rango en el cual es viable este microorganismo es de 0.05 a 1 M de NaCl; por otra parte también es necesaria la presencia de un ion divalente (>50 mM Mg<sup>2+</sup>) para mantener la estabilidad de las proteínas que componen de la capa-S (Sowers, 1993).

Los metanogénicos son considerados anaerobios estrictos (debido a que algunas enzimas fundamentales para la metanogénesis que son extremadamente sensibles al contacto con oxígeno) pero en varios experimentos se indica que el oxígeno no mata instantáneamente a los metanogénicos, como *Methanosarcina* sp, y que algunos casos son capaces de sobrevivir a períodos limitados de exposición a oxígeno. Por otra parte se ha reportado que algunos metanogénicos poseen enzimas protectoras contra los efectos letales del oxígeno como la superóxido dismutasa y catalasa, y en varios estudios se ha comprobado la tolerancia de estos a la exposición por largo tiempo de diversas concentraciones de oxígeno (Liu, 2007).

*M. acetivorans* cuenta con un operón que se denomina cydAB, que presuntamente codifica para un homólogo de la citocromo d: quinol oxidasa presente en *Escherichia coli*. Esta enzima es un eslabón clave para la respiración dependiente de oxígeno en *E. coli* cuando se encuentra en bajas concentraciones de oxígeno. La función principal de la citocromo d oxidasa en *M. acetivorans* no está clara aun, pero se ha sugerido que desempeña un papel importante en la protección contra la toxicidad del oxígeno. Además de la citocromo d oxidasa, también se han identificado los genes para la superóxido dismutasa, la superóxido reductasa y una catalasa. Todas estas enzimas actúan normalmente como protección contra las especies reactivas de oxígeno (Galagan et al, 2002).

La característica por la cual escogimos a este microorganismo fue por su capacidad de producir metano. Como ya se mencionó, ocupa el acetato como uno de los sustratos con los cuales puede obtener energía y liberar metano. La vía metabólica que se ha reportado para este microorganismo utilizando acetato como fuente de carbono en ambientes marinos se muestra en la Figura 6.

Además, estudios en su genoma revelan una extensa diversidad genética y la capacidad de *M. acetivorans* para adaptarse a condiciones ambientales variadas. También, la secuencia del genoma indica el potencial para capacidades metabólicas totalmente inesperadas. Estas incluyen las posibilidades de sustratos para la metanogénesis que aún no han sido descubiertos (presencia de secuencias que codifican para metiltransferasas), el crecimiento no metanogénico utilizando CO (presenta una sola subunidad de la deshidrogenasa de monóxido de carbono) y tal vez incluso la respiración dependiente de O<sub>2</sub> (*Galagan et al. 2002*).

La disponibilidad de métodos genéticos, junto con su diversidad fisiológica y metabólica, hacen de *M. acetivorans* un organismo modelo para el estudio de la biología archaeal (*Galagan et al. 2002*). Este microorganismo también ha sido estudiado como modelo en arqueas para la acumulación de metales pesados, como el cadmio (*Lira-Silva et al, 2013*).



### 3.3. Consorcio

En la naturaleza los organismos se han adaptado a convivir con otros organismos (simbiosis) para asegurar su supervivencia, por lo tanto, se puede decir que todos los organismos vivos en este planeta están obligados a interactuar con otros organismos. Las interacciones entre los organismos reciben diversos nombres según las actividades que realicen sus participantes. Algunas de estas interacciones son: i) mutualismo, que se refiere a la interacción entre organismos de diferentes especies donde los participantes son beneficiados con las actividades de los demás; ii) parasitismo, es la necesidad de un hospedero al menos en una etapa de su ciclo de vida, en esta interacción el parásito no mata al hospedero y puede generar protección contra otros parásitos; iii) competencia, que puede ser directa o indirecta, directa si un organismo inhibe la colonización o crecimiento de otra especie o indirecta si dos organismos utilizan la misma fuente de energía y esta escasea; iv) comensalismo, es la interacción entre microorganismos donde uno de los participantes se beneficia de alguna actividad que realicen los demás pero no causa ningún daño; v) cometabolismo, que se basa en la alimentación refiriéndose a que uno de los microorganismos modifica o metaboliza compuestos generando sustratos que otros microorganismos pueden ocupar (Brooks et al. 2008). El mutualismo, el comensalismo y el cometabolismo son las principales interacciones biológicas que nos interesan para este proyecto.

El consorcio microbiano se puede definir como un grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como una comunidad, para la degradación de distintos compuestos (Jáuregui-Rincón, 2006). Con esta definición se puede deducir que un consorcio microbiano se integra de distintas interacciones biológicas a la vez.

Los consorcios como productores de compuestos útiles para los humanos han sido muy estudiados. Sin embargo, en algunos casos se ha subestimado la importancia de las interacciones entre los microorganismos que lo conforman, solo importando los productos, probablemente porque estos consorcios generalmente

están conformados por más de dos organismos y esto hace difícil establecer las interacciones directas entre estos; por lo que aun existen muchas interrogantes por contestar.

Por ejemplo, existen consorcios naturales entre bacterias acetogénicas y arqueas metanogénicas, en los cuales la arquea metanogénica tiene dos papeles fundamentales: 1) el consumo de hidrógeno durante la metanogénesis, generando un ambiente termodinámicamente favorable para las especies fermentativas y acetogénicas que utilizan protones como aceptor de electrones, esto permite a los microorganismos fermentadores conservar más energía para producir un producto más oxidado, acetato, que es también sustrato para la metanogénesis y 2) la segunda función de los metanogénicos es la utilización de acetato, que representa el 70% de la producción biológica global de metano (Maeder, 2006).

Para fines de este proyecto, los consorcios que más nos interesan son aquellos conformados por arqueas metanogénicas y protistas fotosintéticos. Estos consorcios microbianos no han sido del todo descritos en la literatura, pero existe información que confirma que el consorcio entre estas especies es posible (Ellis, 2012), ya que se ha confirmado la presencia de arqueas metanogénicas, específicamente de *Methanosarcina acetivorans*, en los sedimentos anaerobios del LCWLS, Logan City Wastewater Lagoon System en Utah, EU. Este microorganismo fue identificado debido al cultivo de los sedimentos en digestores anaerobios alimentados, donde se ocupó como sustrato del medio de cultivo algas que fueron cosechadas del efluente de las aguas residuales de la laguna. Las algas presentes en este cuerpo de agua han sido documentadas y publicadas por NSCEP (National Service Center for Environmental Publications). En esta lista se encuentran diversos organismos fotosintéticos tales como: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas* y principalmente *Euglena*. Con esta información podemos sentar la base de nuestro proyecto sabiendo que los microorganismos que utilizamos para la formación del consorcio pueden coexistir en el mismo hábitat y posiblemente interactuar de forma natural.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La producción de metano de manera biotecnológica ha impulsado nuevos proyectos en los cuales se pretende utilizar residuos orgánicos como sustrato para alimentar a consorcios microbianos. Por lo tanto, en este proyecto se propone el estudio de un consorcio bajo condiciones específicas para adaptar a dos microorganismos a condiciones similares, en las cuales previamente se ha reportado que son capaces de sobrevivir tanto el protista como la arquea para la obtención de metano, que posteriormente pueda ser ocupado para el tratamiento de residuos orgánicos. (Young Park, 2009; Castro-Guerrero, 2005; González-Moreno, 1997; Liu, 2007; Moran, 2004).

#### 5. HIPÓTESIS

Si *E. gracilis* y *M. acetivorans* son adaptadas a condiciones similares de microaerofilia y salinidad en un medio modificado, entonces se generará un consorcio viable donde la arquea producirá metano a partir de la excreción de acetato por parte del protista.

#### 6. OBJETIVOS

- ✧ Cultivar a *E. gracilis* en condiciones de microaerofilia y salinidad.
- ✧ Determinación de acetato extracelular en cultivos modificados de *E. gracilis*.
- ✧ Elaboración de un medio modificado en el cual *Methanosarcina acetivorans* pueda sobrevivir y duplicarse tanto de manera individual como en conjunto con *Euglena gracilis*.
- ✧ Cultivar a *M. acetivorans* en presencia de bajas concentraciones de oxígeno en el medio modificado.

- ✧ Generar un consorcio estable entre el protista de vida libre *Euglena gracilis* y la arquea metanogénica *Methanosarcina acetivorans*.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1. *Euglena gracilis*

#### 7.1.1. MEDIO DE CULTIVO

*Euglena* es un microorganismo resistente y muy flexible en cuanto a los métodos de cultivo, por lo que la elección de una técnica de cultivo dependerá de la finalidad deseada. En este caso, el medio de cultivo utilizado es una modificación del medio Hutner para *Euglena* en el cual generalmente se cultiva (Jasso-Chávez et al, 2010), su composición se muestra a continuación.

Medio de cultivo para *Euglena*:

Se ocupó agua de alta pureza (milli Q, Millipore, USA) (1Litro) y se agregaron los siguientes compuestos: como fuente de carbono se adicionaron 5 mM Glutamato, 10 mM Malato y 75 mM Glucosa; 1.36 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.51 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.01 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.94 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.47 mM MnSO<sub>4</sub>, 0.08 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.007 mM CoCl<sub>2</sub>, 0.03 mM CuSO<sub>4</sub>, 0.1 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (compuestos que contienen minerales traza esenciales); 1.65 mM Cisteína, 0.2 mM Na<sub>2</sub>S y 0.001% Resazurina (los primeros dos son agentes reductores que reaccionan con el oxígeno presente y generan un ambiente reductor, mientras que el último es un indicador de estado óxido-reducción) (Lira-Silva et al., 2012). También se añadió una mezcla de vitaminas que contiene 0.03 mM Tiamina, 0.2 µg/mL Cianocobalamina y 0.2 mM FeCl<sub>3</sub>. El medio se ajustó con una solución concentrada de NaOH hasta un pH de 7.

Medios modificados:

En las condiciones de cultivo para el consorcio se requiere tener en cuenta las necesidades nutrimentales de los dos microorganismos que lo conformaran, por lo que se hicieron modificaciones al medio de *Euglena* para poder co-cultivar a los microorganismos sin que el medio fuera un factor limitante; en estos medios de cultivo se llevó a cabo la adaptación de los microorganismos y el consorcio. De aquí en adelante serán llamados medios modificados.

En la composición de estos medios también se utilizó agua ultrapura milli Q como base (1L): 5 mM Glutamato, 10 mM Malato, 75 mM Glucosa, 1.36 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.51 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21.22 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.94 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.4 mM o 18.69 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.65 Cisteína, 0.001% Resazurina, 0.025% de solución de Na<sub>2</sub>S, 1 mL de la mezcla de vitaminas necesarias para el crecimiento de *Euglena*, 1 mL de solución de vitaminas utilizados en el medio para *Methanosarcinas* y 10 mL de solución mineral necesarias para *Methanosarcinas*.

La diferencia entre los medios modificados y el medio *Euglena* fue que la concentración de Magnesio aumento 10 veces y la concentración de Amonio (3.4 y 18.7 mM) aumentaron 2 y 11 veces respectivamente, ya que son muy importantes para conservar la viabilidad de *M. acetivorans* y para mantener la fuente de nitrógeno. La solución de vitaminas para *Methanosarcina* contiene: 41 µM Biotina (B8), 22.7 µM Ácido Fólico (B9), 243 µM Piridoxina·HCl (B6), 66 µM Riboflavina (B2), 74 µM Tiamina (B1), 203 µM Ácido Nicotínico (B3), 114 µM Ácido Pantoténico (B5), 3.7 µM Vit. B12, 182 µM Ácido p-aminobenzóico (PABA) y 121 µM Ácido Lipóico. La composición de la solución de minerales es: 7.9 mM Ácido Nitrilotriacético, 12.2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.7 mM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 18.4 mM NaCl, 360 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 356 µM CoSO<sub>4</sub> ó 770 µM CoCl<sub>2</sub>, 900 µM CaCl<sub>2</sub>, 587 µM ZnCl<sub>2</sub>, 40 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 21 µM AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 162 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 121 µM NaMoO<sub>4</sub> y 101µM NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Wolin, 1963).

Los medios de cultivo se prepararon en condiciones anaerobias utilizando una cámara de anaerobiosis marca COY (Michigan, USA) que contenía en 80 % N<sub>2</sub>, 15 % CO<sub>2</sub> y 5 % H<sub>2</sub> (V/V) (Figura 7). Se burbujearon con el aire contenido en la cámara por al menos dos horas en agitación constante, después de este tiempo se agregó la cisteína media hora antes de embasar y el sulfuro de sodio antes de envasar, se vertieron 15 mL o 50 mL de medio de cultivo en tubos de 25 mL o frascos de 100 mL respectivamente, éstos se cerraron herméticamente con tapón de hule y arillos metálicos, después fueron esterilizados en Autoclave a 120 libras/in<sup>2</sup> de presión y 125°C por 45 min.



Figura 7. Cámara de anaerobiosis marca COY (Michigan, USA). Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

### 7.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Cepa utilizada: *Euglena gracilis* fotosintética cepa tipo Z del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

Los cultivos fueron incubados en una cámara de fotosíntesis con ciclos de 12 h de luz blanca (60-70  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 12 h oscuridad a  $25 \pm 2$  °C. La

concentración de células al inicio en todos los cultivos (*E. gracilis* y consorcio) fue de  $0.4 \times 10^6$  células/ mL.

#### 7.1.2.1. CONCENTRACION DE OXIGENO

La cepa de *Euglena gracilis* utilizada en este proyecto fue adaptada a condiciones de microaerofilia constante durante aproximadamente un año. El único efecto que presentó por la ausencia de oxígeno fue un ligero aumento en la concentración celular de  $5.3 \times 10^6$  cél/ mL en condiciones aerobias a  $8 \times 10^6$  cél/ mL (Mendoza-Cózatl et al, 2002 y Santiago, 2012). Este microorganismo es fotosintético por lo que aunque sea inoculado en un medio de cultivo hecho anaeróbicamente, éste se modifica debido al oxígeno producido y consumido durante la fase de crecimiento. En experimentos anteriores realizados por el equipo de trabajo del laboratorio se determinó que la concentración de oxígeno presente a lo largo del cultivo como producto de la fotosíntesis presenta fluctuaciones que no exceden el 2 % (V/V) en la fase del espacio gaseoso (headspace) y  $5 \pm 3 \mu\text{M O}_2$  disuelto en el medio de cultivo (Santiago, 2012).

Para evaluar esta condición, se inoculó a *E. gracilis* cultivada por al menos 12 meses en microaerofilia (cepa adaptada a microaerofilia) en medio *Euglena* (Hutner modificado) aerobio (misma composición que el medio anaerobio) y se determinó el crecimiento celular a través del tiempo como se describe en la sección de los parámetros.

#### 7.1.2.2. CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE SODIO (NaCl)

El estrés salino provocado por la presencia de NaCl en el medio de cultivo afecta el proceso de fotosíntesis, principalmente a las plantas porque modifica el transporte de electrones fotosintético, la conductancia de los estromas y la asimilación de  $\text{CO}_2$  (González-Moreno y Moreno-Sánchez 1997).

Existen especies del género *Euglena* que son capaces de tolerar el cultivo en agua salada durante diversos periodos de tiempo (Lackey, 1968). El efecto salino reportado cuando *E. gracilis* es cultivada en presencia de NaCl (0-0.2 M) tiene como conclusión el aumento de la respiración, la síntesis de clorofila y la concentración intracelular de potasio y sodio, mientras que disminuye la fotosíntesis y la concentración intracelular de calcio y magnesio (González-Moreno y Moreno-Sánchez, 1997).

En este proyecto fue necesario adaptar a *E. gracilis* a concentraciones de sal en las que *M. acetivorans* es capaz de sobrevivir (0.05 a 1 M NaCl), las concentraciones que se utilizaron fueron las siguientes 0, 0.1, 0.2 y 0.3 M, debido a que existen reportes que indican que en estas condiciones este protista es capaz de crecer y duplicarse, a pesar del estrés salino y sus efectos, aunque a menor velocidad (González-Moreno y Moreno-Sánchez, 1997).

### **7.1.3. PARÁMETROS**

#### **7.1.3.1. CRECIMIENTO CELULAR Y VIABILIDAD**

La cuenta celular es un método que se utiliza ampliamente en la microbiología para cuantificar la concentración de células presentes en un cultivo, esta técnica puede ser complementada con colorantes vitales para hacer distinciones visibles entre células vivas y muertas y de este modo complementar los resultados obtenidos.

La cuenta de células se utilizó para evaluar la duplicación celular de *E. gracilis* a través del tiempo. Se tomaron alícuotas del cultivo (1 mL) en un área aséptica de cada condición (0, 0.1, 0.2 y 0.3M NaCl), y se diluyeron (1:10, 1:20 o 1:50 según la densidad esperada) utilizando HCl conc. (1%) para inmovilizar a las células. La cuenta se realizó en una Cámara de Neubauer a 10x.

Para evaluar la viabilidad de las células a través del tiempo se incubaron 50  $\mu\text{L}$  de las alícuotas tomadas de cada uno de los cultivos por 10 min a temperatura ambiente con una solución de azul tripano al 1% (p/V) y se realizó el conteo al microscopio en la cámara de Neubauer. El azul tripano es un colorante vital, lo que permite realizar una evaluación directa de la biomasa obtenida al diferenciar células muertas de las vivas, ya que éste penetra en las células cuyas membranas están dañadas tiéndolas de un color azul o morado.



Figura 8. Microscopio óptico (NIKON) y Cámara de Neubauer (BRAND). Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

#### 7.1.3.2. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

La concentración de clorofila en *E. gracilis* es uno de los parámetros comúnmente evaluados, ya que sus valores tienden a modificarse como reflejo de factores externos; por ejemplo, se ha reportado que la ausencia de luz disminuye la síntesis de clorofila (Buetow, 1968), la adición de concentraciones altas de etanol a un cultivo inhibe su síntesis (Garlaschi, 1974) y disminuye en presencia de metales como el cromo (Cervantes, 2011), entre otros efectos.

El contenido de clorofila fue determinado espectrofotométricamente (Shimadzu UV-1800) utilizando la técnica de Arnon (1948). A partir de muestras

(1 mL) de cultivos obtenidas en un área aséptica, que se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min, se conservó el botón o precipitado y se resuspendió en 2.5 mL de una solución de acetona al 80%, se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 min y el sobrenadante se leyó a 645 y 662 nm (donde la clorofila “a” presentó el mayor pico de absorbancia a 662 nm y la clorofila “b” en 645 nm de longitud de onda).

Para el cálculo de la cantidad total de clorofila se ocupó la ecuación de Marker (Arnon, 1948):

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

Esta ecuación permite convertir los valores de absorbancia en concentración utilizando el coeficiente de extinción molar (Santiago, 2012).

Para normalizar el contenido de clorofila, se utilizó la concentración de células de la muestra tomada y se normalizó con respecto a  $10 \times 10^6$  cél/mL.

### 7.1.3.3. CONCENTRACION DE ACETATO

Debido a su capacidad para utilizar una gran diversidad de sustratos como fuente de carbono y con esto excretar diferentes metabolitos como desecho, este microorganismo podría ser utilizado para alimentar a otros microorganismos, ya que los metabolitos excretados pueden ser ocupados por otros microorganismos como fuente de carbono. Por este motivo se utilizó a *E. gracilis* para la realizar el consorcio debido a que se ha reportado que *E. gracilis* tiene la capacidad de excretar acetato al medio de cultivo como al oxidar etanol agregado (Garlaschi, 1974) o malato cuando se expone a Cr (III) (Lira-Silva et al., 2011).

Con base en el metabolismo reportado de *E. gracilis*, se proponen las vías por las cuales se puede generar el acetato excretado a partir de las fuentes de carbono que se utilizaron (Glutamato, Malato y Glucosa), ver Figura 9.

La cuantificación de acetato excretado al medio de cultivo, se determinó de manera enzimática por medio de reacciones acopladas a un sistema que genera  $\text{NAD}^+$  a partir de  $\text{NADH}$ , la desaparición de este último se midió a una longitud de onda de 340nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent modelo 91103A) con lámparas de tungsteno y deuterio (Figura 10).

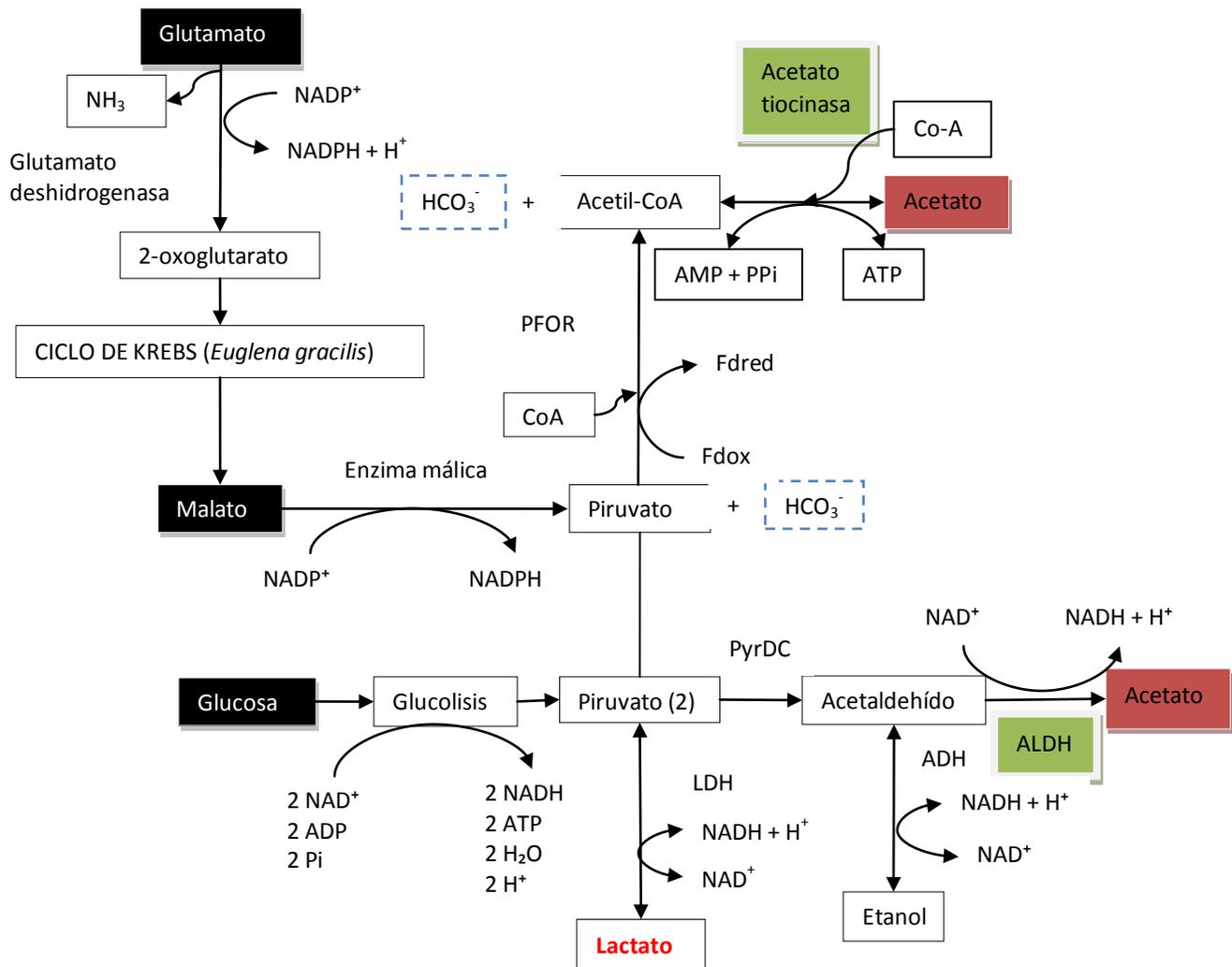


Figura 9. Esquema del metabolismo propuesto en *E. gracilis* para la excreción de acetato. Abreviaturas:  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}$ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada y reducida respectivamente; Co-A: coenzima A; AMP, ADP y ATP: adenosin mono, di y trifosfato respectivamente;  $\text{PPi}$ : pirofosfato inorgánico;  $\text{Pi}$ : fosfato inorgánico;  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$ : nicotinamida adenina dinucleótido oxidado y reducido respectivamente; Fd red y ox: ferredoxina reducido y oxidado; PFOR:

piruvato ferredoxin oxidoreductasa; LDH: lactato deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; ALDH: aldehído deshidrogenasa y PyrDC: piruvato descarboxilasa.

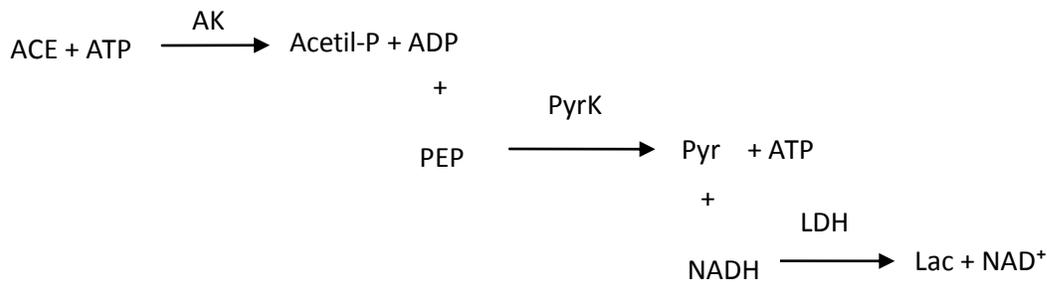


Figura 10. Esquema enzimático para la cuantificación de acetato en el medio de cultivo. Abreviaturas: AK, acetato cinasa; ADP y ATP, adenosin di y trifosfato; Acetil-P, acetil fosfato, PEP, fosfoenol piruvato; PyrK, piruvato cinasa; Pyr, piruvato, NAD<sup>+</sup> y NADH, nicotinamida adenina dinucleótido oxidado y reducido; LDH, lactato deshidrogenasa; Lac, lactato.

Estas reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: Buffer 50 mM Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y pH de 7.5 a una temperatura de 37°C, los siguientes compuestos fueron agregados en este orden: 2 mM PEP, 5 mM ATP, 0.95 mM NADH, 50 µL muestra [sobrenadante de cultivo filtrado (filtros Millex-HV con poro de 0.45 µm), 11 UI/µL piruvato cinasa, 0.0125 µg/µL lactato deshidrogenasa y 0.2 UI/µL acetato cinasa.

NOTA: Después de la adición de cada enzima se esperó un tiempo a que se estabilizara el trazo (asintótizar) (Figura 11).

La concentración de NADH se calculó utilizando la Ley de Lambert-Beer que dice que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra, por lo tanto:  $A = \epsilon bC$ , donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del compuesto que absorbe la luz, en este caso el coeficiente de extinción molar para el NADH es 6.22 mM<sup>-1</sup>/cm y  $b$  es el campo óptico que se expresa en cm (1cm) (Burriel, 2008).

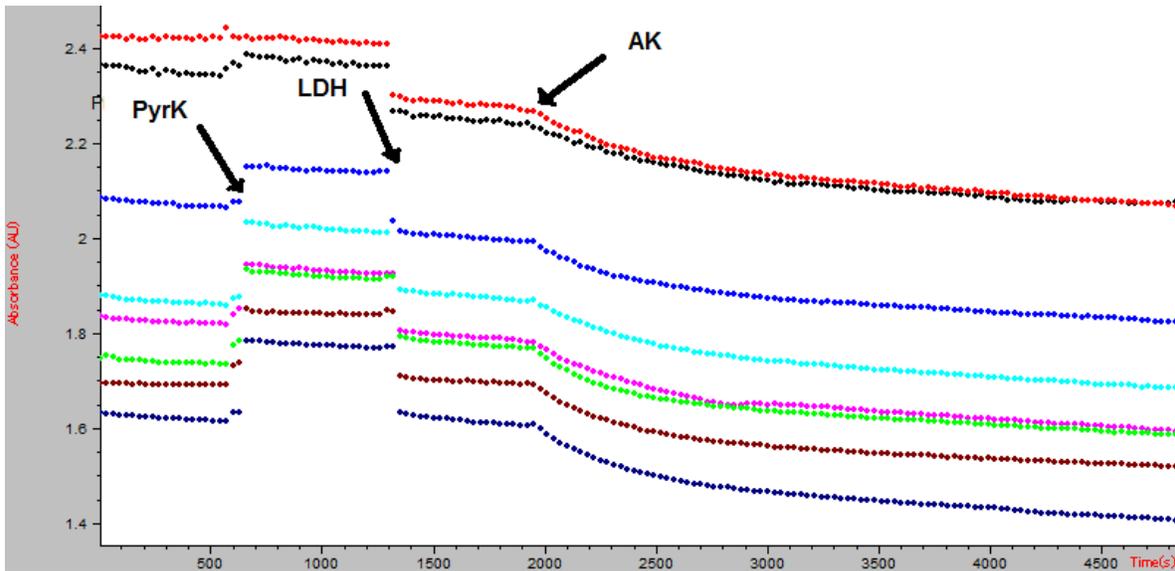


Figura 11. Determinación de la desaparición de NADH para la cuantificación de acetato en espectro de diodos a 340nm. Piruvato cinasa, PyrK; Lactato Deshidrogenasa, LDH; Acetato Kinasa, AK.

## 7.2. *Methanosarcina acetivorans*

### 7.2.1. MEDIO DE CULTIVO

Medio HS:

El medio de cultivo para *M. acetivorans* es un medio con una alta concentración de sal (HS-medium), su composición (por cada 1 litro) y su preparación se indica enseguida: Se utilizó agua milli Q: Mezcla A.- 0.43 M NaCl, 45.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 24.1 mM KCl, Resazurina 0.001% (p/V) (indicador redox). Mezcla B.- 110 mM MgCl, 1.36 mM CaCl<sub>2</sub>; 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.65 mM cisteína. Como fuente de carbono se utilizó 100 mM acetato de sodio trihidratado. Se añadió 2 mL de una solución de vitaminas (5X) que contiene: 41 µM Biotina (B1), 22.7 µM Ácido Fólico (B9), 243 µM Piridoxina·HCl (B6), 66.4 µM Riboflavina (B2), 74 µM Tiamina (B1), 203 µM Ácido Nicotínico (B3), 114 µM Ácido Pantoténico (B5), 3.7 µ M Vit. B12, 182 µM Ácido p-aminobenzóico (PABA) y 121 µM Ácido Lipóico. También se le agregó

10 mL de una solución de minerales (10X) que contiene: 7.84 mM Ácido Nítrilotriacético, 12.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.7 mM  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 18.35 mM NaCl, 359  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 356  $\mu\text{M}$   $\text{CoSO}_4$  ó 770  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , 901  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 587  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 40  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 21  $\mu\text{M}$   $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ , 162  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 121  $\mu\text{M}$   $\text{NaMoO}_4$  y 101  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Por último se agregó 5 mL (5 mM) de una solución de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.1 M y 0.025 % (p/V) de una solución de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ .

Del mismo modo que *E. gracilis*, *M. acetivorans* también fue cultivada en los medios modificados, pero para su cultivo individual se agregó 50 o 100 mM de acetato de sodio como fuente de carbono y 0.2 M de NaCl. Como control también se cultivó a *M. acetivorans* en el medio *Euglena* con una concentración de 50 mM de acetato de sodio y 0.2M de NaCl, para evaluar si este medio afectaba su viabilidad.

Los medios de cultivo se prepararon en condiciones anaerobias utilizando una cámara de anaerobiosis marca COY (Michigan, USA) como se mencionó anteriormente (Figura 7). Los medios se burbujearon con el aire contenido en la cámara de anaerobiosis por al menos dos horas con agitación constante, después de este tiempo se agregó la cisteína y la solución de fosfatos aproximadamente media hora antes de envasar y finalmente se añadió el sulfuro de sodio justo antes de envasar, se vertieron 15 mL o 50mL del medio de cultivo en tubos de 25 mL o frascos de 100 mL respectivamente, se cerraron herméticamente con tapón de hule y arillos metálico y fueron esterilizados en Autoclave a 120 lb/in<sup>2</sup> de presión y 125°C por 45min.

### 7.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Cepa utilizada: *Methanosarcina acetivorans*, cepa C2A y C2A adaptada a aire (AA) del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

Los cultivos fueron incubados a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  en una cámara oscura. El inóculo utilizado en todos los cultivos fue de 3 mL o 10 mL de cultivo para los tubos o los frascos respectivamente, que equivale de 0.5 – 1.5 mg de proteína/cultivo, de un cultivo anterior de no más de 20 días.

#### 7.2.2.1. CONCENTRACION DE SUSTRATO

Con base en nuestra hipótesis de que *E. gracilis* excretará el acetato necesario para que *M. acetivorans* lo utilice como fuente de carbono para obtener energía, es importante saber que la concentración de acetato presente en el medio de cultivo puede ser menor a 100 mM que es la concentración óptima para su cultivo. Sin embargo, se ha reportado que *M. acetivorans* puede crecer a concentraciones bajas de sustrato, de 0 a 20 mM de acetato (Goevert, 2009). Por lo tanto *M. acetivorans* puede crecer en diferentes concentraciones de sustrato.

#### 7.2.2.2. CONCENTRACION DE OXIGENO

Los cultivos anaerobios de *M. acetivorans* fueron modificados, es decir, se les agregó 2 mL de aire estéril (0.4 %  $\text{O}_2$ , 13.21  $\mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$ ) para estimular la generación de cultivos microaerobios con los cuales se preadaptó a las células para tolerar bajas concentraciones de oxígeno que probablemente verán al ser cultivadas junto a *E. gracilis*. Se determinaron algunos parámetros microbiológicos para conocer su tolerancia a este estrés (crecimiento celular: densidad óptica, producción de metano, concentración de proteína y consumo de fuente de carbono). Para continuar con la adaptación a oxígeno se estableció un protocolo en el cual se le agregó la cantidad de oxígeno anterior (2 mL aire) en los días 0, 6 y 10 del cultivo.

### 7.2.2.3. CONCENTRACION DE NaCl

La concentración de NaCl a la cual es cultivada *M. acetivorans* es importante que sea regulada, ya que el  $\text{Na}^{2+}$  es un catión indispensable para realizar la metanogénesis (principal vía de síntesis de ATP) y para su crecimiento. Las concentraciones de NaCl a las que se adaptó a *E. gracilis* fueron 0, 0.1, 0.2 y 0.3 M, porque en este intervalo de concentraciones se encuentra el rango en el cual *M. acetivorans* tiene su mayor crecimiento (0.1 a 0.4 M), incluso se ha reportado que obtiene mayor biomasa cuando las células se encuentran de forma individual (0.2 M NaCl) (Sowers, 1993); por lo que la viabilidad de *M. acetivorans* no va a afectarse en los diferentes medios de cultivo por falta de este compuesto.

### 7.2.2.4. VARIACION DE TEMPERATURA

Como se mencionó anteriormente, la temperatura óptima de crecimiento para *M. acetivorans* está entre el rango de 35 a 40°C, pero existen reportes donde se demuestra que es capaz de crecer a temperaturas inferiores (15 a 30°C) y que se obtiene mejor biomasa cuando las células se encuentran de forma individual (0.2M NaCl) (Sowers, 1993).

Esta condición no se incluyó en el protocolo de experimentos pero es importante mencionarla ya que el consorcio fue incubado a 25°C, casi diez grados por debajo de la temperatura a la que normalmente es cultivada *M. acetivorans*. El consorcio fue cultivado a esta temperatura porque *E. gracilis* no es capaz de duplicarse ni sobrevivir a temperaturas de 37°C.

## 7.2.3. PARAMETROS

### 7.2.3.1 CRECIMIENTO CELULAR

#### 7.2.3.1.1. DENSIDAD OPTICA

Esta técnica se basa en la dispersión de la luz que se hace pasar por muestra y es desviada por las células en la suspensión a cierta longitud de onda, teniendo cierta relación con la concentración celular presente.

Las muestras se tomaron en un área aséptica y fueron medidas inmediatamente después para evitar que la concentración de oxígeno ambiental pudiera dañar las células y por lo tanto causar un error en el valor obtenido. La longitud de onda a la que se midieron las muestras fue a 600nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 para esta técnica.

#### 7.2.3.1.2. CONCENTRACION DE PROTEINA

La concentración de proteína es utilizada como técnica para establecer el crecimiento celular, en este caso, de *M. acetivorans*. La determinación de este parámetro puede ser medido por diferentes métodos, en este proyecto se utilizó el método de Lowry porque permite detectar cantidades pequeñas de proteína (hasta 10 µg de proteína). Esta técnica se basa en dos reacciones colorimétricas, la primera ocurre con el  $\text{Cu}^{2+}$  y el nitrógeno presente en la proteína, lo cual provoca que la proteína se desdoble, exponiendo aminoácidos (principalmente tirosina, que contiene grupos fenólicos) y que a su vez reaccionan con el ácido fosfomolibdotungsténico del reactivo de Folin-Ciocalteu, formando un compuesto de color azul, el cual se midió a 660 nm (la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína en la muestra) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Esta técnica, debido a la mezcla de los reactivos A y B en el momento de la medición genera algunas variables por lo que se realiza una curva de calibración con albumina sérica bovina (stock 1mg/mL BSA, 0, 20, 40, 60 y 80 µg) en cada medición, también para establecer la relación entre cantidad de proteína (µg) con los valores de absorbancia.

Para cuantificar la proteína de cada uno de los cultivos, se tomó 1 mL de muestra en un área aséptica y se precipitó la proteína de 900 µL de muestra con 100 µL de ácido tricloroacético 6.1 M y se incubó a 4°C por 24 h. Después se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. Se añadió 1mL de la mezcla de reacción fresca (por cada 50 mL de reactivo A (0.4% NaOH, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.16 % Tartrato de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y 1% SDS) 1mL de reactivo B (4 % Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)) y se dejó incubar por 5 min y finalmente se añadió 100µL de una solución de Folin- Ciocalteu 1:1 (con agua) y se dejó incubar por 30 min en oscuridad. **Nota:** Para la medición de este parámetro no se midieron muestras después de 60 min iniciada la reacción con Folin-Ciocalteu, ya que el color es estable como máximo 1h.

#### 7.2.3.1.3. CONSUMO DE ACETATO

El consumo de la fuente de carbono del medio de cultivo también es utilizado para determinar el crecimiento celular. En este caso la fuente de carbono analizada es el acetato, por lo que se cuantificó el acetato remanente en los cultivos de *M. acetivorans* con un sistema enzimático acoplado que se describió previamente (Figura 10).

Las muestras para cuantificar el acetato fueron tomadas de los cultivos y centrifugadas a 14000 rpm por 5 min para separar el medio de cultivo de las células, después se cuantificó el acetato.

#### 7.2.3.1.4. PRODUCCIÓN DE METANO

La cuantificación del metano producido a lo largo de la curva de crecimiento se utiliza para estimar el crecimiento celular, con base en que el aumento en la cantidad de metano generado indica un aumento en la cantidad de células en el cultivo. Este parámetro es el que se utiliza con mayor frecuencia para determinar la cinética de crecimiento de los metanogénicos, en este caso de *M. acetivorans*.

La cantidad de metano se cuantificó utilizando un Cromatógrafo de Gases (Shimadzu GV2012), que cuenta con una columna capilar HP-PLOT/U de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 10  $\mu\text{m}$  de capa (Agilent, USA), aparte de dos detectores: Ionización de Flama (FID) y Conductividad Térmica (TCD). El método empleado tiene las siguientes condiciones: SPLIT temperatura 150°C, presión 75 Pa., flujo total 40.2 mL/min, flujo de columna 1.43 mL/min, flujo de purga 3 mL/min y una relación aire-muestra de 25:1; la temperatura de la columna fue de 100°C, del FID fue de 190°C y del TCD fue de 190°C. El tiempo de retención del metano indicado por el fabricante es de 2.56 min. La fase móvil es una mezcla de aire, hidrogeno y helio.

A los cultivos de *M. acetivorans* se les retiró la sobrepresión del gas con una jeringa de vidrio (60 mL o 20 mL), después con ayuda de una aguja guía se introdujo una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{L}$  y se tomaron 5  $\mu\text{L}$  del espacio vacío del matraz (Headspace) y se inyectaron en el cromatógrafo.

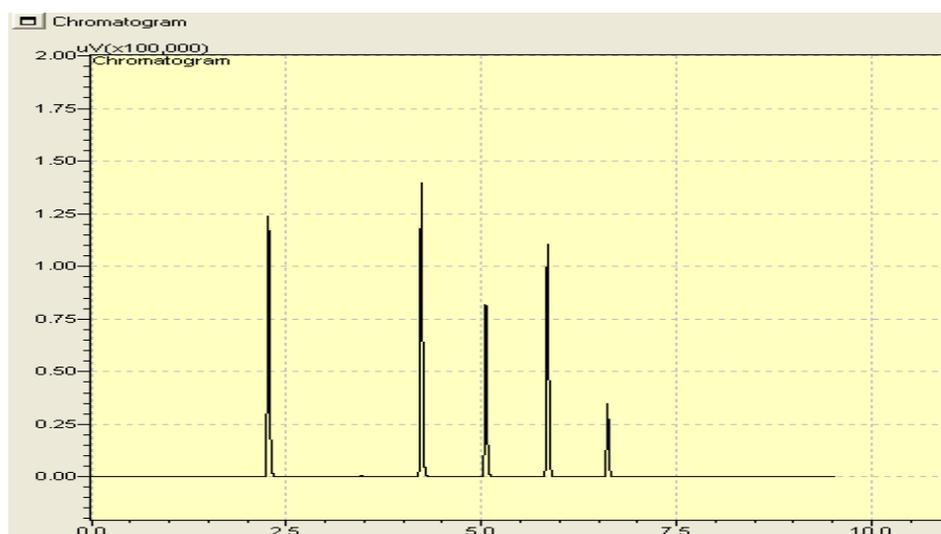


Figura 12. Cromatograma de metano. Detección del metano en cultivos de *M. acetivorans* cultivada en medio HS (acetato 100 mM y 0.4 M NaCl) en un Cromatógrafo de Gases (Shimadzu GV2012), con el detector FID. Todos los picos

corresponden al metano contenido en los cultivos (2 cultivos control y 3 cultivos preadaptados a aire)

La cantidad de metano en cada muestra se calculó a partir de una curva patrón, esto quiere decir que a varios frascos vacíos se les agregó una cantidad conocida de metano + N<sub>2</sub> y se analizaron en el cromatógrafo. A partir de estos valores se construyó una gráfica de % de metano contra área bajo la curva, con estos datos y a partir de una regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta que se utilizó para interpolar los datos de las muestras y así obtener la cantidad de metano en cada cultivo. Debido a que en los consorcios la producción de metano fue menor que en los cultivos HS, fue necesario realizar dos curvas de metano, una con valores bajos (0 – 1%) y otra con valores altos de metano (0 – 50%) (Figuras 13 y 14).

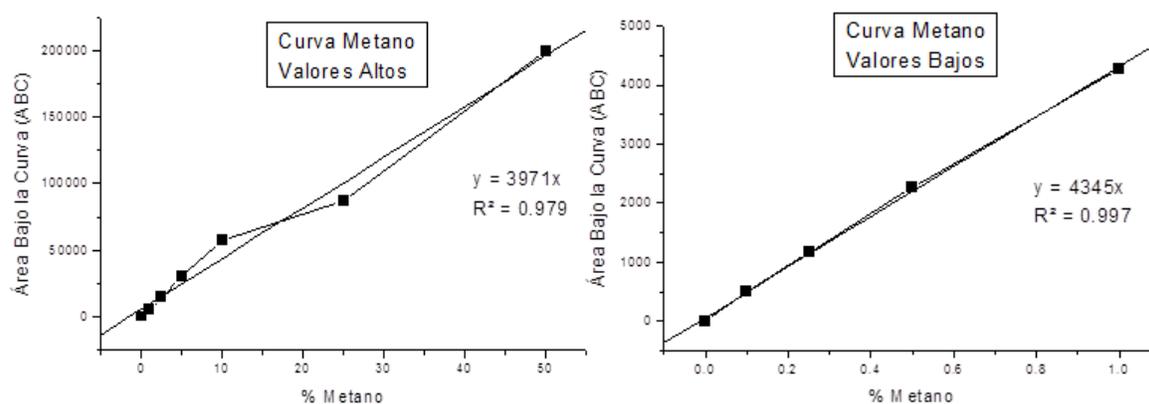


Figura 13. Curvas patrón de metano. Analizada en el Cromatógrafo de gases con el método de CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>.

$$\begin{aligned} \frac{ABC}{4345 \text{ o } 3971} &= mL \text{ CH}_4 \times \frac{Vol. \text{inyectado}}{100 \text{ mL}} \times \frac{Vol. \text{matraz}}{Vol. \text{inyectado}} \times \frac{1L}{1000mL} \times \frac{1}{31.8 L/mol} \\ &\times \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{Vol. \text{matraz} + Vol. \text{sacado}}{Vol. \text{matraz}} \\ &= \mu\text{mol CH}_4 \text{ total} \end{aligned}$$

Figura 14. Ecuación utilizada para calcular la concentración de metano en el espacio vacío de cada cultivo. El ABC fue obtenido mediante el análisis en el cromatógrafo de gases. Divisor 4345 se ocupa para valores pequeños de metano, y el 3971 para valores altos según las regresiones lineales de las curvas patrón.

### 7.3. Consorcio

#### 7.3.1. MEDIO DE CULTIVO

Los consorcios fueron cultivados en el medio modificado, su elaboración y composición se encuentra en las condiciones de cultivo de *E. gracilis*.

En la Tabla 1 se muestran las diferencias entre los medios óptimos de cultivo de los microorganismos y los medios modificados. Se utilizaron dos concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  diferentes ya que no se encuentra reportado el efecto que pueda tener sobre *E. gracilis* mientras que para *M. acetivorans* es uno de los compuestos esenciales para su crecimiento, por lo que al evaluar dos concentraciones se pudo observar el efecto tanto para el protista como para la arquea y en el consorcio.

Tabla 1 . Comparación de la composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio <i>Euglena</i>	Medio HS Methanosarcina	Modificado
Glutamato 5 mM Malato 10 mM Glucosa 75 mM CaCl <sub>2</sub> 1.36 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.51 mM MgSO <sub>4</sub> 1.01 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.94 mM Solución A -ZnSO <sub>4</sub> 0.2 mM -MnSO <sub>4</sub> 0.5 mM -Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0.08 mM -CoCl <sub>2</sub> 0.007 mM Solución B -CuSO <sub>4</sub> 0.03 mM -H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0.1 mM Vitaminas 2mL (euglenas) Cisteína 1.65 mM Na <sub>2</sub> S 0.2 mM	NaCl 434.6 mM NaHCO <sub>3</sub> 45.2 mM KCl 24 mM MgCl <sub>2</sub> 110 mM CaCl <sub>2</sub> 1.36 mM NH <sub>4</sub> Cl 18.7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Acetato 100 mM Vitaminas 2mL (Methanosarcinas) Minerales 10mL (Methanosarcinas) Cisteína 1.6 mM Na <sub>2</sub> S 1 mM	Glutamato 5 mM Malato 10 mM Glucosa 75 mM CaCl <sub>2</sub> 1.36 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.51 mM <u>MgCl<sub>2</sub> 21.22 mM</u> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.94 mM <u>NH<sub>4</sub>Cl 3.4 o 18.7 mM</u> Vitaminas 1 mL (euglenas) Vitaminas 1 mL (Methanosarcinas) Minerales 10 mL (Methanosarcina) Cisteína 1.6 mM Na <sub>2</sub> S 1 mM

### 7.3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Para el cultivo del consorcio se mantuvieron las concentraciones de NaCl de las que provenían los inóculos de *E. gracilis* (0, 0.1, 0.2 y 0.3 M NaCl).

Los cultivos fueron incubados en una cámara con ciclos de 12 h luz blanca (60-70  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 12 h oscuridad a 25 $\pm$ 1°C. El inóculo de *E. gracilis* fue de 0.4 x 10<sup>6</sup> células/mL, mientras que para *M. acetivorans* fueron de 3 o 10 mL del cultivo de procedencia (aproximadamente de 0.5- 1.5 mg de proteína por cultivo) en tubos o frascos respectivamente.

En cuanto a la siembra de los microorganismos se realizaron dos métodos, el primero consistió en sembrar a los dos microorganismos al mismo tiempo (al inicio del cultivo) y el segundo fue sembrar primero a *E. gracilis* y

aproximadamente 7 días después sembrar a *M. acetivorans*, esto se realizó para establecer el protocolo de siembra y observar en que condición se obtuvieron mejores resultados. Con los consorcios realizados se hizo una resiembra para saber si estos seguían siendo productivos y por cuánto tiempo. La resiembra se hizo cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria, basándonos en la cinética de crecimiento de *E. gracilis* en los medios de cultivo en la que fue crecida de forma individual (Figura 17), por lo que para los dos consorcios el día que se tomaron células para la resiembra fue el 25, con respecto a la siembra de *E. gracilis* (cultivo donde los dos microorganismos fueron inoculados al mismo tiempo el día en que se extrajo el inóculo para la resiembra fue el día 25, mientras que para el consorcio donde los microorganismos fueron sembrados a diferentes tiempos fue el día 17). Para la resiembra se tomó un inóculo de  $0.4 \times 10^6$  células/mL de *E. gracilis* del consorcio y se sembraron en tubos con 15 mL de medio de cultivo nuevo, la concentración celular de *M. acetivorans* no se determinó ya que los métodos con los que determinamos la cantidad de células en un inóculo de la arquea son modificados por la presencia del protista, específicamente la presencia de clorofila y la dificultad que existe para separar a los dos microorganismos.

Al tener el protocolo establecido se prosiguió a evaluar la adaptación al aire previa de *M. acetivorans*, sembrando en los medios modificados células Control y AA. Para estos experimentos se utilizaron frascos con 50 mL de medio de cultivo (modificado 3.4 (A) y 18.7 mM (B)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), ya que en esta condición el cultivo está más expuesto a la presencia de oxígeno en el headspace del frasco y disuelto en el medio.

Los consorcios realizados fueron 1) *E. gracilis* proveniente del medio modificado A (3.4 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y *M. acetivorans* CNT provenientes del medio HS, cultivadas en el medio modificado A (3.4 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); 2) *E. gracilis* proveniente del medio modificado A y *M. acetivorans* AA provenientes del medio HS, cultivadas en el medio modificado A y 3) *E. gracilis* proveniente del medio modificado B (18.7 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y *M. acetivorans* AA provenientes del medio HS, cultivadas en el

medio modificado B (18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl). Todos los consorcios fueron incubados a 25°C en una cámara con ciclos de 12 hrs luz/oscuridad (60-70 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). El inóculo para *E. gracilis* fue de 0.4x10<sup>6</sup> cél/mL, mientras que para *M. acetivorans* fue de 0.5- 1.5 mg de proteína.

A parte de la producción de metano a través del tiempo, en estos cultivos también se cuantificó la concentración celular y la concentración de clorofila (*E. gracilis*).

### **7.3.3. PARAMETROS**

#### **7.3.3.1. CRECIMIENTO CELULAR**

En cuanto al crecimiento celular del consorcio debido a la presencia de los dos microorganismos se eligió a *E. gracilis* para medir este parámetro, por la facilidad del método para contar las células en el microscopio y la dificultad que implica la separación de los dos microorganismos para obtener individualmente a la arquea y medir la densidad óptica, ya que aunque el cultivo sea centrifugado en varias ocasiones siempre existe un remanente de protistas.

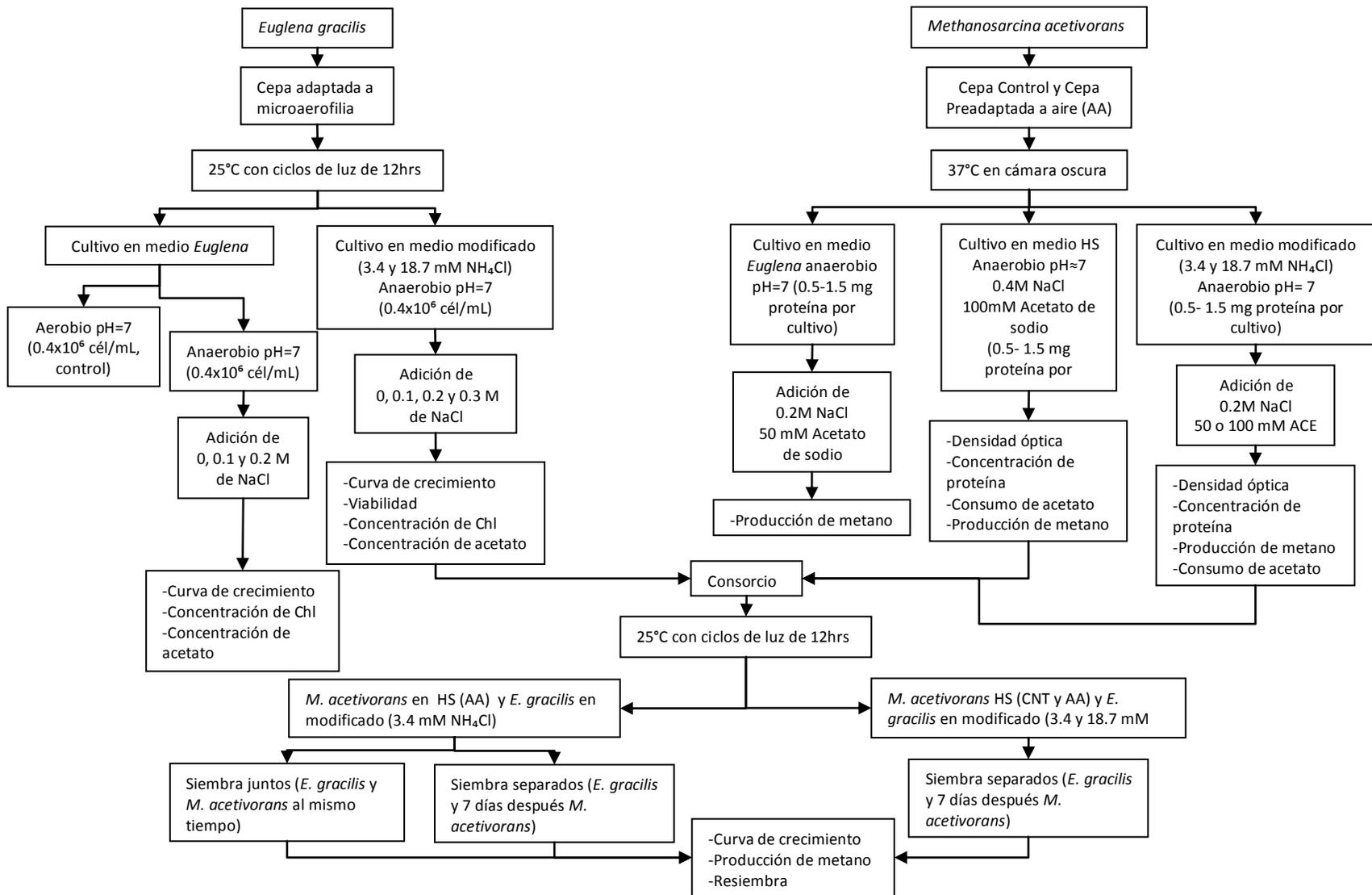
Para cuantificar la cantidad de células se utilizó el mismo método explicado en los parámetros de *E. gracilis*; también en este caso se determinó la viabilidad del protista a través del tiempo.

#### **7.3.3.2. PRODUCCION DE METANO**

Con este parámetro se pretende determinar varios puntos: 1) la viabilidad y crecimiento de *M. acetivorans* y 2) la concentración de acetato excretado.

El método para la cuantificación del biogás se explicó en los parámetros de *M. acetivorans*.

Figura 15. Esquema de la metodología seguida.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. *Euglena gracilis*

*E. gracilis* fue cultivada tanto en su medio óptimo (medio *Euglena*) como en el medio modificado (3.4 y 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl) donde se obtuvieron los siguientes resultados.

La primera condición que se evaluó fue la capacidad de *E. gracilis* para sobrevivir en condiciones de microaerofilia y esto se llevo acabó en el medio *Euglena*. Como se menciona anteriormente, la cepa que se utilizó lleva aproximadamente un año en condiciones de microaerofilia por lo que se evaluó que esta condición no fuera reversible. Se cultivó *E. gracilis* en condiciones de aerobiosis a 25°C con ciclos de 12 hrs luz-oscuridad (60-70  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y se cuantificó la concentración de células a través del tiempo. Los resultados obtenidos demostraron que la adaptación de las células a condiciones de microaerofilia fue exitosa y no es reversible, ya que los cultivos no presentaron crecimiento celular (durante aproximadamente 30 días). Este experimento no se repitió en los otros medios de cultivo ya que los resultados obtenidos en el medio *Euglena* demostraron contundentemente que la adaptación de las células a condiciones de microaerofilia fue exitosa y no es reversible.

Para evaluar el efecto de la concentración de NaCl se determinó la curva de crecimiento mediante la cuenta de células en una cámara Neubauer, donde también se obtuvo la viabilidad de las células a través del tiempo, en distintas concentraciones de NaCl.

Como se puede observar en la Figura 16, la concentración de NaCl afectó el crecimiento y duplicación del protista, ya que a mayor concentración de NaCl se observó una menor duplicación celular y disminuyó la viabilidad en los diferentes

medios de cultivo. En los medios modificado se incluyó la concentración de 0.3 M de NaCl que no se realizó en el medio *Euglena*, ya que *M. acetivorans* crece en una concentración máxima de 1 M NaCl y la concentración a la que es cultivada en el laboratorio es de 0.4 M y debido a que para cultivar a ambos microorganismos juntos la concentración de NaCl se tenía que aumentar gradualmente, por lo que las células provenientes de cultivos con 0.2 M se sembraron en cultivos con 0.3 M NaCl.

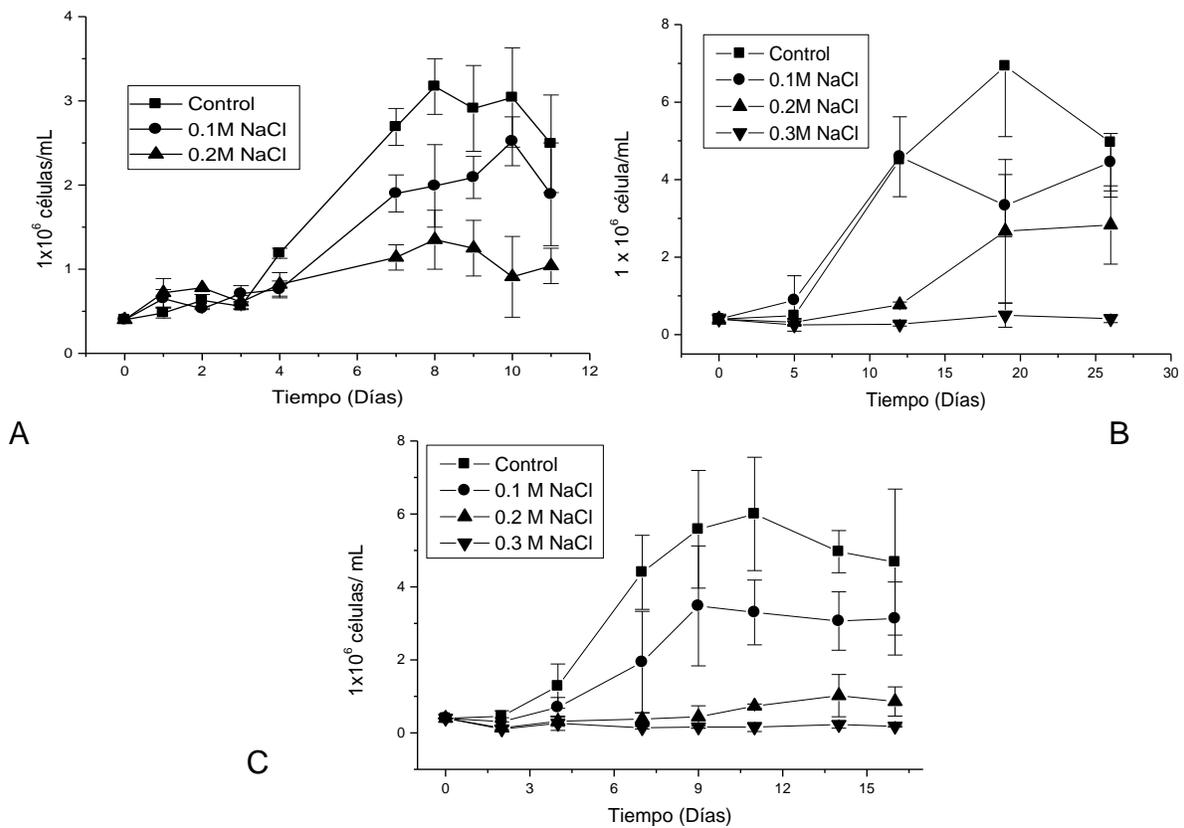


Figura 16. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *E. gracilis*. Células cultivadas en A) medio *Euglena*, B) medio Modificado A y C) medio Modificado B a 25°C en condiciones de microaerofilia con ciclos de luz/oscuridad (12 h) (Promedio  $\pm$  Desviación estándar, n=3).

Las concentraciones celulares obtenidas fueron: 4.5, 4 y  $1 \times 10^6$  células/mL, para cultivos control, 0.1 M y 0.2 M NaCl respectivamente, similares a las reportadas en condiciones de aerofilia tanto en las control como con las concentraciones de NaCl (González-Moreno, 1997). También se observó que las

modificaciones del medio estimularon la duplicación del protista, presentando una mayor concentración celular en todas las condiciones (0.3 M no ha sido reportada en medio *Euglena*) y aumentando la densidad celular final hasta casi dos veces con respecto a las células cultivadas en el medio *Euglena*.

Para evaluar el efecto real tanto de la concentración de NaCl como de la composición del medio de cultivo sobre las células se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y su tiempo de duplicación ( $t_d$ ) en cada condición (0, 0.1, 0.2 y 0.3 M de NaCl) y en cada medio de cultivo utilizando las cinéticas de crecimiento que se muestran en la Figura 17.

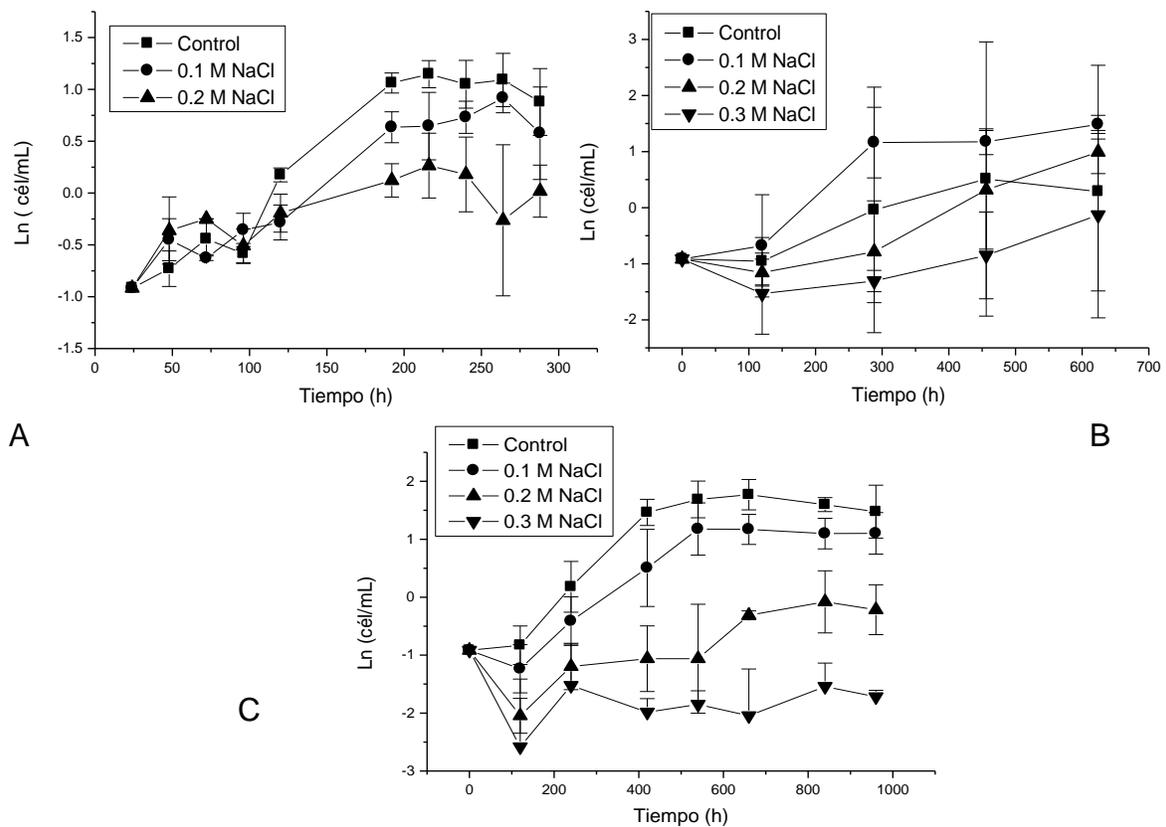


Figura 17. Cinéticas de crecimiento para observar el efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de *E. gracilis*. Células cultivadas en A) medio *Euglena*, B) medio Modificado A y C) medio Modificado B a 25°C en condiciones de microaerofilia con ciclos de luz/oscuridad (12 h) (Promedio  $\pm$  Desviación estándar, n=3).

En cuanto a las curvas de crecimiento, se determinó que las cinéticas de crecimiento son de orden 1 en todos los medios de cultivo, y con este dato se determinaron las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ = pendiente de segmento recto de la curva, fase exponencial) y los tiempos de duplicación ( $td = \ln 2/\mu$ ), estos datos que se muestran en la Tabla 2. Se observó que la presencia de NaCl disminuyó las velocidades de crecimiento y aumentó sus tiempos de duplicación. Sin embargo, la fase exponencial empieza casi a partir del día 5-6 en todas las condiciones. También se observó que en el medio modificado A disminuyó la velocidad específica de crecimiento y aumento 2 veces el tiempo de duplicación, mientras que en el medio modificado B solo aumentó una vez.

Tabla 2. Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempos de duplicación de *E. gracilis* cultivada en microaerofilia

	Medio <i>Euglena</i>			Medio modificado A (3.4 mM NH <sub>4</sub> Cl)				Medio modificado B (18.7 mM NH <sub>4</sub> Cl)			
NaCl (M)	0 (CNT)	0.1	0.2	0 (CNT)	0.1	0.2	0.3	0 (CNT)	0.1	0.2	0.3
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.017	0.010	0.005	0.005	0.005	0.004	0.003	0.007	0.006	0.003	0.009
td (h)	40.5	67	145	127	125	162.5	249	91	121	216	79

Se evaluó la viabilidad de las células en los medio modificados, ver Tabla 3. Los valores obtenidos confirmaron el daño ocasionado por la concentración de NaCl, obteniendo valores menores de viabilidad a concentraciones mayores de NaCl.

La concentración de clorofila también se afectó por la concentración de NaCl, a mayor concentración de NaCl la cantidad de clorofila presente en las células aumentó (Figura 18). Estos resultados concuerdan con lo reportado (CNT 83  $\mu$ g, 0.1 M NaCl 80  $\mu$ g y 0.2 M NaCl 128  $\mu$ g por 10<sup>7</sup> células/mL; González-Moreno, 1997), donde se observa un aumento relacionado a la concentración de NaCl, aunque los datos obtenidos son menores. Al comparar los resultados entre los diferentes medios de cultivo, se observó que las modificaciones al medio estimularon la síntesis de clorofila como ocurrió con el crecimiento celular.

Tabla 3. Comparación de la viabilidad de *E. gracilis* en diferentes medios de cultivo.

Medio modificado	% Viabilidad	
	A	B
Control	83	76
0.1 M NaCl	67	66
0.2 M NaCl	65	51
0.3 M NaCl	49	40

Los valores fueron obtenidos a partir de cultivos en los medios modificados, cultivados a 25°C en condiciones de microaerofilia con ciclos de luz (12hrs) (Promedio, n=3).

El consumo de las fuentes de carbono que se utilizaron para el crecimiento de *E. gracilis* en todos los medios de cultivo, no se determinó pero se ha reportado que esta cepa microaerofílica consume de glucosa aproximadamente el 70%, de glutamato el 85% y de malato el 75%. Aunque las concentraciones ocupadas en este proyecto fueron menores se cree que la tendencia para la utilización de estos compuestos fue la misma.

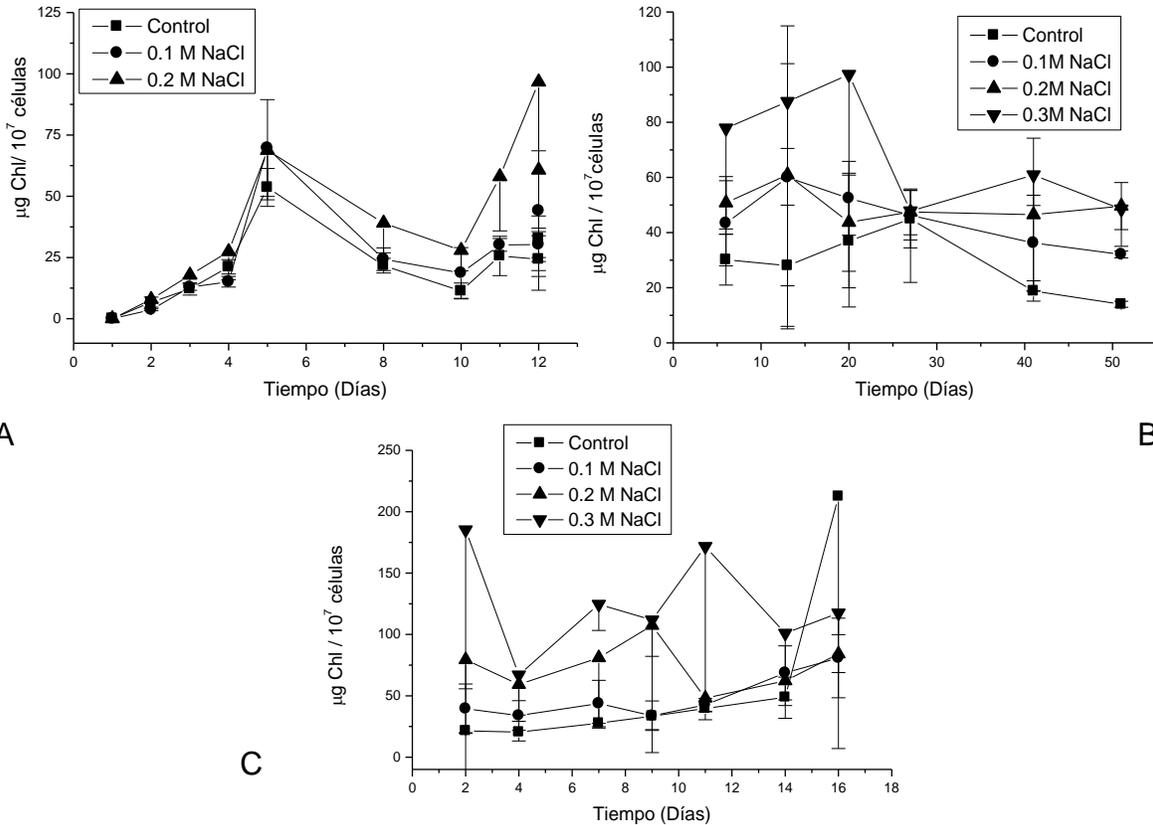


Figura 18. Cuantificación de clorofila normalizada ( $10^7$  células/mL) en *E. gracilis* en A) medio Euglena, B) medio Modificado A y C) medio Modificado B a través del tiempo. Células cultivadas a  $25^{\circ}\text{C}$  con ciclo de luz-oscuridad (12 h) con diferentes concentraciones de NaCl.

La cantidad de acetato excretada (normalizada  $10^7$  células/mL) por *E. gracilis* a los medios de cultivo se muestra en la Figura 19, donde se observó que en la mayoría de los casos la concentración aumentó considerablemente a partir del día 6, esto es más evidente en el medio *Euglena* ya que al ser el medio óptimo para su cultivo, las células realizan su metabolismo habitual sin tener que contender contra las dificultades que implicaría adaptarse a un medio distinto como se observó en los medios modificados. Las concentraciones alcanzadas en los medios modificados mostraron fluctuaciones a través del tiempo. Las cantidades de acetato excretadas en todos los cultivos son diferentes, siendo mejores los valores del medio modificado A. En el medio modificado B, las células expuestas a mayor concentración de NaCl no mostraron diferencia significativa en

la concentración de acetato en el medio, probablemente por el efecto salino al que están expuestas. En las graficas A y B se observó un aparente efecto del NaCl sobre la excreción del acetato. Las concentraciones excretadas de acetato coinciden con el rango del acetato excretado reportado previamente (1.1 a 3.6 mM; Garlaschi, 1974).

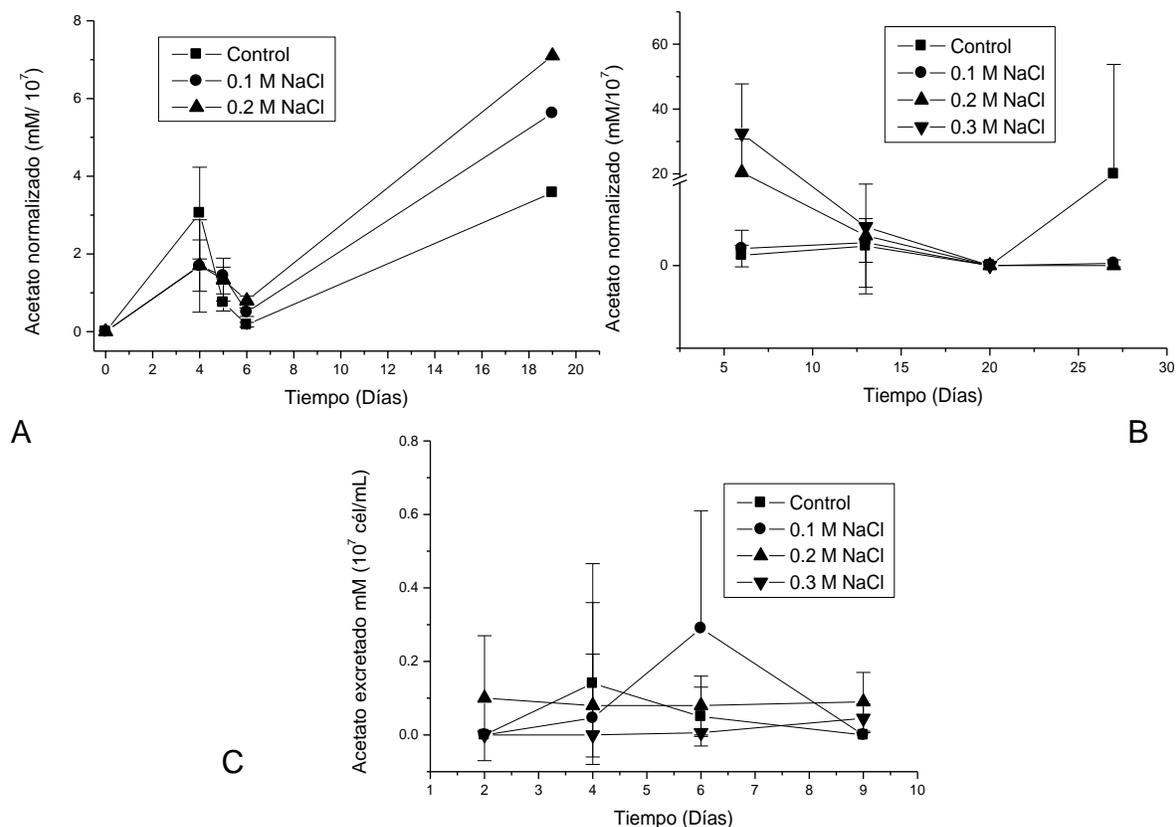


Figura 19. Cuantificación de acetato excretado al medio de cultivo por *E. gracilis* a través del tiempo. A) Medio Euglena, B) medio modificado A y C) medio modificado B a 25°C con ciclos de luz-oscuridad (12 h). Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

## 8.2. *Methanosarcina acetivorans*

Este microorganismo fue cultivado en el medio estándar (medio HS) y en los medios modificados A y B (3.4 y 18.7 mM NH<sub>4</sub>Cl respectivamente); también fue cultivado en el medio *Euglena* para evaluar si este medio afectaba la viabilidad de

la arquea y para justificar de manera experimental la modificación que se le realizó a este medio. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los parámetros medidos en estos medios de cultivo.

Los resultados que se obtuvieron del cultivo de *M. acetivorans* en el medio *Euglena* se muestran en la Figura 20. Se observó que la producción de metano en este medio es significativamente menor (60 veces) si lo comparamos con los otros tres medio de cultivo donde fue cultivada la arquea, siendo evidente que la composición de este medio afecta la viabilidad de *M. acetivorans*, ya que la concentración de acetato es de 50 mM y 0.2 M de NaCl, condiciones a las que se ha demostrado es capaz de sobrevivir y duplicarse. En este medio de cultivo también se observó el efecto de la presencia de oxígeno, ya que las células preadaptadas produjeron 4 veces menos metano que las células control en los otros resultados.

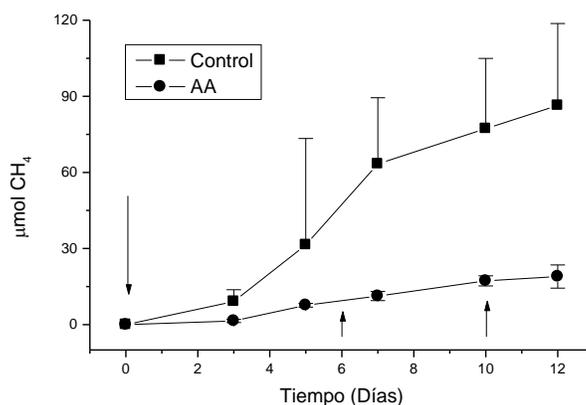


Figura 20. Producción de metano a través del tiempo. Cultivo de *M. acetivorans* (células control y células preadaptadas a oxígeno (AA) en medio *Euglena* con 50 mM Acetato de sodio y 0.2 M NaCl, a 37°C en la obscuridad. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las flechas indican los tiempos a los que se adiciono 2mL de aire estéril a los cultivos preadaptados a oxígeno.

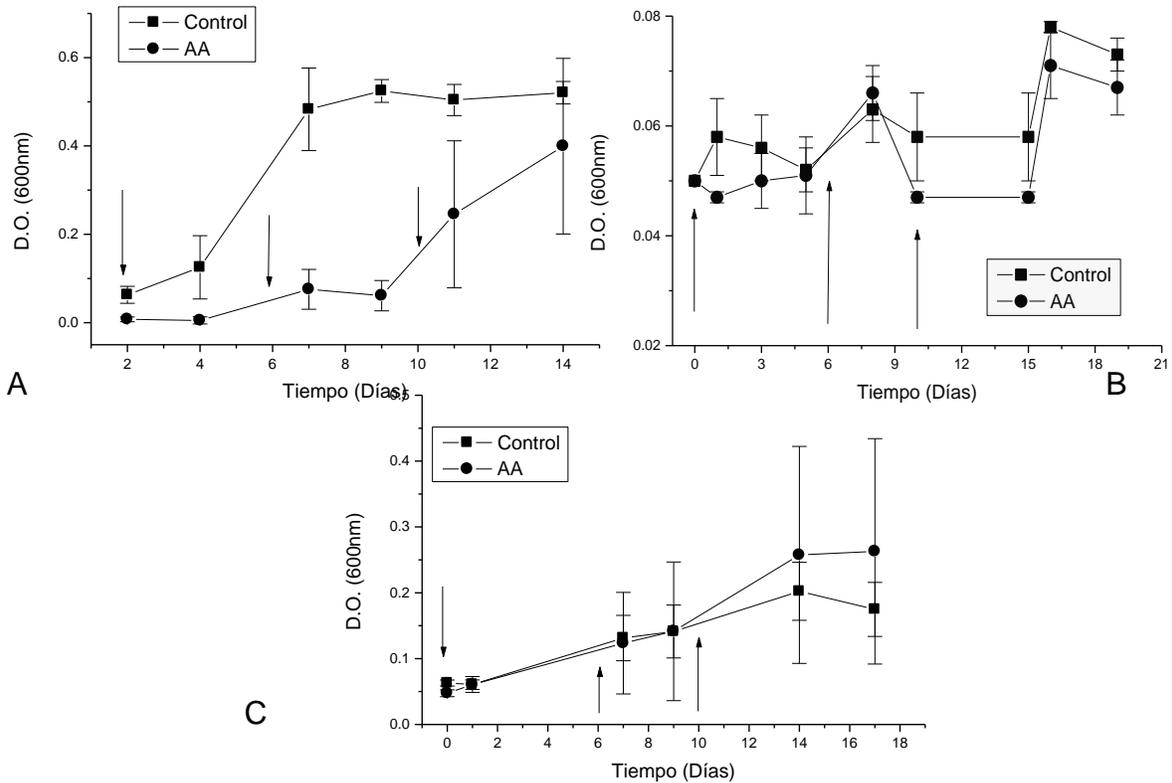
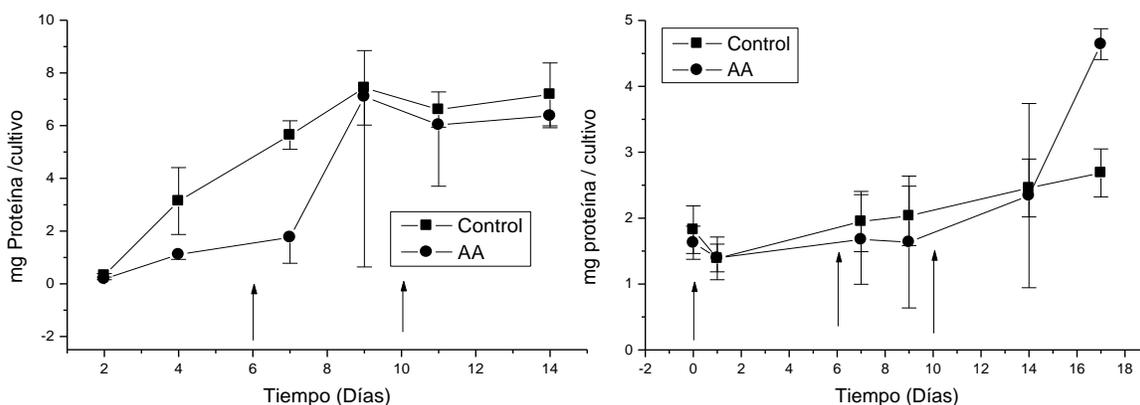


Figura 21. Densidad óptica a través del tiempo. Crecimiento celular de *M. acetivorans* en A) medio HS (100 mM ACE y 0.4 M NaCl), B) medio modificado A (100 mM ACE y 0.2 M NaCl) y C) medio modificado B (100mM ACE y 0.2 M NaCl) cultivado a 37°C en oscuridad. AA indica la cepa de *M. acetivorans* que ha sido adaptada a aire, mientras que Control es la cepa que nunca ha estado en contacto con oxígeno. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las flechas indican el tiempo a los cuales se les agregó 2mL de aire a los cultivos de las células adaptadas a oxígeno.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los medios HS y modificados, en lo que se refiere a la densidad óptica (Figura 21). Como se esperaba, la concentración celular fue mejor en el medio HS, seguido por el medio modificado B y por último el medio modificado A. Debido a que el medio HS es en el que comúnmente se cultiva esta arquea, en el equipo de trabajo del laboratorio se han establecido 0.6 unidades de absorbancia a 600 nm como el valor que indica un buen crecimiento en el medio (aproximadamente 5 mg de proteína/cultivo), aunque datos en la literatura reportan que 0.8 es la mayor absorbancia

que se obtiene del cultivo de *M. acetivorans* en 100 mM de acetato (Ferry, 2010). Se observó una disminución en la densidad óptica al comparar los cultivos control con los cultivos preadaptados (AA), aunque al final de la curva de crecimiento llegan casi a la misma densidad, superando el estrés oxidativo generado por el oxígeno.

Otro parámetro que se utilizó para medir el crecimiento celular fue la concentración de proteína obtenida por cultivo (Figura 22). En estos resultados se pueden observar las diferencias entre el medio HS y el medio modificado B y en lo que respecta al medio modificado A los resultados obtenidos no muestran un cambio significativo a través del tiempo (fluctuaciones de 3 a 4 mg por cultivo, variaciones debidas a errores experimentales). Al comparar los resultados obtenidos, se observó que la células en el medio modificado B crecieron más lento y al menos en la cepa control se alcanzó una concentración significativamente menor que las células en el medio HS, mientras que en las células cultivadas en el medio optimo alcanzaron la concentración reportada por el equipo de trabajo (5 mg de proteína por cultivo).



A

B

Figura 22. Concentración de proteína en A) medio HS (100 mM Acetato y 0.4 M NaCl) y B) medio modificado B (100 mM Acetato y 0.2 M NaCl) a través del tiempo. En cultivos incubados a 37°C en oscuridad. CNT, células control y AA células preadaptadas a aire. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las flechas indican los tiempos a los cuales se les adiciono 2mL de aire estéril a los cultivos de células preadaptadas.

La producción de metano se muestra en la Figura 23, donde se observó el aumento en la producción de este gas desde su siembra hasta aproximadamente el día 15, la cual se detiene por el consumo total de la fuente de carbono, en este caso 100 mM acetato (Mah, 1978).

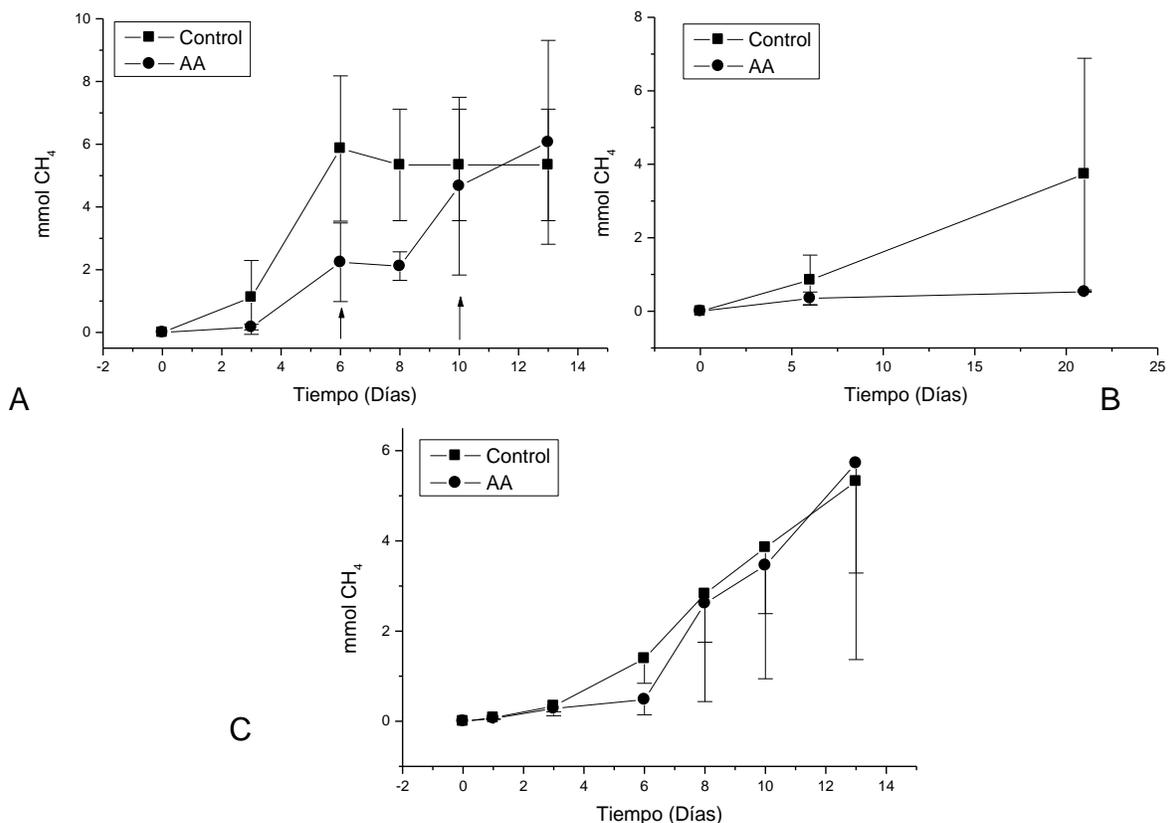


Figura 23. Producción de metano. Cultivo de *M. acetivorans* en A) medio HS (100 mM Acetato y 0.4 M NaCl), B) medio modificado A (100 mM Acetato y 0.2 M NaCl) y C) medio modificado B (100 mM Acetato y 0.2 M NaCl) a través del tiempo. En cultivos incubados a 37°C en oscuridad. CNT, células control y AA células preadaptadas a aire. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

La cantidad de metano obtenido en los distintos medios de cultivo fue semejante para las células control como para las células adaptadas, llegando al valor teórico que es de 5 mmol de metano, mientras que para las células cultivadas en el medio modificado A la producción de metano disminuyó,

sugiriendo que la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  utilizada no fue la adecuada para su cultivo, ya que es lo único que varía con el otro medio modificado.

El siguiente parámetro que se midió fue el consumo de la fuente de carbono (acetato) (Figura 24) como control para evaluar la producción de metano y el crecimiento de las arqueas en los medios de cultivo. Debido a las dificultades de la técnica, no se hizo una curva como tal, sino que se tomaron muestras a lo largo del cultivo y se analizó la cantidad de acetato (Día 0, 6 y 10).

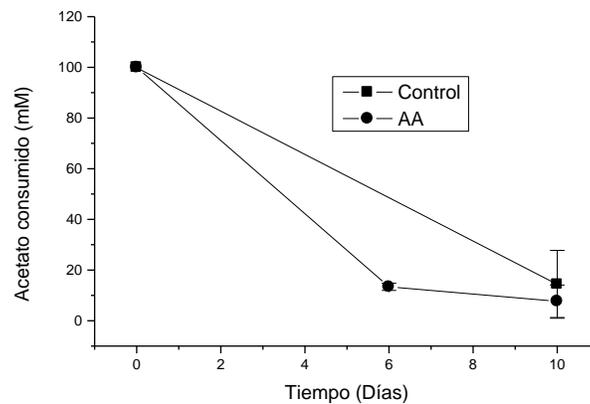


Figura 24. Consumo de acetato a través del tiempo. Cultivo de *M. acetivorans* en medio HS (100 mM ACE y 0.4 M NaCl) incubado a 37°C en oscuridad, células control y células preadaptadas a aire (AA). Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Se observó que la fuente de carbono disminuyó mientras que aumentó la producción de metano.

### 8.3. Consorcio

En primer lugar se realizó un experimento para identificar cual era el mejor método para iniciar el consorcio, es decir, si la producción de metano era mayor y duraba por más tiempo dependiendo del orden de siembra de cada uno de los microorganismos, todo esto con base en que *E. gracilis* bajo algunas condiciones de cultivo aumentó significativamente la excreción de acetato a partir del 5to o 6to día de cultivo (Figura 19). Los dos consorcios se llevaron a cabo en tubos con 15

mL de medio de cultivo y se incubaron a 25°C en una cámara con ciclos de luz/obscuridad de 12 h. La Figura 25 muestra los resultados que se obtuvieron en cuanto a la producción de metano. En estos consorcios también se midió la concentración de células (*E. gracilis*) como un parámetro de viabilidad de los consorcios (Figura 26).

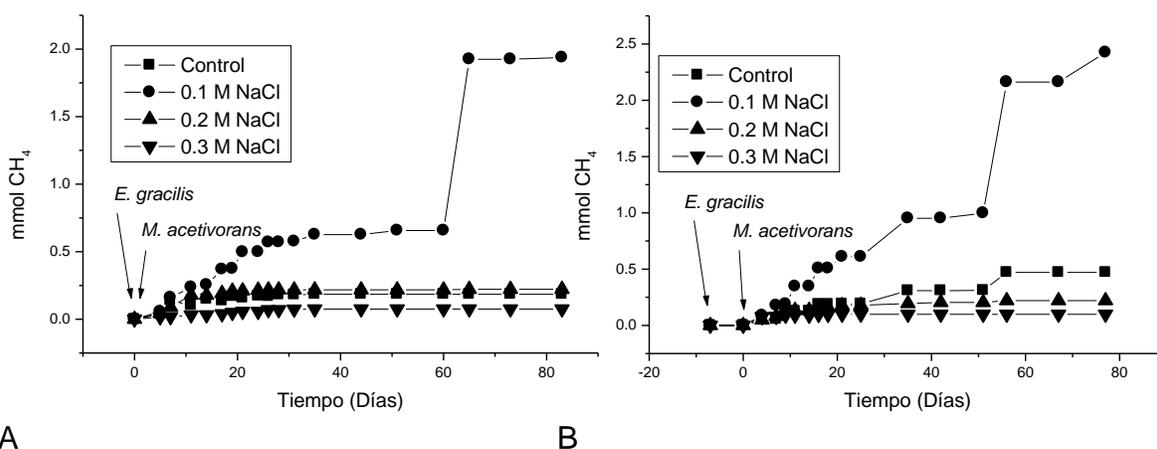


Figura 25. Producción de metano en consorcios. *M. acetivorans* preadaptadas a aire provenientes del medio HS y *E. gracilis* en medio modificado A, sembrados A) al mismo tiempo y B) *M. acetivorans* 7 días después que *E. gracilis*, en tubos de 15 mL de medio modificado A, cultivados a 25°C en una cámara con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Promedio (n=2). Las flechas indican los días en que fueron sembrados los microorganismos. El tiempo cero marca el momento en el que se formo el consorcio.

La excreción de acetato por parte de *E. gracilis* en el consorcio se puede estimar por la producción de metano obtenida, ya que la relación de acetato-metano en la metanogénesis realizada por *M. acetivorans* es de 1:1, por lo que la cantidad aproximada de acetato excretada es igual a la cantidad de metano producido. Con base en esto, la cantidad de acetato excretada en los consorcios anteriores es de 0.2, 2.0, 0.2 y 0.1 mmol de acetato en los cultivos con 0, 0.1, 0.2 y 0.3 M de NaCl respectivamente para el consorcio donde se sembraron juntos los microorganismos, mientras que cuando fueron sembrados a diferentes tiempo la cantidad aproximada de acetato excretada fue de 0.5, 2.5, 0.2 y 0.1 mmol de acetato.

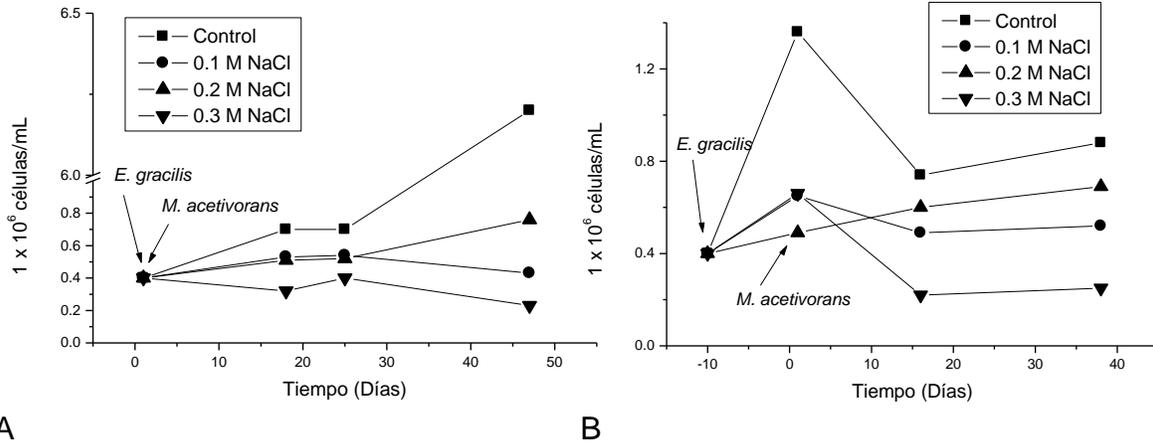


Figura 26. Concentración celular (*E. gracilis*) a través del tiempo en consorcios. *M. acetivorans* adaptadas a aire provenientes del medio HS y *E. gracilis* en medio modificado A, en tubos de 15 mL de medio modificado A, cultivados a 25°C en una cámara con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. A) Consorcio de microorganismos sembrados al mismo tiempo y B) Consorcio con *M. acetivorans* sembradas 7 días después que *E. gracilis* (n=2).

Con base en los resultados obtenidos al final de la curva de crecimiento, no es muy claro cuál fue el mejor consorcio según la producción final de metano debido a que en el consorcio 1 fue de 2 mmol de metano, mientras que en el consorcio 2 fue de 2.5. Sin embargo, al comparar la producción de metano al día 30 de cultivo se observó que el mejor fue el consorcio 2 con 0.1 M NaCl, ya que en éste se alcanzaron mayores cantidades de metano en menor tiempo, es decir que se observa una pendiente mayor, lo que implica una mayor velocidad en la producción de gas metano.

También se observó que la concentración de células (*E. gracilis*) disminuyó en los consorcios comparada con las concentraciones obtenidas en su cultivo individual, ya que en condiciones similares (medio modificado A con diferentes concentraciones de NaCl) se había alcanzado valores mucho mayores que estos (Control, 7: 0.1M NaCl, 4.5; 0.2M NaCl, 5 y 0.3M NaCl 0.5x10<sup>6</sup> células/mL en cultivos de 50mL). Aunque existe cierta relación entre la concentración celular y la producción de metano ya que al comparar los consorcios, en todas las

condiciones de NaCl la concentración de células (*E. gracilis*) fue mayor en los consorcios 2 donde los dos microorganismos se sembraron a diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos de la resiembra de estos consorcios se observan en la Figura 27. También se cuantificó la concentración de células presentes, Figura 28.

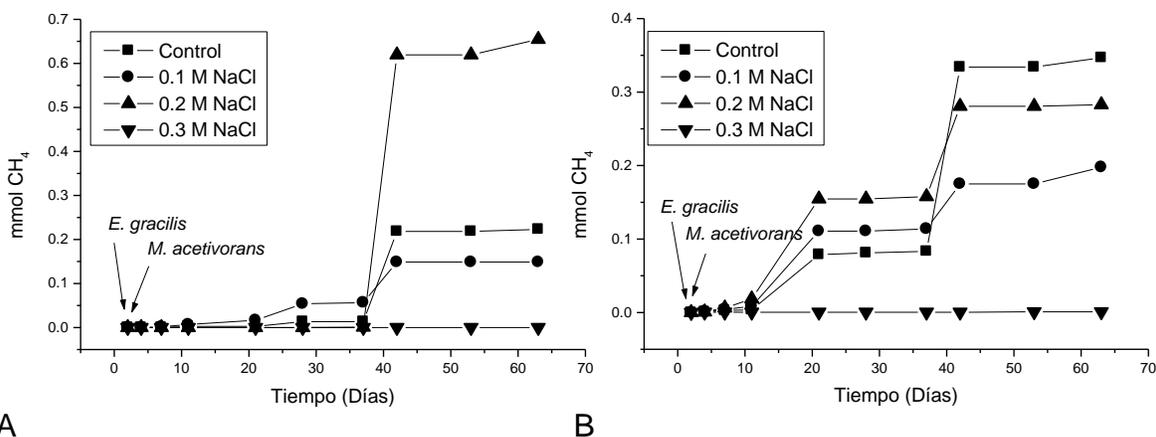


Figura 27. Producción de metano en las resiembras de consorcios. *M. acetivorans* preadaptadas a aire provenientes del medio HS y *E. gracilis* en medio modificado A, A) Sembrados al mismo tiempo y B) Sembrando 7 días después a *M. acetivorans*, en tubos de 15 mL de medio cultivados a 25°C en una cámara con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Promedio (n=2).

La excreción de acetato aproximada en las resiembras de los consorcios fue menor que la obtenida en el consorcio de donde se extrajeron las células ya que se obtuvieron cantidades de 0 a 0.3 mmol de acetato.

Los resultados obtenidos en las resiembras de estos consorcios (Figuras 27 y 28) confirmaron que el mejor método para realizar el consorcio fue el protocolo 2 donde se inicio el cultivo de *E. gracilis* y aproximadamente 7 días después se adicionó a *M. acetivorans*, ya que en la resiembra del consorcio cuando los dos microorganismos son sembrados al mismo tiempo, la producción de metano empezó aproximadamente a partir del día 20-30 de cultivo y su máxima cantidad de metano producida fue de 0.65 mmol en la condición de 0.2M NaCl, mientras

que la producción de metano en el consorcio donde los microorganismos fueron sembrados en diferentes tiempos comenzó aproximadamente a los 10 días y se llegó a concentraciones más altas en casi todas las condiciones.

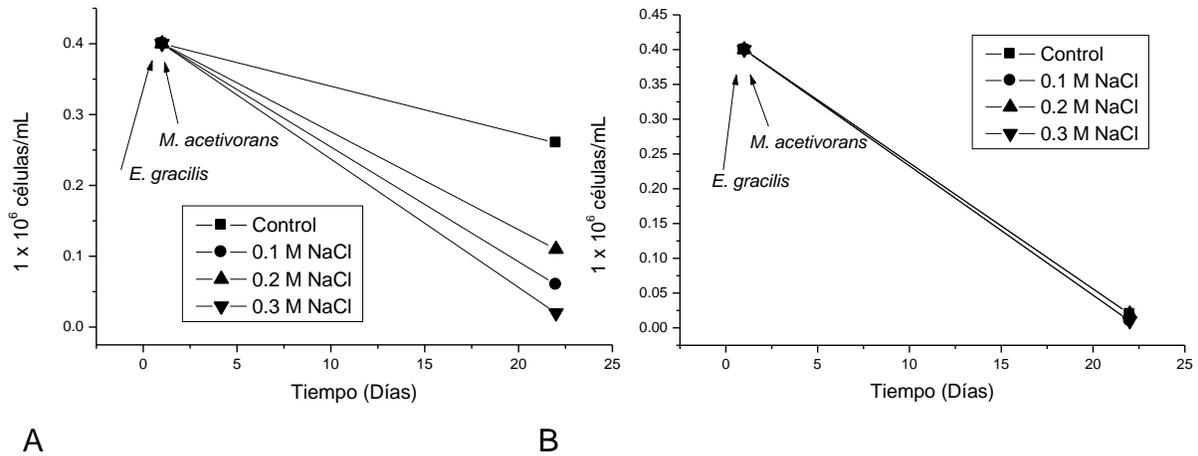


Figura 28. Concentración de células (*E. gracilis*) en resiembra de consorcios. *M. acetivorans* preadaptadas a aire provenientes del medio HS y *E. gracilis* en medio modificado A, A) Sembrados al mismo tiempo y B) Sembrados a diferentes tiempos (*M. acetivorans* 7 días después) en tubos de 15 mL de medio cultivados a 25°C en una cámara con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Promedio (n=2).

Después de establecer el protocolo de siembra para el consorcio, se evaluó la condición de adaptación al aire en el consorcio por parte de *M. acetivorans* y comparamos la productividad de metano en los dos medios modificados. Se cultivó un consorcio con arqueas control en el medio modificado A, al igual que uno con arqueas adaptadas a aire; mientras que en el medio modificado B se cultivó un consorcio con arqueas adaptadas a aire. Los resultados se muestran en las Figuras 29, 30 y 31.

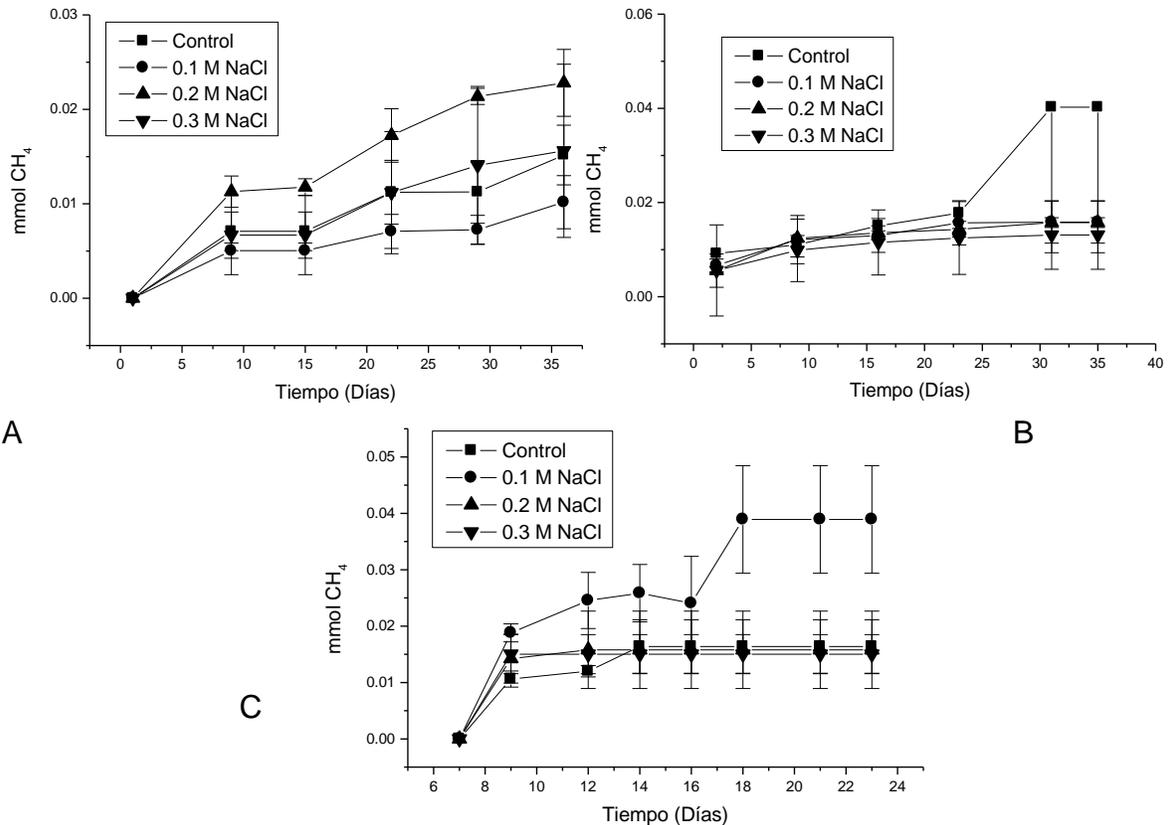


Figura 29. Producción de metano en diferentes condiciones del consorcio, A) Consorcio con *M. acetivorans* CNT en medio modificado A, B) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado A y C) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado B. *M. acetivorans* sembradas 7 días después que *E. gracilis*, cultivados a 25°C en una cámara de luz/oscuridad de 12 h. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los resultados obtenidos en la producción de metano (Figura 29) mostraron que la preadaptación a oxígeno generó un ligero aumento en la cantidad de metano producida, y al comparar los dos consorcios a partir de células preadaptadas a aire se observó que en el cultivo en el medio modificado B la producción de metano fue ligeramente mayor que en el medio modificado A. La producción de metano comparada con la obtenida en los cultivos individuales de *M. acetivorans* fue mucho menor (200 veces menos), pero se mantiene constante por al menos 30 días.

La excreción aproximada de acetato en estos consorcios tuvo una disminución significativa al compararla con los anteriores, llegando esta vez hasta 0.04 mmol de acetato mientras que en los primeros experimentos se obtuvo un intervalo de 0.1 a 2 mmol de acetato.

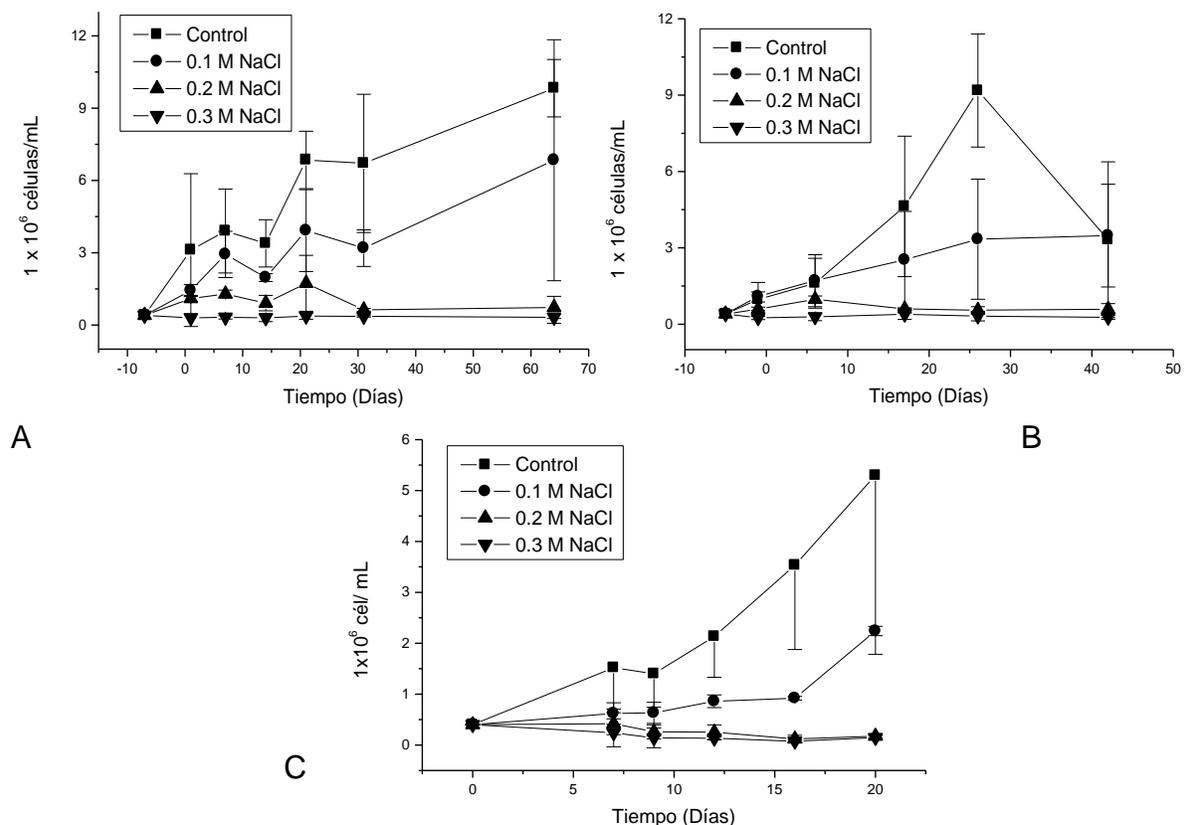


Figura 30. Crecimiento celular (*E. gracilis*) en diferentes condiciones del consorcio, A) Consorcio con *M. acetivorans* CNT en medio modificado A, B) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado A y C) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado B. *M. acetivorans* sembradas 7 días después que *E. gracilis*, cultivados a 25°C en una cámara de luz/oscuridad de 12 h. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

La densidad celular (*E. gracilis*) también se midió en los cultivos a lo largo del tiempo y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30. La densidad celular en los consorcios fue similar en todas las condiciones y también coincide con las concentraciones alcanzada en los cultivos individuales de *E. gracilis* en los

medios modificados, por lo que el co-cultivo con *M. acetivorans* no alteró su crecimiento, aunque la presencia de NaCl sigue afectando el crecimiento.

Los valores de clorofila determinados en los consorcios presentaron una tendencia similar a la obtenida en los cultivos individuales, donde la concentración de clorofila se incrementó al aumentar la cantidad de NaCl en el medio de cultivo, aunque las concentraciones fueron mayores (ver Figura 31).

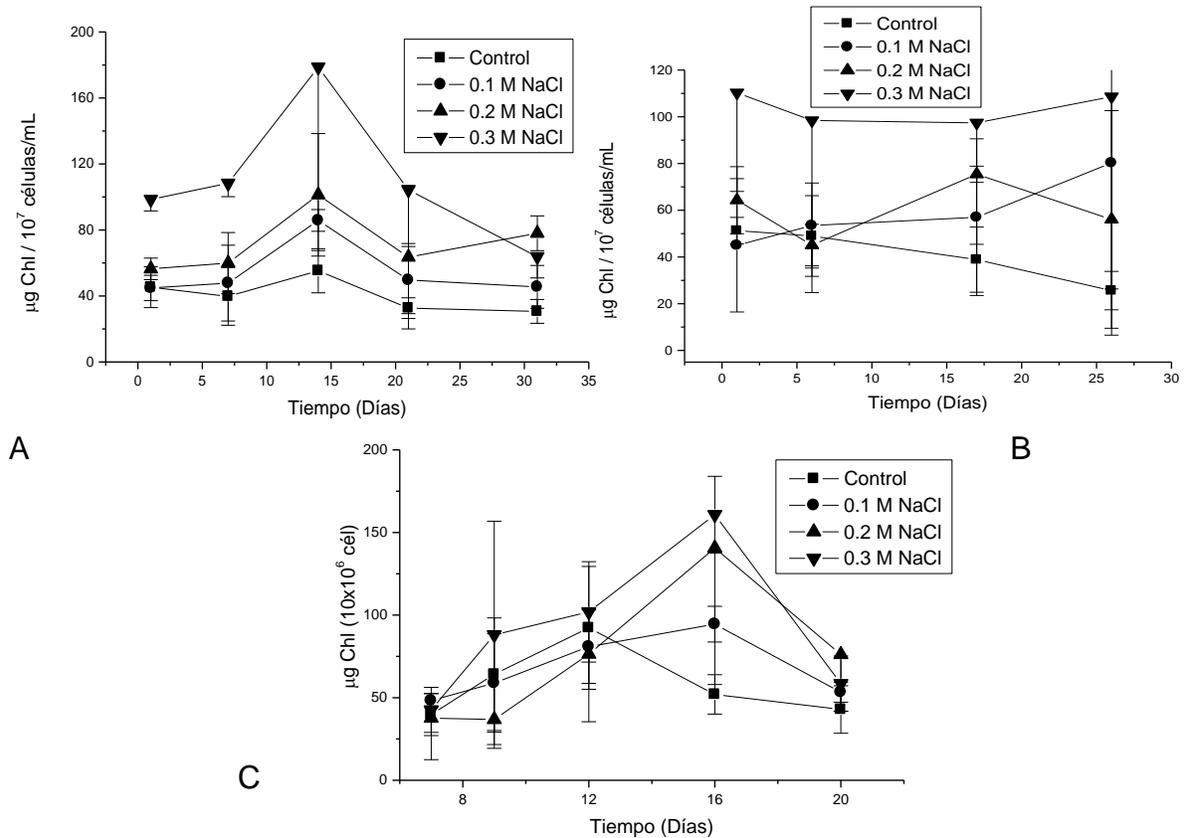


Figura 31. Concentración de clorofila (*E. gracilis*) en diferentes condiciones del consorcio, A) Consorcio con *M. acetivorans* CNT en medio modificado A, B) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado A y C) Consorcio con *M. acetivorans* AA en medio modificado B. *M. acetivorans* sembradas 7 días después que *E. gracilis*, cultivados a 25°C en una cámara de luz/oscuridad de 12 h. Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La razón por la que se utilizaron dos diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fue porque en un principio se había propuesto 3.4 mM porque no se sabía qué efecto podría tener sobre *E. gracilis*, pero se observó que el crecimiento de *M. acetivorans* y la productividad del consorcio disminuía, así que se decidió aumentar la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 18.7 mM, que es la misma concentración que se encuentra en el medio HS.

### 9.1. *Euglena gracilis*

Una de las primeras condiciones a las que se enfrentó *E. gracilis* en este proyecto fue a las altas concentraciones de oxígeno, esto para comprobar su condición de microaerofilia, ya que se sabe que los organismos al no estar bajo ciertas condiciones de estrés tienden a dejar de producir los compuestos que ayudan a combatir estas condiciones estresantes. En este caso el estrés oxidativo generado por la presencia de especies reactivas de oxígeno. Por lo que se sometió al protista a elevadas concentraciones de oxígeno y con los resultados obtenidos se puede suponer que al permanecer tanto tiempo en estas condiciones (microaerofilia) su sistema antioxidante no pudo contener contra el alto estrés oxidativo que generaron las grandes concentraciones de oxígeno: la oxidasa alterna (Jasso-Chávez et al., 2010), la superóxido dismutasa y la ascorbato peroxidasa entre otras, estas son algunas enzimas que se ha reportado en *E. gracilis* y que tienen la capacidad de contener contra las especies reactivas de oxígeno, que al no “usarse” la célula no gasta energía en producirlas y por lo tanto al exponerla a elevadas concentraciones de oxígeno después de tanto tiempo suponemos que la célula ya no fue capaz de sobrevivir al estrés generado. Con esto se confirmó la adaptación de *E. gracilis* a vivir en condiciones de microaerofilia y que esta adaptación no es reversible o al menos no de forma inmediata.

La adaptación a los medios modificados por parte de *E. gracilis* se evaluó mediante la determinación de su crecimiento celular y la concentración de clorofila en este medio. La concentración celular aumentó en los medios modificados al compararla con la obtenida en su medio óptimo (*Euglena*) (Figura 16), debido a la presencia de las vitaminas agregadas que en otras condiciones *E. gracilis* tendría que sintetizar para su crecimiento y al encontrarse en el medio de cultivo ahorra pasos para su utilización y por lo tanto puede aumentar su duplicación celular, del mismo modo que la presencia de minerales que en este medio modificado son mayores a los que percibe en el medio *Euglena*. Sin embargo, el efecto salino observado en los medios modificados fue igual al efecto observado en el medio *Euglena* donde disminuyó la concentración de células cuando se aumentó la concentración de NaCl. Otro parámetro evaluado fue la síntesis de clorofila, que fue estimulada por la presencia de NaCl como un mecanismo de compensación, ya que el NaCl inhibe la fotosíntesis por lo que la célula para contender con este efecto y al encontrar disminuida la fosforilación oxidativa mitocondrial por la baja concentración de oxígeno, aumentó la producción de clorofila para “restablecer” la fotosíntesis sin tener éxito. Cuando comparamos los datos obtenidos en los diferentes medios de cultivo utilizados con los que han sido publicados (González-Moreno, 1997), se observó que fueron menores en casi todas las condiciones, debido a que éstos se obtuvieron con cultivos aerobios, aunque en todas las condiciones se observó el aumento de clorofila relacionado con el aumento en la concentración de NaCl presente (Figura 18).

La excreción del acetato en el medio de cultivo *Euglena* tuvo un aumento considerable a partir del día 6, coincidiendo con la fase exponencial sugiriendo fuertemente que el acetato sí es un producto de excreción del metabolismo de *E. gracilis*, ya que como se sabe en la fase exponencial es donde el metabolismo se encuentra más activo y de ese modo los productos de éste aumentan su concentración. La fluctuación que se logró observar en los medios modificados, principalmente en las concentraciones 0 y 0.1 M de NaCl, es probable que se deba a que el acetato también puede ser utilizado como fuente de carbono, por lo tanto al aumentar la concentración de acetato fuera de la célula es probable que lo

consume. En cuanto a las altas concentraciones que se observaron en los primeros puntos de las concentraciones 0.2 y 0.3 M de NaCl es probable que se deba a que las células contienen acetato dentro de sí y al enfrentarla con estas condiciones algunas células no resistieron y se lisaron, liberando al medio el acetato que contenían; pero como se explicaba antes, el acetato también puede ocuparse como fuente de carbono por lo que las células que sí resistieron el estrés salino pudieron utilizarlo y de esta forma la concentración disminuyó.

## **9.2. *Methanosarcina acetivorans***

La mínima producción de metano por parte de *M. acetivorans* en el medio *Euglena* (50 mM Acetato, 0.2 M NaCl) confirma que este medio no es adecuado para el cultivo de la arquea y justifica las modificaciones que se hicieron al medio para lograr cultivos viables. Del mismo modo en la Figura 21, la densidad óptica de *M. acetivorans* en los medios de cultivo, confirma que la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que se le añadió a los medios HS y modificado B es necesaria para la viabilidad de las células, ya que es lo único diferente entre los medios modificados. La cuantificación del metano producido también confirma esta situación, la mejor concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es de 18.7 mM ya que en el medio modificado con la menor concentración, la cantidad de metano que alcanza las células control es menor a las de los medios con una mayor concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

En cuanto a la presencia del oxígeno, no se observó que éste tuviera un efecto visible en ninguna de los medios utilizados, ya que en todos los parámetros medidos se llegó al mismo resultado que las células control, con esto se confirma que la preadaptación se llevó a cabo, y que estas células cuentan con los medios suficientes para contener contra el estrés oxidativo generado por la concentración de oxígeno que se le administra a lo largo del cultivo.

Todos los parámetros medidos muestran una relación entre ellos: el aumento en la densidad óptica, el aumento en la producción de metano, el

aumento en la concentración de proteína y el consumo de acetato, indicando el crecimiento de *M. acetivorans* en los medios de cultivo en los que fue cultivado.

### 9.3. Consorcio

Los primeros consorcios realizados fueron para dilucidar el mejor método para establecer el consorcio (Figura 25). Los resultados de este experimento arrojaron que el mejor método para la siembra del consorcio es cuando los microorganismos se siembran a diferentes tiempos, es decir, cuando *M. acetivorans* se sembró aproximadamente después de 7 días que *E. gracilis*. La razón por la que se propuso este método fue que la fase exponencial de crecimiento de *E. gracilis*, iniciaba alrededor de los 6 días, por lo que la concentración de acetato aumentaría en esos días, esto se comprobó con la cuantificación del acetato excretado donde se observó que la concentración de acetato fue de 0.3 mM al día 6 en casi todas las condiciones.

Uno de los parámetros medidos fue la concentración celular. En algunos consorcios se observó que existe una aparente disminución en la concentración de células presentes, probablemente por la concentración remanente de NaCl que se añade al inocular las arqueas y también porque en algunos casos los dos microorganismos se quedaban pegados en el fondo del contenedor, recordemos que *M. acetivorans* es un microorganismo inmóvil y es capaz de generar agregados, por lo que en los cultivos estáticos tiene a ubicarse en el fondo del recipiente, por lo que suponemos que la arquea crea un fuerte enlace con el protista para obtener concentraciones más altas de acetato y con esto se mantiene cierta concentración de células pegadas al fondo del recipiente.

La producción de metano en los todos los consorcios realizados fue menor comparada con la obtenida en cultivos individuales de *M. acetivorans*, esto debido a la concentración de acetato ya que en los cultivos individuales estas recibían como mínimo una concentración de 50 mM de acetato, mientras que en los

consorcios la concentración de acetato que se esperaba recibieran fluctuaba entre 0 y 1.2 mM, y haciendo el cálculo correspondería a 0.06 mmol de metano, pero la cantidad de metano que produjeron la mayoría de los consorcios rebaso esta cantidad. Los resultados sugieren que la excreción de acetato es continua, si existe un proceso, en esta caso la metanogénesis de la arquea, que lo está consumiendo, ya que en algunos casos la producción de metano era mayor a 0.06 mmol.

La concentración de NaCl también influyó en estos resultados, recordando que la concentración óptima para el crecimiento de *M. acetivorans* es de 0.4 M NaCl, aunque los resultados sugieren que esta concentración de NaCl es necesaria solo cuando el cultivo tiene grandes cantidades de fuente de carbono (100 mM acetato), es decir que la necesidad de NaCl está ligada a la concentración de acetato presente.

Para verificar la viabilidad de los consorcios se realizaron resiembras de estos, y en ellas se observó una evidente disminución en la producción de metano. Esta disminución en la producción del metano en las resiembras sugiere fuertemente que existe una disminución en el inóculo de *M. acetivorans* ya que para la resiembra solo se toma en cuenta la concentración de *E. gracilis* sin saber la concentración de *M. acetivorans*, por lo que se propone que la viabilidad celular se afectó.

## 10. CONCLUSIONES

La modificación del medio de cultivo resultó favorable para la realización del consorcio al obtenerse una producción de metano constante por un mayor tiempo que los consorcios realizados en el medio *Euglena* (14 días).

La adaptación de *E. gracilis* al medio modificado fue exitosa ya que fue capaz de sobrevivir y duplicarse y hasta alcanzar concentraciones celulares mayores a las obtenidas en su medio óptico.

La concentración de NaCl a la que fue sometida el protista (0.1, 0.2 y 0.3 M) modificó tanto su velocidad específica de crecimiento y duplicación celular. También estimuló la síntesis de clorofila.

*E. gracilis* fue capaz de excretar acetato en el medio modificado y en condiciones de microaerofilia.

*M. acetivorans* fue capaz de resistir el cambio del medio de cultivo produciendo la misma cantidad de metano que en medio HS

La cepa de *M. acetivorans* que fue adaptada a concentraciones específicas de oxígeno alcanzó la misma producción de metano, densidad óptica, concentración de proteína y consumo de acetato que la cepa control.

Nuestra hipótesis de que el protista sería capaz de excretar acetato y de que la arquea utilizaría este acetato como fuente de carbono para la producción de metano fue cierta ya que en cultivos sin aparentes fuentes de carbono para *M. acetivorans*, es decir donde no se agregó acetato, se observó producción de metano de manera constante por un tiempo relativamente largo (aproximadamente 30 días), formando de esta manera un consorcio exitoso.

El establecimiento y viabilidad del consorcio se confirmó al realizar las resiembras y que estas continuaran con la producción de metano por el mismo tiempo que el consorcio original.

Basados en su gran adaptabilidad metabólica, se logró un consorcio estable entre un protista aerobio de aguas dulces (*E. gracilis*) y una arquea metanogénica de

origen marino, anaerobia estricta (*M. acetivorans*) para la generación de biogás metano.

## 11. PERSPECTIVAS

Determinar si las enzimas de *Euglena* involucradas en la producción/consumo de acetato se ven afectadas por la microaerobiosis y la presencia de NaCl.

Determinar la concentración intracelular de NaCl en *E. gracilis*.

Al comprobar la viabilidad del consorcio en el medio modificado podría aplicarse al manejo de residuos, es decir, los dos microorganismos fueron capaces de adaptarse a condiciones estresantes, por lo que podrían cultivarse en desechos de materia orgánica para utilizar las fuentes de carbono presentes en aguas residuales para producir metano, ya sea que el protista modifique los compuestos haciendo que estos puedan ser ocupados por la arquea, o esta pueda tomar los compuestos directamente y utilizarlos como fuente de carbono.

El consorcio también podría ser ocupado para la acumulación de metales pesados, ya que estos dos microorganismos cuentan con una gran capacidad para acumularlos.

También se sugirió establecer un protocolo de agitación para evitar la sedimentación de los microorganismos y la pérdida de células en las resiembras. Así como variar la cantidad de luz que reciben los cultivos, modificando la posición de los cultivos con respecto a las lámparas de la cámara de cultivo.

## 12. ANEXO

### 12.1. Índice de Figuras

Figura 1. Fotografías de <i>E. gracilis</i> mixótrofa (40x). .....	9
Figura 2. Producción de ATP y NADPH en la primera etapa de la fotosíntesis (dependiente de luz).....	10
Figura 3. Producción de Glucosa en el ciclo de Calvin-Benson.....	11
Figura 4. Ciclo de Krebs en <i>Euglena gracilis</i> . .....	13
Figura 5. <i>Methanosarcina acetivorans</i> . .....	15
Figura 6. Vía reportada para la conversión de acetato a CH <sub>4</sub> por <i>M. acetivorans</i> . 18	
Figura 7. Cámara de anaerobiosis marca COY (Michigan, USA). .....	24
Figura 8. Microscopio óptico (NIKON) y Cámara de Neubauer (BRAND).....	27
Figura 9. Esquema del metabolismo propuesto en <i>E. gracilis</i> para la excreción de acetato. ....	29
Figura 10. Esquema enzimático para la cuantificación de acetato en el medio de cultivo. ....	30
Figura 11. Determinación de la desaparición de NADH para la cuantificación de acetato en espectro de diodos a 340nm. ....	31
Figura 12. Cromatograma de metano. ....	37
Figura 13. Curvas patrón de metano. ....	38
Figura 14. Ecuación utilizada para calcular la concentración de metano en el espacio vacío de cada cultivo. ....	39
Figura 15. Esquema de la metodología seguida.....	43
Figura 16. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de <i>E. gracilis</i> . ....	45
Figura 17. Cinéticas de crecimiento para observar el efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de <i>E. gracilis</i> .....	46
Figura 18. Cuantificación de clorofila normalizada (10 <sup>7</sup> células/mL) en <i>E. gracilis</i> en A) medio Euglena, B) medio Modificado A y C) medio Modificado B a través del tiempo. ....	49

Figura 19. Cuantificación de acetato excretado al medio de cultivo por <i>E. gracilis</i> a través del tiempo. ....	50
Figura 20. Producción de metano a través del tiempo. ....	51
Figura 21. Densidad óptica a través del tiempo.....	52
Figura 22. Concentración de proteína en A) medio HS (100 mM Acetato y 0.4 M NaCl) y B) medio modificado B (100 mM Acetato y 0.2 M NaCl) a través del tiempo. ....	53
Figura 23. Producción de metano.....	54
Figura 24. Consumo de acetato a través del tiempo .....	55
Figura 25. Producción de metano en consorcios .....	56
Figura 26. Concentración celular ( <i>E. gracilis</i> ) a través del tiempo en consorcios ..	57
Figura 27. Producción de metano en las resiembras de consorcios. ....	58
Figura 28. Concentración de células ( <i>E. gracilis</i> ) en resiembra de consorcios. ....	59
Figura 29. Producción de metano en diferentes condiciones del consorcio .....	60
Figura 30. Crecimiento celular ( <i>E. gracilis</i> ) en diferentes condiciones del consorcio .....	61
Figura 31. Concentración de clorofila ( <i>E. gracilis</i> ) en diferentes condiciones del consorcio .....	62

## 12.2. Índice de Tablas

Tabla 1 . Comparación de la composición de los medios de cultivo utilizados. ....	40
Tabla 2. Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempos de duplicación de <i>E. gracilis</i> cultivada en microaerofilia .....	47
Tabla 3. Comparación de la viabilidad de <i>E. gracilis</i> en diferentes medios de cultivo. ....	48

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmadinejad N, Dagan T & Martin W. 2007. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. Elsevier, Gene 402: 35-39.
2. Arnon DI. 1948. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology vol. 24, No. 1: 1-15.
3. Bravo Sierra E. 2004. Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. Rev. Biol. Trop. 52 (Suppl. 1): 5.
4. Buetow DE. 1968. Morphology and ultrastructure of Euglena.- In The Biology of Euglena Vol.I, Cap. 4 (D. E. Buetow, ed), pp. 110-181. Academic Press, New York.
5. Burriel Martí F, Lucena Conde F, Arribas Jimeno S y Hernández Méndez J. 2008. Química Analítica Cualitativa. International Thompson Editores, 18va. edición. España
6. Castro-Guerrero NA, Jasso-Chávez R & Moreno-Sánchez R. 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. Elsevier Biochemical et Biophysica 1710: 113-121.
7. Danforth WF. 1968. Respiration.- In The Biology of Euglena Vol.II, Cap. 2 (D. E. Buetow, ed), pp. 55-70. Academic Press, New York.
8. Devars S, Avilés C, Cervantes C, Moreno-Sánchez R. 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. Arch Microbiol 174:175-180
9. Ellis JT, Tramp C, Sims RC & Miller CD. 2012. Characterization of a Methanogenic Community within an Algal Fed Anaerobic Digester. ISRN Microbiology Vol.2012, article ID 753892. Doi: 10.5402/2012/753892
10. Ferry JG & Lessner DJ. 2008. Methanogenesis in Marine Sediments. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125: 147-157 DOI: 10.1196/annals.1419.007.
11. Galagan JE, Nusbaum C, Roy A et al. 2002. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. Genome Res. 12: 532-542.

12. García Breijo F, Roselló Caselles J, Santamarina Suirana MP (Ed) 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Cap. 1. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
13. Garlaschi FM, Garlaschi AM, Lombardi A & Forti G. 1974. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis*. *Plant Science Letters*, 2: 29-39.
14. Goevert D & Conrad R. 2009. Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 75, No.9: 2605-2612. Doi:10.1128/AEM.02680-08.
15. González-Moreno S, Gómez-Barrera J, Perales H & Moreno-Sánchez R. 1997. Multiple effects of salinity on photosynthesis of the protist *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum* 101: 777-786.
16. Hoffmeister M, van der Klei A, Rotte C, van Grinsven KWA, van Hellemond JJ, Henze K, Tielens AGM and Martin W. 2004. *Euglena gracilis* Rhodoquinone: Ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.279, No. 21, Issue of May 21, pp. 22422-22429.
17. Jasso-Chávez R, Pacheco-Rosales A, Lira-Silva E, Gallardo-Pérez JC, García N & Moreno-Sánchez R. 2010. Toxic effects of Cr (VI) and Cr (III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. Elsevier, *Aquatic Toxicology* DOI: 10.1016.
18. Jáuregui-Rincón J & Chávez-Vela NA. 2006. Glosario de Biotecnología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. ISBN 970-728-049-2
19. Johnson LP. 1968. The taxonomy, phylogeny, and evolution of the genus *Euglena*.- *In* *The Biology of Euglena* Vol. I, Cap. 1 (D. E. Buetow, ed), pp.1-24. Academic Press, New York.
20. Kempner ES. 1982. Stimulation and inhibition of metabolism and growth of *Euglena gracilis*.- *In* *The Biology of Euglena* Vol.III, Cap. 6 (D. E. Buetow, ed), pp.197-247. Academic Press, New York.

21. Kletzin A. 2006. Capítulo 2 General Characteristics and Important Model Organisms In Archaea molecular and celular biology (R. Cavicchiolli, ed), pp. 14-92. ASM PRESS, Washington DC.
22. Lackey JB. 1968. Ecology of Euglena.- In The Biology of Euglena Vol. 1, Cap. 2 (D. E. Buetow, ed), pp. 28-43. Academic Press, New York.
23. 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*. Journal of Hazardous Materials 193: 216-224.
24. Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, Hernández-Juárez V, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R, Jasso-Chávez R. 2012. Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. PLoS ONE 7(11): e48779. Doi:10.1371/journal.pone.0048779.
25. Liu CT, Miyaki T, Aono T & Oyaizu H. 2007. Evaluation of Methanogenic Strains and Their Ability of Endure Aeration and Water Stress. Springer Science Curr Microbiol DOI 10.1007/s00284-007-9059-7.
26. Maeder DI, Anderson I, Brettin TS, Bruce DC, Gilna P, Han CS, Lapidus A, Metcalf WW, Saunders E, Tapia R & Sowers KR. 2006. The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. Journal of Bacteriology, Nov, p.7922-7931 Doi: 10.1128/JB.00810-06
27. Matsui K, Ishii N & Kawabata Z. 2003. Release of Extracellular Transformable Plasmid DNA from *Escherichia coli* Cocultivated with Algae. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 4, 2399-2404.
28. Mendoza-Cózatl D, Devars S, Loza-Tavera H, Moreno-Sánchez R. 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol Plant 115:276-283
29. Mendoza-Cózatl D, Rangel-González E, Moreno-Sánchez R. 2006. Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch Environ Contam Toxicol 51:521-528

30. Moran JJ, House CH, Freeman K & Ferry JG. 2004. Trace methane oxidation studied in several Euryarchaeota under diverse conditions. Heron Publishing, Archaea 1: 303-309.
31. Park KY, Lim BR & Lee K. 2009. Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. Water Science & Technology, 59.11: 2111-2116.
32. Reay D, Smith P, van Amstel A (Ed.) 2010. Methane and climate change. Earthscan, London.
33. Santiago MG. 2012. Efecto del cadmio en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica cultivada en anaerobiosis. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM.
34. Sowers KR, Boone JE & Gunsalus RP. 1993. Disaggregation of *Methanosarcina spp.* and growth as single cells at elevated osmolarity. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, No. 11: 3832-3839.
35. Starr C, Taggart R, Portales-Betancourt GL, Contreras Moreno N (Ed) 2008. Biología. La unidad y la diversidad de la vida. Undécima Edición, Cengage Learning, México.
36. Wolin EA, Wolin MJ & Wolfe RS. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. Journal of Biological Chemistry Vol. 238, No. 8: 2882-2886.

#### Referencias de Internet

- ATCC, The American Type Culture Collection, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
- Global Methane Initiative, [www.globalmethane.org](http://www.globalmethane.org)
- NSCEP, National Service Center for Environmental Publications. <http://www.epa.gov/nscep/>